

INFLUENCIA DE LOS RESIDUOS CONSERVADOS DEL SITIO ACTIVO, SOBRE LA CATÁLISIS Y REACTIVIDAD DE UNA PEROXIRREDOXINA DE LEVADURA

CECILIA J. NIEVES ÁLVAREZ

Tutor: Dr. Gerardo Ferrer Sueta

TESINA DE GRADO Licenciatura en Bioquímica Laboratorio de Fisicoquímica Biológica Facultad de Ciencias, UdelaR

Noviembre 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por haberme inculcado un sinfín de valores y principios que fueron el puntapié inicial para formar la persona que hoy en día soy, por acompañarme en cada decisión que tomé, y por brindarme siempre su amor incondicional.

A mis amigos, los que aún están y los que estuvieron alguna vez, con los que compartí lo mejor y lo peor, y de los que nunca me voy a olvidar.

A Noé, alguien muy especial en mi vida, que me transmite tranquilidad en los momentos en que la pierdo y que siempre tiene la palabra justa para hacerme sentir bien.

A Gerardo, por haberme dado la oportunidad de realizar mi pasantía bajo su responsabilidad, transmitirme sus conocimientos para que lograra desenvolverme eficazmente en el trabajo y por actuar en reiteradas oportunidades como consejero, más que como un tutor.

A mis compañeros de laboratorio, un gran grupo humano que me permitió trabajar cómodamente, estando disponibles cuando necesité su ayuda y con los que fue un placer compartir todo este tiempo.

Y a todas las personas que de alguna manera constituyen o constituyeron mi entorno, imposibles de enumerar porque de seguro me olvidaría de alguien.

A todos ellos, ¡gracias!



RESUMEN	5-6
INTRODUCCIÓN	7
Generalidades acerca de las peroxirredoxinas	8-10
La cisteína como protagonista en la catálisis	11-12
Estructura y clasificación de peroxirredoxinas	13-17
Desde la oxidación de la cisteína peroxidática a la regeneración de la enzima reducida: ciclo catalítico	18-20
Thiol Specific Antioxidant protein 1: Tsa1	21-25
OBJETIVOS	26-27
METODOLOGÍA	28
Materiales	29
Preparación de células de E. coli quimiocompetentes (con cloruro de calcio)	29
Transformación de células quimiocompetentes con ADN plasmídico	29-30
Preparación de crioinóculos bacterianos	30
Realización de mini-preparaciones de ADN plasmídico	30-31
Expresión y purificación de Tsa1	31-32
Soluciones amortiguadoras	32
Reducción de la proteína	33
Cuantificación de proteína y tioles proteicos	33
Determinación de la constante de acidez de Cys47	33-37
Determinación de la constante de velocidad para la reacción entre Cys47 y mBBr	37-40
Determinación de la constante de velocidad para la reacción entre Cys47 y H_2O_2	40-42
RESULTADOS	43
Expresión y purificación de Tsa1	44
Determinación de la constante de acidez de Cys47 para Tsa1 wt, T44V, T44A y R123G	45-47
Determinación de la nucleofilia de Cys47 para Tsa1 wt, T44V, T44A y R123G	48-50
Determinación de la reactividad de Cys47 para Tsa1 wt, T44A y R123G ante H_2O_2	51-52
DISCUSIÓN	53-61
CONCLUSIONES	62-63
REFERENCIAS	64-7

FIGURAS

Figura 1.	Producción de especies reactivas del oxígeno.				
Figura 2.	Estructura cristalina de la tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca en su forma				
	monomérica representada mediante el modelo molecular de cintas.				
Figura 3.	Árbol filogenético de la familia de Prx.	15			
Figura 4.	Triada catalítica de peroxirredoxinas.				
Figura 5.	Mecanismo de reacción para la reducción de hidroperóxidos (ROOH) por parte de	18			
	tiolatos (RS-).				
Figura 6.	Esquema hipotético acerca de las interacciones que se establecen entre el sustrato y	19			
	los residuos del sitio activo, que llevan a la reacción de sustitución.				
Figura 7.	Ciclo catalítico de Prx.	20			
Figura 8.	Estructura cristalográfica de Tsa1 C47S (con la cisteína catalítica mutada por serina)	22			
	de Saccharomyces cerevisiae.				
Figura 9.	Sitio activo de Tsa1 C47S de Saccharomyces cerevisiae.	23			
Figura 10.	Reacciones implicadas en la detoxificación de peróxidos mediada por Tsa1.				
Figura 11.	Reacción general entre el grupo tiol y DTDPy.	33			
Figura 12.	Reacción de alquilación de un tiol por mBBr.	34			
Figura 13.	Curso temporal para la reacción de alquilación con mBBr.	36			
Figura 14.	Transferencia de energía de Förster entre Trp y el producto de alquilación con mBBr.	38			
Figura 15.	Obtención de las constantes independientes de pH.	39			
Figura 16.	Gel de poliacrilamida 15% con las diferentes muestras colectadas durante la	44			
	expresión y purificación de Tsa1 <i>wt.</i>				
Figura 17.	Perfil de pH para la velocidad de alquilación de Tsa1 con mBBr.	45			
Figura 18.	Perfil de pH para la titulación de Tsa1 con HCl.	46			
Figura 19.	Caída en la emisión de Trp a 340 nm debido a FRET con mBBr y constante de	48			
	velocidad observada para la reacción de alquilación.				
Figura 20.	Determinación de nucleofilia para Tsa1.	49			
Figura 21.	Constante de segundo orden para la reacción entre Tsaı y H_2O_2 .	51			
Figura 22.	Estructura del sitio activo de Tsa1 C47S.	55			
Figura 23.	Gráfico de Brønsted para la reacción de tioles de bajo peso molecular con mBBr a	59			
	25 °C.				

Figura 24.Gráfico de Brønsted de las constantes de velocidad aparente de tioles de bajo peso61molecular con H_2O_2 a pH 7.06 ± 0.04 y 25 °C.

TABLAS

Tabla 1.	Clasificación filogenética de peroxirredoxinas.	15
Tabla 2.	Soluciones amortiguadoras.	32
Tabla 3.	Representación esquemática de las condiciones de ensayo con mBBr.	35
Tabla 4.	Valores promedio de pKas obtenidos para las diferentes proteínas mediante la	46
	reacción de alquilación con mBBr.	
Tabla 5.	Promedio de constantes de velocidad de segundo orden independientes de pH para	50
	la reacción entre Tsa1 y mBBr.	
Tabla 6.	Promedio de constantes de velocidad para la reacción entre Tsa1 y H_2O_2 .	52



Las peroxirredoxinas (Prxs) constituyen una familia de enzimas antioxidantes y han sido identificadas en casi todos los organismos. Contienen una cisteína en su sitio activo (cisteína peroxidática) cuyo grupo tiol en su forma desprotonada (tiolato) es el responsable de la reducción de hidroperóxidos mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2).

Además del residuo de cisteína, existen tres aminoácidos conservados en el sitio catalítico de estas enzimas: arginina, treonina y prolina. Los primeros dos estarían involucrados en la modulación de la catálisis y reactividad de la cisteína peroxidática, mientras que la prolina cumpliría una función más bien estructural.

El azufre de la cisteína establece enlaces de hidrógeno con el grupo guanidinio de la arginina y el hidroxilo de la treonina; esta red de interacciones estabiliza la cadena lateral de la cisteína favoreciendo su forma tiolato y aumentando su nucleofilia ante un sustrato específico. Según la hipótesis de partida, cuando el peróxido se acerca al sitio activo de la enzima los enlaces de hidrógeno experimentan un desplazamiento desde el azufre del tiolato hacia el oxígeno del sustrato, lo que promueve la reacción S_N2. Por otra parte, la carga positiva aportada por el residuo de arginina proporciona una aceleración no específica para la reducción de hidroperóxidos, ya que estabiliza al grupo saliente.

El presente trabajo se centró en Tsa1, una peroxirredoxina de *Saccharomyces cerevisiae*, y en la influencia de los residuos conservados de su sitio activo (Thr44 y Arg123) sobre la constante de acidez y nucleofilia de la cisteína peroxidática (Cys47), así como en la velocidad de reacción entre la peroxirredoxina y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Los resultados obtenidos mostraron que en las mutaciones tanto en treonina como en arginina, el pKa de la Cys47 no se vio afectado. Por ende, en esta peroxirredoxina estos residuos no serían los responsables de mantener bajo su pKa, a diferencia de lo que ocurre con otras proteínas de la misma familia.

A su vez, ninguna de las mutaciones tuvo el efecto esperado en la reacción de la cisteína peroxidática con monobromobimano (mBBr); en ambos casos se vio una leve disminución en la nucleofilia cuando se esperaba un aumento debido a la falta de estabilización del tiolato. Por tanto, en Tsa1 ninguno de los dos residuos conservados sería el encargado de mantener baja la nucleofilia de la cisteína catalítica.

Por último, los experimentos con H_2O_2 dieron como resultado una disminución en la constante de velocidad para la mutante en treonina respecto a la *wild type*, mientras que para la mutante en arginina prácticamente fue nula. Esto refleja la importancia de ambos residuos en la especificidad de la reacción ante dicho peróxido.

INTRODUCCIÓN

Generalidades acerca de las peroxirredoxinas

Los organismos vivos están constantemente expuestos a especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), que se producen durante el metabolismo y en respuesta a estímulos externos [1]; la reducción incompleta del oxígeno molecular, el metabolismo lipídico en los peroxisomas, y el metabolismo aeróbico, causan la formación de ROS, entre las que se destacan peróxido de hidrógeno, alquil hidroperóxidos, y anión superóxido (*Figura 1*). Estas especies reactivas pueden causar efectos perjudiciales en diversos componentes celulares, entre ellos ADN, proteínas y lípidos de membrana [2].





Todos los organismos aeróbicos cuentan con una amplia gama de proteínas antioxidantes que tienen un rol protector ante el estrés oxidativo, y la desnaturalización y agregación proteicas, generados por ROS [3,4]. Entre esta batería de enzimas se encuentran: la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, muchos tipos de peroxidasas [5], y diversas chaperonas moleculares tales como las proteínas de shock térmico (HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*) [6].

Dentro de estos mecanismos de defensa se encuentra una familia de tiol peroxidasas que presentan una cisteína en el sitio activo (cisteína peroxidática) capaz de reducir peróxido de hidrógeno, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos a agua, nitrito y alcohol, respectivamente, utilizando los equivalentes de reducción provenientes de tiorredoxina (Trx) u otros tioles donantes de electrones [7-19].

Estas enzimas ubicuas y de gran versatilidad [7-9] conocidas como peroxirredoxinas (Prx) [20], han sido identificadas en organismos de todos los reinos biológicos, siendo la única excepción encontrada hasta el momento *Borrelia burgdorferi* (y otras especies de *Borrelia*). La amplia distribución y el alto nivel de expresión de estas proteínas dan una pauta tanto de su permanencia a lo largo de la evolución, así como de su importancia [8]: se encuentran entre las diez proteínas mayoritarias en *Escherichia coli* [21], la segunda o tercera más abundante en eritrocitos [22], y constituyen un 0.1-0.8% de la proteína soluble en otras células de mamíferos [23].

La localización subcelular de estas peroxidasas es variada; si bien se encuentran principalmente en el citosol, también han sido halladas dentro de mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico y peroxisomas, asociadas al núcleo y a membranas, y en al menos un caso, exportadas extracelularmente [9, 13, 17-19, 24, 25].

Cabe señalar que muchos organismos presentan más de una peroxirredoxina [26] como en el caso de las seis peroxirredoxinas identificadas en células de mamíferos. Si bien todas ellas reducen hidroperóxidos, cada una tiene además otras funciones fisiológicas importantes para la célula.

Además de su actividad peroxidasa, también actúan como chaperonas [27, 28] y han sido implicadas en la activación de factores de transcripción y en vías de señalización mediadas por peróxido de hidrógeno [7-9, 29], entre las que se destacan cascadas que llevan a proliferación celular, diferenciación y apoptosis [9, 25, 30, 31].

Un grupo particular de peroxirredoxinas, las 2-Cys Prx, participan en distintas vías de señalización; por ejemplo Prx1 y Prx2 de mamíferos, interactúan directa e indirectamente con quinasas y fosfatasas, regulando su activación por medio de ROS y produciendo diversas respuestas tales como la diferenciación neuronal o respuestas inflamatorias, entre muchas otras [32, 33]. Otro ejemplo, es el de Prx3 humana cuya sobreexpresión se encuentra asociada al desarrollo y progresión

de cáncer de ovario; se ha demostrado que el silenciamiento de su expresión conlleva a una inhibición de la vía de NF-κB lo que promueve la apoptosis de las células cancerígenas [34].

Asimismo, las Prx pueden actuar como sensores de peróxido de hidrógeno debido a que el estado de oxidación de la cisteína catalítica puede ser transferido a otras proteínas intrínsecamente menos sensibles a esta especie [35].

La actividad de estas peroxidasas puede ser regulada por medio de cambios redox, fosforilación, y posiblemente por estados de oligomerización [8]. La regulación de Prx vía fosforilación en respuesta a señales extracelulares conlleva a una acumulación local de peróxido de hidrógeno, y eso permite su función mensajera en diferentes vías de señalización [35].

Desde el punto de vista catalítico, la eficiencia de estas tiol peroxidasas (10⁵-10⁷ M⁻¹s⁻¹) [26] resulta cuestionable si se la compara con las de glutatión peroxidasas (GPx, 10⁸ M⁻¹s⁻¹) [9] y de catalasas (10⁶ M⁻¹s⁻¹) [36]. Sin embargo, su elevada abundancia y el hallazgo de que sea una peroxirredoxina bacteriana (AhpC), y no catalasa, la responsable de la reducción del peróxido de hidrógeno generado endógenamente [37], reafirman la importancia de las Prx en la detoxificación de peróxidos en las células.

La cisteína como protagonista en la catálisis

Como se mencionó con anterioridad, el residuo implicado en la reducción de hidroperóxidos en Prx es una cisteína ubicada en el sitio activo.

A pesar de ser uno de los residuos menos abundantes en los organismos, la cisteína es comúnmente observada en sitios funcionalmente importantes de la proteína, donde se desempeña catalíticamente, regula, estabiliza la estructura proteica o une cofactores, entre otras funciones [38].

El grupo tiol de la cisteína es capaz de oxidarse en presencia de otros tioles creando enlaces disulfuro intra o intermoleculares. Además, junto con la histidina, la cisteína es el residuo más frecuentemente empleado en sitios de unión a metales en proteínas. La cadena lateral de la cisteína también puede reaccionar directamente con muchos oxidantes; la oxidación reversible del tiol cisteínico juega un papel importante en la regulación redox de proteínas mediante la formación de ácido sulfénico como intermediario [39-41], disulfuros mixtos con glutatión [42], y sobreoxidación a ácido sulfínico [8]. Por otra parte, la cisteína es el principal blanco del estrés nitrosativo, que lleva a la formación de *S*-nitrosotioles reversibles [43]. La susceptibilidad de la cisteína a estas modificaciones es dependiente de la reactividad de cada tiol específico, y por ende, es importante el entorno de dicho tiol.

El residuo de cisteína puede estar ubicado en diferentes lugares de la proteína; las cisteínas que se encuentran ocultas en la estructura se comportan como residuos hidrofóbicos, mientras que las que están accesibles al solvente pueden interaccionar con otros grupos polares. Estas interacciones pueden polarizar considerablemente el residuo de Cys e influir en su pKa; se estima que los residuos de cisteína más expuestos presentan un pKa más cercano al pH neutro [44], lo que implica que incluso a pequeñas variaciones locales de pH dentro del intervalo fisiológico, estos residuos pueden cambiar fácilmente su capacidad de actuar como nucleófilos. En ciertas circunstancias, estos cambios electrostáticos pueden afectar, por ejemplo, la habilidad de la proteína de interaccionar con otras proteínas y/o moléculas cargadas; este hecho señala la elevada capacidad de respuesta que presentan las cisteínas expuestas ante cambios en el estado fisiológico y variaciones en las condiciones ambientales, lo que da una pauta de por qué estos residuos son encontrados más frecuentemente en superficies. Entonces, teniendo en cuenta estas consideraciones, hay dos características

fundamentales que influyen en la reactividad de la cisteína *per se*: (1) su exposición al solvente y, (2) el estado de protonación de su grupo funcional [44].

Estructura y clasificación de las peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas presentan una estructura terciaria conocida como plegamiento tipo tiorredoxina [45]. Este tipo de plegamiento consta básicamente de un cuerpo central de hojas β plegadas rodeadas de hélices α [46] (*Figura 2*).

Figura 2. Estructura cristalina de la tiorredoxina F de cloroplasto de espinaca en su forma monomérica representada mediante el modelo molecular de cintas. Se puede apreciar un core de hojas β rodeado por hélices α . Imagen obtenida de *Protein Data Bank*, **PDB ID: 1F9M**.



La estructura cuaternaria de las peroxirredoxinas es muy variada; el número de subunidades depende del tipo de Prx, pudiéndose encontrar desde monómeros hasta decámeros, cuya formación está determinada por múltiples factores, como por ejemplo, pH, fuerza iónica, concentración de Ca²⁺ o Mg²⁺ y estado redox de la cisteína peroxidática [8], entre otros.

Existen casos, como lo reportado para la peroxirredoxina bacteriana AhpC, en los que la formación del decámero provoca un aumento en la catálisis por parte de esta proteína [47], y su desensamblaje conlleva a una disminución en la actividad [48], por lo que existiría cierta relación entre el estado de oligomerización de AhpC y su actividad catalítica. No obstante, se desconoce si esto sucede en todas las peroxidasas de esta familia.

El sitio activo de las Prx está altamente conservado tanto desde el punto de vista estructural, como en la secuencia. En su forma reducida, la cisteína peroxidática se encuentra expuesta al solvente en un estrecho bolsillo formado por un motivo bucle-hélice y localizada en el primer giro de esta hélice. A su vez, la cisteína catalítica está rodeada de tres aminoácidos adicionales conservados: prolina (Pro), treonina (Thr) y arginina (Arg) [8]. Los residuos de Cys, Pro y Thr forman parte de un motivo conservado PXXXTXXC [7, 8, 49, 50], mientras que la Arg se encuentra distante en la estructura primaria, pero cercana espacialmente.

La nucleofilia de la cisteína catalítica depende de su estado de protonación a un pH dado. Se ha propuesto que, a pH neutro, los residuos de Arg y Thr estabilizan la cadena lateral de la cisteína peroxidática en su forma desprotonada con lo que el equilibrio tiol \leftrightarrow tiolato se ve desplazado hacia la derecha, favoreciendo la predominancia de la especie más nucleófila. A su vez, se cree que tanto la Arg como la Thr, son los responsables de estabilizar el estado de transición entre el tiolato y el sustrato peróxido en una reacción tipo S_{N2} [51], de la que se discutirán más detalles en el próximo apartado.

Las peroxirredoxinas son divididas en dos categorías: 1-Cys Prx y 2-Cys Prx, según sea el número de cisteínas que está directamente involucrado en la catálisis [52]. A su vez, las 2-Cys Prx se subdividen en dos grupos: típicas y atípicas. Sin embargo, para poder clasificar a cada peroxirredoxina emergente según este criterio, es necesario caracterizar previamente el mecanismo enzimático de la misma, y no siempre es tarea sencilla. Por ende, antes de recurrir a una categorización meramente mecanística, los miembros nuevos de esta familia deben ser clasificados en base a su homología en la secuencia de aminoácidos. De esta manera, el alineamiento de las secuencias de peroxirredoxinas pertenecientes a todos los reinos biológicos, dan lugar a la construcción de árboles filogenéticos (*Figura 3*) que revelan subfamilias formadas por 1-Cys y 2-Cys Prx [9, 53]. Si se observa la *Figura 3* en la que se distinguen claramente cinco subfamilias de Prx, se puede ver como, por ejemplo, la PRDX5 humana que es una 2-Cys atípica, pertenece al mismo clúster filogenético que Ahp1p de *S. cerevisiae*, una 2-Cys Prx típica [12].

Existen otras clasificaciones basadas en la filogenia en las que se diferencian seis subfamilias, en lugar de cinco (*Tabla* 1).



Figura 3. Árbol filogenético de la familia de Prx. Se pueden apreciar cinco subfamilias: PrxV/PRDX5, PrxVI/PRDX6, PrxI/PRDX1, BCP/PrxQ y Tpx. *Ec: Escherichia coli; Ap: Aeropyrum pernix; Sc: Saccharomyces cerevisiae; Pf: Plasmodium falciparum; At: Arabidopsis thaliana; Dm: Drosophila melanogaster; Hs: Homo sapiens.* Adaptado de [54].

Subfamilia	Número de miembros	Distribución filogenética				
AhpC/Prx1	1059	Arqueas, bacterias, eucariotas				
BCP/PrxQ	1115	Bacterias, eucariotas				
Prx5	517	Bacterias, eucariotas				
Prx6	493	Arqueas, bacterias, eucariotas				
Трх	307	Bacterias				
AhpE	25	Bacterias				

Tabla 1. Clasificación filogenética de peroxirredoxinas [55].

En lo que respecta al otro tipo de clasificación al que se hizo referencia, las 2-Cys Prx típicas contienen dos residuos de cisteína, la cisteína peroxidática y la resolutiva. Generalmente la primera de ellas se ubica en el extremo N-terminal, mientras que la segunda se encuentra en el C-terminal siendo una excepción Ahp1 de *S. cerevisiae*, en el que este orden está invertido [56]; ambas cisteínas son requeridas para la actividad catalítica de este tipo de peroxirredoxinas. Las 2-Cys Prx atípicas poseen únicamente la cisteína conservada en el N-terminal, pero requieren de otra adicional para la catálisis. Y por último, las 1-Cys Prx presentan la cisteína conservada en N-terminal, y precisan sólo de ella para llevar a cabo su función catalítica [57, 58].

La presencia o ausencia de la segunda cisteína está relacionado con la conservación de secuencias en la vecindad de la cisteína N-terminal; en las 2-Cys Prx la secuencia que rodea a la cisteína peroxidática es FVCP, mientras que en las 1-Cys es PVCT [7].

La primera reacción en la reducción de peróxidos, en la que la cisteína peroxidática ataca al sustrato peróxido y es oxidada a ácido sulfénico [59, 60], es idéntica en los tres tipos de peroxirredoxinas [61]. En la reacción que sigue en el ciclo, cada grupo es diferente.

En el caso de las 2-Cys Prx típicas, que son homodímeros obligados con dos sitios activos idénticos [62-65], el ácido sulfénico derivado de la cisteína peroxidática de una de las subunidades es atacado por la cisteína resolutiva localizada en el C-terminal de la otra subunidad. Esta reacción de condensación da como resultado la formación de un puente disulfuro intermolecular estable, que luego, mediante el uso de equivalentes de reducción provenientes de una disulfuro oxidorreductasa (por ejemplo: tiorredoxina, AhpF, triparredoxina o AhpD) [66-68] es reducido, completando el ciclo.

Las 2-Cys Prx atípicas tienen el mismo mecanismo que las típicas pero son funcionalmente monoméricas [57, 69]. En estas peroxirredoxinas tanto la cisteína peroxidática como la resolutiva se encuentran dentro de la misma subunidad, por lo que la reacción de condensación entre ambas resulta en la formación de un enlace disulfuro intramolecular. Las 2-Cys atípicas conocidas hasta el momento utilizan tiorredoxina como reductor en el ciclo catalítico [57].

Finalmente, en las 1-Cys Prx el ácido cisteín sulfénico generado en la primera reacción es reducido por un tiol que actúa como donante de electrones, formando un disulfuro mixto; aunque la identidad del mismo no es del todo clara, se han propuesto como posibles candidatos: glutatión,

tiorredoxina, ácido lipoico, y ciclofilina [9, 19, 70, 71]. Posteriormente, un segundo tiol reacciona con ese disulfuro y regenera la enzima en su estado reducido.

Estudios realizados en Prx1 de *S. cerevisiae* demostraron que el ácido cisteín sulfénico generado por exposición a peróxido, se redujo luego de su tratamiento con ascorbato; parece ser que la ausencia de una cisteína resolutiva en estas peroxirredoxinas las predispone a la reducción por dicho agente. A su vez, la presencia de una histidina cercana a su sitio activo crearía un entorno cargado positivamente que permitiría la interacción con moléculas negativas como el ascorbato. No obstante, los resultados obtenidos mostraron que la reducción de 1-Cys Prx por ascorbato no dependería únicamente de la presencia de una histidina y ausencia de una cisteína resolutiva, sino que también entrarían en juego otras características estructurales, aún no definidas [72].

Otro reductor propuesto para estas proteínas, es glutarredoxina (Grx), que cataliza la reducción de disulfuros mixtos de glutatión. El mecanismo propuesto para la reducción de peróxidos mediante un sistema Prx/Grx implica que el ácido cisteín sulfénico forme un disulfuro mixto con glutatión y, posteriormente, ese disulfuro sea reducido por Grx [73].

Desde la oxidación de la cisteína peroxidática a la regeneración de la enzima reducida: ciclo catalítico

La especie reactiva en la reducción de hidroperóxidos por parte de peroxirredoxinas es el tiolato. La nucleofilia de este anión da lugar a una gran cantidad de reacciones de adición y sustitución del tipo S_{N2} [74]. Como se mencionó con anterioridad, en el sitio activo de estas enzimas existen dos aminoácidos, Arg y Thr, que junto con la cisteína peroxidática constituyen la triada catalítica (*Figura* 4). Estos dos residuos y el grupo amida de la cisteína establecen una red de interacciones polares que estabilizan al tiolato favoreciéndolo en el equilibrio con el tiol, con lo que incrementan su nucleofilia [75].



Figura 4. Triada catalítica de peroxirredoxinas. Sitio activo de PrxV humana [8].

Inicialmente se da el ataque nucleofílico del tiolato sobre uno de los oxígenos del peróxido mediante el mecanismo correspondiente al de una sustitución nucleofílica bimolecular (S_{N2}) (*Figura* 5).



Figura 5. Mecanismo de reacción para la reducción de hidroperóxidos (ROOH) por parte de tiolatos (RS⁻).

El sustrato peróxido presenta dos átomos electronegativos que son mejores aceptores de puentes de hidrógeno que el tiolato. El acercamiento del ROOH causa un desplazamiento de los puentes de hidrógeno desde el azufre del tiolato hacia un oxígeno del peróxido, lo que aumenta la nucleofilia del anión y favorece el ataque nucleofílico sobre dicho oxígeno. Así, mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los residuos constituyentes del sitio activo y el peróxido, este último queda "atrapado" en esta red de interacciones y comienza la reacción de peroxidación. Cabe mencionar, que lo dicho anteriormente acerca de que los residuos de Arg y Thr estabilizan al tiolato se da únicamente en ausencia de sustrato, lo que provee un indicio de la especificidad en la reactividad hacia el mismo [74] (*Figura 6*).



Figura 6. Esquema hipotético acerca de las interacciones que se establecen entre el sustrato y los residuos del sitio activo, que llevan a la reacción de sustitución. La difusión del peróxido permite su encuentro con el sitio activo de la peroxirredoxina. Esto provoca un desplazamiento de enlaces de hidrógeno desde el tiolato hacia el sustrato, aumentando la nucleofilia del tiolato y promoviendo el ataque sobre el oxígeno distal del ROOH. A continuación se rompe el enlace entre los oxígenos del peróxido y se estabiliza el grupo aniónico saliente mediante la carga positiva del residuo de arginina. Adaptado de [51].

La existencia de un sitio al que se pueda unir el anión en la vecindad de la cisteína reactiva proporciona una aceleración no específica para la reducción de hidroperóxidos en general por estabilización del grupo saliente; en el caso de peróxidos más grandes la presencia de grupos funcionales adecuados permite interacciones adicionales con la superficie de la proteína.

Lo descrito hasta aquí en este apartado compete únicamente a la primera reacción del ciclo catalítico. Luego de que tiene lugar la reducción del ROOH y se forma el intermediario sulfénico (*Figura 6*), se da un desplegamiento local de la estructura secundaria (conformación *LU*, del inglés *locally unfolded*). No queda claro si este cambio conformacional es necesario para la formación del

disulfuro entre el ácido cisteín sulfénico y la cisteína resolutiva, o es una consecuencia de dicha reacción. Posteriormente se da la reducción del disulfuro y el sitio activo se repliega nuevamente (conformación *FF*, del inglés *fully folded*), con lo que se regenera la peroxirredoxina en su forma activa [76] (*Figura 7*).



Figura 7. Ciclo catalítico de Prx. El ciclo catalítico de estas enzimas involucra tres grandes pasos: (1) oxidación de la cisteína peroxidática; (2) resolución, o formación del disulfuro entre la cisteína peroxidática y la resolutiva; y (3) reciclaje, o regeneración de la Prx reducida.

Durante el ciclo catalítico se pueden apreciar dos conformaciones distintas: FF (*fully folded*, con el sitio activo reducido), y LU (*locally unfolded*, con el disulfuro formado). En todas las Prx se puede dar una inactivación por sobreoxidación de la Cys peroxidática (paso 4) debido a niveles elevados de peróxido. En el caso de las 2-Cys Prx, la forma inactiva puede ser restaurada a través de una reacción que requiere ATP, catalizada por sulfirredoxina (Srx) (paso 5). S_P corresponde al átomo de azufre de la Cys peroxidática. La cisteína resolutiva (de R', con S_R correspondiente al átomo de azufre de dicha Cys) puede provenir de una proteína diferente o molécula pequeña (en el caso de 1-Cys Prx) o de una segunda Cys dentro de la Prx ya sea sobre la misma cadena o en otra subunidad (2-Cys Prx).

Diferentes proteínas pueden participar en la reducción del disulfuro, identificadas como R" en el paso 3.

La Prx genérica se encuentra representada en forma monomérica con el fin de simplificar la esquematización.

Thiol Specific Antioxidant protein 1: Tsa1

Tsa1 es una de las cinco peroxirredoxinas presentes en *Saccharomyces cerevisiae* [12]. Fue la primera en ser caracterizada en este organismo, seguida de Ahp1 [20, 77], y representa el 91% de este tipo de peroxidasas en levadura [78, 79]. Luego se identificaron y caracterizaron tres Prx adicionales: Tsa2, Prx1 y Dot5. Tsa1, Tsa2 y Ahp1 son citoplasmáticas, Prx1 es mitocondrial y Dot5 se encuentra en el núcleo [12]. Las tres citoplasmáticas pertenecen al grupo de las 2-Cys Prx típicas; Dot5 es una peroxirredoxina de 2 cisteínas atípica; y Prx1 es una peroxirredoxina de una cisteína.

Existe evidencia de que la expresión de un gran número de genes en *S. cerevisiae* depende de H_2O_2 , pero no de otros agentes estresores tales como ditiotreitol, diamida y menadiona. La inactivación de múltiples genes codificantes para diversas tiol peroxidasas, llevó a una interrupción en la reprogramación transcripcional inducida por H_2O_2 sin afectar la capacidad de dichas células en la respuesta ante otros tipos de estrés oxidativo. Esto demuestra la importancia de estas peroxidasas en la transferencia de señal desde el H_2O_2 hacia otros componentes celulares, actuando como mediadores globales de la expresión génica en respuesta al peróxido [29].

Se desconoce si la localización subcelular de las peroxirredoxinas cambia en respuesta al estrés oxidativo. Todas estas Prx muestran una actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina, pero las actividades específicas de cada una de ellas hacia diferentes peróxidos, es distinta. Tsa1, Tsa2 y Prx1 reducen preferencialmente H_2O_2 , mientras que Ahp1 y Dot5 presentan selectividad por alquil hidroperóxidos [12]. Adicionalmente, tanto Tsa1 como Tsa2 reducen peroxinitrito [14]. Además de su actividad peroxidasa, Tsa1 y Tsa2 han mostrado comportarse como chaperonas moleculares que proporcionan resistencia en condiciones de shock térmico [27]; esta actividad implica cambios en el estado de oligomerización que dependen del grado de estrés.

Los niveles transcripcionales de los genes que codifican para estas peroxirredoxinas difieren entre sí. La mayoría de los estudios demuestran que el ARNm de Tsa1 es el más abundante en los distintos estadíos de crecimiento de la levadura, ya que es el que presenta un mayor nivel de transcripción basal [12, 80].

Tsa1 posee 196 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 21.6 KDa por monómero. Cada una de estas subunidades presenta un plegamiento tipo tiorredoxina, con un cuerpo central de cinco hojas β plegadas (β1-β5), rodeadas por cuatro hélices α (α1-α4) [46], lo que le confiere gran estabilidad (*Figura 8A*). En lo que refiere a su estructura cuaternaria, se encuentra en forma de pentámero de dímeros como se puede apreciar en la *Figura 8C*.



Figura 8. Estructura cristalográfica de Tsa1 C47S (con la cisteína catalítica mutada por serina) de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Forma monomérica de Tsa1, en el que se puede visualizar el plegamiento tipo tiorredoxina. B) Forma dimérica de la proteína. C) Decámero. Esta forma es mantenida principalmente por interacciones hidrofóbicas. La imagen en el panel C fue obtenida de *Protein Data Bank*, PDB ID: 3SBC. Las imágenes en los paneles A-B, se obtuvieron a partir de la imagen en C utilizando el programa *PyMOL*.

Tal como se mencionó con anterioridad, Tsa1 es una 2-Cys Prx típica, por lo que posee dos residuos de cisteína conservados, ambos necesarios para la catálisis. La cisteína ubicada en el extremo

N-terminal es la peroxidática, y se encuentra en la posición 47, mientras que la situada en el C-terminal es la cisteína resolutiva, y corresponde al residuo número 170 (*Figura 9*).

Al igual que el resto de las Prx, su ciclo catalítico consta esencialmente de tres reacciones, en las que (1) la Cys47 reduce al peróxido, (2) forma un disulfuro con la Cys170 y, (3) posteriormente ese disulfuro se reduce por acción de un sistema tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TR) que regenera la Tsa1 reducida a expensas de NADPH (*Figura 10*).

Figura 9. Sitio activo de Tsa1 C47S de Saccharomyces cerevisiae. En la figura se puede apreciar la disposición espacial de la triada catalítica en el extremo N-terminal de la proteína. Hacia el C-terminal se puede ver la C170 que reacciona con la C47 de otra subunidad homodímero, del formando el disulfuro. La imagen fue obtenida a partir de la estructura presentada en la Figura 8C utilizando el programa PyMOL.





Figura 10. Reacciones implicadas en la reducción de peróxidos mediada por Tsa1. Se puede apreciar la presencia de una Cys47 y una Cys170 en cada subunidad del homodímero. Una vez que la Tsa1_{red} actúa sobre el ROOH, se oxida a ácido cisteín sulfénico, el cual posteriormente forma un disulfuro con la Cys170 de la otra subunidad del dímero. La Trx(SH)₂ reduce el disulfuro en la Tsa1 reestableciendo la enzima en su forma reducida. La tiorredoxina reductasa obtiene los equivalentes de reducción necesarios para regenerar la Trx(SH)₂ a partir de NADPH. Adaptado de [26].

Entre las funciones que se le atribuyen a Tsa1, se ha demostrado que colabora en la estabilidad del genoma; su ausencia lleva a un amplio espectro de mutaciones espontáneas y rearreglos en el mismo que resultan en un incremento del daño oxidativo en el ADN [81]. En este aspecto, se ha establecido que la presencia de la cisteína peroxidática es esencial para que Tsa1 actúe en la supresión de estas mutaciones y la célula no muera, mientras que la cisteína resolutiva es menos importante en este sentido [82].

Estudios realizados con células a las que se les inactivó Tsa1, expusieron una menor eficiencia en la eliminación de especies reactivas del oxígeno generadas mediante tratamiento exógeno con H_2O_2 [14]; por otra parte, estas células fueron débilmente sensibles a dicho sustrato, mientras que las mutantes en las otras cuatro peroxirredoxinas (Tsa2, Ahp1, Prx1 y Dot5) presentaron la misma sensibilidad que las células salvajes. A su vez, la doble mutante para Tsa1 y Tsa2 fue mucho más sensible a peróxido que las demás [82], lo que sugiere una cooperación entre estas dos homólogas en la defensa antioxidante contra estrés oxidativo inducido exógenamente.

Otros ensayos en los que se trató células carentes de Tsa1 o Tsa2 con hidroperóxido de terbutilo, mostraron que a altas concentraciones de este sustrato las células salvajes para ambas peroxirredoxinas resultaron ser más resistentes a dicho tratamiento que las cepas mutantes. Esto

señala que además de su rol en la reducción de H₂O₂, tanto Tsa1 como Tsa2 son importantes en la eliminación de otros hidroperóxidos [15].

Si bien Tsa1 reduce eficazmente peróxido de hidrógeno, hidroperóxido de terbutilo e hidroperóxido de cumeno [15], su reactividad hacia el primero es mucho mayor. Se ha determinado que la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre Tsa1 y H_2O_2 es de 2.2 x 10⁷ $M^{-1}s^{-1}$, mientras que para los otros sustratos esta constante es menor [26].

Como se puede apreciar en la *Figura 9*, la triada catalítica de Tsa1 está conformada por la treonina 44 y la arginina 123, además de la cisteína peroxidática. Es importante poder definir si estos residuos influyen en la reactividad y especificidad de Tsa1 hacia H₂O₂, y establecer si alguno de los parámetros que determinan la catálisis por parte de la cisteína 47, es afectado por la presencia de los mismos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar desde el punto de vista cinético y enzimático la influencia de los residuos conservados del sitio activo en la reactividad y especificidad de Tsa1 mediante la determinación de tres parámetros: (1) constante de acidez de la cisteína peroxidática; (2) constante de velocidad para la reacción con un sustrato inespecífico; (3) constante de velocidad para la reacción con H_2O_2 .

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto que tiene la mutación de la treonina 44 sobre la acidez, nucleofilia y reactividad de la cisteína peroxidática hacia el H₂O₂.
- Evaluar el efecto que tiene la mutación de la arginina 123 sobre la acidez, nucleofilia y reactividad de la cisteína peroxidática hacia el H₂O₂.
- Comparar los resultados obtenidos para los parámetros mencionados entre las mutantes y la proteína salvaje.

METODOLOGÍA

Materiales

Los plásmidos con los diferentes insertos (pET-17b/tsa1^{wt/T44V/T44A/R123Q}) fueron gentilmente donados por Luis Eduardo Soares Netto del Departamento de Genética y Biología Evolutiva de la Universidad de São Paulo, Brasil. El resto de los reactivos empleados, todos de calidad analítica, fueron adquiridos de Applichem o Sigma-Aldrich.

Preparación de células de E.coli quimiocompetentes (con cloruro de calcio)

A partir de cultivos frescos de *E. coli BL21 (DE3) y DH5* α , se aislaron colonias de cada cepa y se inocularon por separado en 3 mL de medio Luria-Bertani (LB). A continuación se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche (16-18 horas), con agitación permanente. Posteriormente, se trasvasaron 2.5 mL de cada cepa a 250 mL de LB (contenidos en un matraz de 1 L) y nuevamente se incubaron a 37°C con agitación, hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (O.D₆₀₀) de 0.3-0.4. Una vez alcanzada dicha O.D, los cultivos se centrifugaron a 3500 RPM, durante 10 minutos y a 4°C. A partir de este momento, las células y todo el material empleado se conservaron siempre en hielo. Terminada la centrifugación, se descartó el sobrenadante de cada uno de los cultivos. Los pellets se lavaron con 100 mL de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.1 M agregados de a 20 mL y con agitación suave, hasta que se lograron resuspendieron de la misma manera que en el paso anterior y se incubaron durante 1 hora en hielo. *A posteriori* se realizó una tercera centrifugación en las condiciones ya mencionadas. Los pellets resultantes de la misma se resuspendieron en 3 mL de CaCl₂ 0.1 M con glicerol al 20%. Por último, se fraccionó en alícuotas de 200 μ L en eppendorfs pre-enfriados y se almacenaron a -80°C. De esta manera, se generó un stock de células quimiocompetentes de dos cepas de *E. coli*: *BL21 y DH5* α .

Transformación de células quimiocompetentes con ADN plasmídico

Se dejaron descongelar dos alícuotas de las células quimiocompetentes generadas anteriormente: una correspondiente a la cepa *BL21*, y la otra a *DH5* α , durante 30 minutos en hielo. Una vez que se descongelaron las alícuotas, se les agregó el ADN (1-5 µL) y se incubaron por un lapso de 15 minutos en hielo. Cumplido el tiempo, se retiraron del hielo y se incubaron en un baño termostatizado a 42°C durante exactamente 90 segundos, seguido de una incubación de 2 minutos, en hielo. A continuación,

se agregaron 500 μL de LB a cada eppendorf y se incubaron durante 50 minutos a 37°C con agitación constante. En última instancia, se plaquearon 200 μL de cada cepa de células transformadas en placas con LB-agar y ampicilina 100 μg/mL (concentración final), y se dejaron en estufa a 37°C durante toda la noche.

Como se puede ver, a ambas cepas se les realizó el mismo tratamiento; la diferencia radica en su uso posterior: las células de *E. coli BL21* transformadas con el ADN plasmídico de interés fueron empleadas para la preparación de crioinóculos bacterianos a partir de los cuales se produjeron las diferentes proteínas empleadas en este trabajo, mientras que las células de *E.coli DH5α* transformadas se utilizaron para amplificar el ADN plasmídico con el que se transformaron, y así poder contar con un stock del mismo.

Preparación de crioinóculos bacterianos

A partir de las placas con *E. coli BL21* transformadas previamente, se aislaron colonias y se inocularon en 50 mL de LB (contenidos en un matraz de 250 mL), dejándolas crecer durante toda la noche a 37°C, con agitación constante. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3500 RPM por un tiempo de 10 minutos y a 4°C. Acto seguido, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en glicerol al 50% (concentración final). Por último, se fraccionó en alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -80°C.

Realización de mini-preparaciones de ADN plasmídico

A partir de las placas con *E. coli DH5* α transformadas previamente, se realizó un pre-cultivo en 3 mL de LB y ampicilina 100 µg/mL (concentración final), dejándose crecer durante toda la noche a 37°C, con agitación permanente. Una vez transcurridas las 16-18 horas de incubación, se realizaron 2 centrifugaciones consecutivas a 12000 RPM durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió el pellet en 200 µL de Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8. Seguidamente, se agregaron 5 µL de RNAsa 10 mg/mL, y 200 µL de NaOH 200 mM, SDS 1%. Se mezcló por inversión suavemente, y se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 µL de acetato de potasio 3 M, pH 4.8 (frío), se mezcló por inversión y se dejó durante 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó 15 minutos a 12000 RPM. Se recuperó la fase acuosa superior (se trasvasó a otro eppendorf) y se agregaron 0.6

volúmenes de isopropanol. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 20 minutos a 12000 RPM. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de EtOH al 70%. Se hizo una última centrifugación de 5 minutos a 12000 RPM, se descartó el sobrenadante y se sacó cualquier resto de EtOH con pipeta. Se dejó secar el pellet (casi imperceptible visualmente) bajo lámpara y se resuspendió en 35 µL de agua miliQ.

Expresión y purificación de Tsa1

La expresión tanto de Tsa1 salvaje como de las mutantes se realizó a partir de los crioinóculos preparados según el procedimiento ya descrito. Se trasladaron células transformadas desde el crioinóculo con ayuda de una micropipeta y se depositó el tip en 10 mL de medio LB (contenidos en un matraz de 50 mL) con una concentración final de carbenicilina igual a 100 μ g/mL. Dichas células se dejaron crecer toda la noche (16-18 horas aproximadamente) a 37°C con agitación permanente. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó el cambio de escala y se trasvasaron esos 10 mL a un 1 L de LB (contenidos en un matraz de 5 L) con una concentración final de ampicilina igual a 100 μ g/mL. Se incubó alrededor de 4 horas a 37°C con agitación, hasta que el medio alcanzó una O.D₆₀₀ de 0.6-0.8. Se indujo con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) 1 M y se incubó por otras 4 horas en las mismas condiciones. Posteriormente se centrifugó a 5000 g, 20 minutos, 4°C, y se resuspendió el pellet con PBS 1X, pH 7.4. A continuación se realizó una segunda centrifugación, esta vez a 10000 g, 10 minutos, 4°C. Se masó el pellet y se lo almacenó en freezer.

Para la purificación del pellet obtenido, se agregaron 5 mL de buffer de unión (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8) por gramo del mismo, se resuspendió y se adicionaron los inhibidores de proteasas (50 µM fluoruro de fenilmetilsulfonilo –PMSF–, y 1 mg/mL lisozima, concentraciones finales). Luego se procedió a su agitación con ultrasonido (30 segundos ON, 15 segundos OFF, amplitud 40%), hasta que se logró una mezcla traslúcida, y se centrifugó a 10000 g, 2 horas, 4°C. Se conservó el sobrenadante, y se realizó una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), en dos columnas colocadas en serie de 1 mL cada una (*HisTrap* GE Healthcare), a un flujo de 1 mL/min. Las columnas fueron previamente equilibradas con agua destilada y buffer de unión (8 volúmenes cada vez). La proteína contenida en el sobrenadante se vio inmovilizada a la matriz de la columna debido a la afinidad entre los residuos de histidina y el níquel presente en la

matriz. La elución de la proteína se llevó a cabo en un cromatógrafo Äkta Prime FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*), utilizando el buffer adecuado (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8). Previo a la elución se dejaron pasar 20 mL aproximadamente del amortiguador de unión y luego se aplicó un gradiente de 40 mL, 100% buffer de elución. En ese volumen de buffer la proteína eluyó, y se recogió en fracciones de 4 mL, a un flujo de 1.2 mL/min. La presión que se empleó en el cromatógrafo fue de 0.3 MPa. Se colectaron los tubos en los que salió la proteína y se dejó dializando toda la noche contra buffer fosfato 10 mM y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 100 μ M, pH 7.4.

La presencia de proteína se confirmó mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Se sembró la muestra proteica y todas las muestras que se recolectaron durante la expresión y purificación, para corroborar que no se perdió proteína en ninguna de las etapas del proceso.

La mezcla de siembra constó de 75 μL de muestra y 25 μL de buffer de carga (con βmercaptoetanol y SDS). El volumen sembrado fue de 15 μL para cada mezcla y 5 μL en el caso del marcador de peso molecular, cuyo rango iba desde 11 kDa hasta 170 kDa. La corrida electroforética se realizó a 200 V, por aproximadamente 45 minutos. La tinción del gel se llevó a cabo con azul de Coomasie.

Soluciones amortiguadoras

En los diferentes experimentos se emplearon soluciones buffers que fueron recurrentes. A continuación se detalla la composición de las mismas.

Reactivo	ТА	ТАМ	F	
Tris	1.2	30	-	Concentraciones
Ácido acético	0.9	15	-	
Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES)	-	15	-	
DTPA	-	0.1	0.2	en mM
NaCl	-	120	-	
Na ₂ HPO ₄	-	-	100	
pН	7.4	7	7	

Tabla 2. Soluciones amortiguadoras. Tris-Acético (TA); Tris-Acético-MES (TAM); Fosfato (F).

Reducción de la proteína

Tanto la reacción de alquilación con mBBr, como la reacción con H₂O₂ requerían de la proteína en su estado reducido. Para ello, se incubó la misma con ditiotreitol (DTT) en exceso (generalmente 10x) durante aproximadamente 1 hora, a temperatura ambiente. El excedente de reductor se separó en un cromatógrafo Äkta Prime FPLC utilizando una columna de gel filtración (*HiTrap Desalting* GE Healthcare) previamente equilibrada con el buffer Tris – Acético descrito en la **Tabla 2**, o bien con una columna PD-10 equilibrada con el mismo amortiguador.

Cuantificación de proteína y tioles proteicos

La concentración de Tsa1 reducida se determinó mediante absorbancia a 280 nm (ε = 23950 M⁻¹ cm⁻¹) [83], mientras que los tioles proteicos se midieron por medio de la reacción con 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy) que produce 4-tiopiridona (TPy), la cual absorbe a 324nm (ε_{TPy} = 21400 M⁻¹ cm⁻¹) [84] (*Figura* **11**). Ambas determinaciones se realizaron en un espectrofotómetro Cary 50.



Figura 11. Reacción general entre el grupo tiol y DTDPy.

Determinación de la constante de acidez de Cys47

El pKa de la cisteína peroxidática tanto en la proteína salvaje como en las mutantes se determinó mediante la medida de las pendientes iniciales para la reacción con mBBr, a diferentes valores de pH [85]. El producto de alquilación de esta reacción (*Figura 12*) fluoresce (λ_{exc} = 396 nm, λ_{em} = 475 nm), lo que permite seguir su aparición en el tiempo.



Figura 12. Reacción de alquilación de un tiol por mBBr.

La reacción se llevó a cabo en una microplaca de 384 pozos, en el lector de placas Varioskan Flash. La mezcla de reacción constó de proteína previamente reducida, buffer Tris – Acético – MES y HCl o NaOH agregados de manera tal de obtener 16 condiciones de pH (*Tabla 3*); cada una de estas condiciones de reacción se realizó por cuadriplicado. La solución amortiguadora utilizada permitió mantener constante la fuerza iónica (0.15 M) en todo el intervalo de pH.

El agregado de mBBr desde el inyector del lector de placas fue el disparador de la reacción.

Se registró en forma simultánea la fluorescencia para cada pH, a una temperatura controlada de (25 <u>+</u> 1) °C.
Tabla 3. Representación esquemática de las condiciones de ensayo con mBBr. Las concentraciones especificadas en la tabla corresponden a la concentración final en 100 μL de mezcla. El agregado de HCl 60/70 mM o NaOH 70 mM permitió la obtención de valores de pH entre 2 y 9. El degradé indica la variación en el volumen agregado: la coloración más oscura corresponde a volúmenes mayores, la más clara se debe a volúmenes menores.

Pozo	A	В	С	D	E	F	G	Н	1	J	K	L	М	N	0	P
Tsa1	4 μM				2 μΜ											
Buffer	30 mM															
HCI 70	(+	-)			(-)										
HCI 60			(+)				(-)	(-)								
NaOH 70	(-)			(-)							(+)					
H ₂ O	с.s.р 100 µL															
mBBr	2 μΜ					1 μΜ										
pН	2 []				7	[]				9						

La pendiente inicial de los cursos temporales es directamente proporcional a la velocidad inicial de la reacción (*Figura 13*). Estos valores fueron normalizados teniendo en cuenta las concentraciones iniciales de tiol reducido y mBBr. Hecho esto, se procedió a graficar *pendiente normalizada en función de pH* y se ajustó a una ecuación con dos constantes de ionización (*Ecuación 1*).



Figura 13. Curso temporal para la reacción de alquilación con mBBr. Como se puede apreciar en la figura, se siguió la formación del producto en el tiempo mediante el registro del aumento en la emisión a 475 nm.

El tramo inicial de cada uno de los cursos temporales se ajustó a una recta cuya pendiente es directamente proporcional a la velocidad inicial de la reacción, para cada pH ensayado.

$$Pend. = \frac{a_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1}$$
Ecuación 1

Donde a_1 , a_2 y a_3 son parámetros de ajuste para las formas totalmente protonada, con un protón y totalmente desprotonada, respectivamente. K_{a_2} y K_{a_2} son las constantes de acidez para cada cisteína.

Otra forma en la que se determinó el pKa para la cisteína peroxidática fue siguiendo la caída en la emisión de Trp luego del agregado de ácido clorhídrico. Esta reacción se llevó a cabo en cubeta de cuarzo, en un fluorímetro Cary Eclipse. La concentración de proteína reducida fue de 2 µM final, y el buffer de reacción utilizado fue Tris-Acético-MES.

Se hicieron adiciones de HCl 150 µM (concentración en la cubeta), y se registró el espectro de emisión entre 300-450 nm, luego de cada adición. De esta manera, se obtuvo un espectro para cada pH, cuyo máximo de emisión se ubicó alrededor de 340 nm.

Se graficó la intensidad de cada máximo en función del pH, y se ajustó a la *Ecuación 2* para obtener el valor de pKa correspondiente.

$$Pend. = \frac{a_1[H^+] + a_2 K_{a1}}{[H^+] + K_{a1}}$$

Determinación de la constante de velocidad para la reacción entre Cys47 y mBBr

La reacción entre Tsa1 y mBBr se llevó a cabo en condiciones de pseudo primer orden con exceso de mBBr a un pH de aproximadamente 7 y una temperatura de $(25 \pm 1)^{\circ}$ C; el amortiguador empleado fue Tris-Acético-MES. La reacción se realizó en microplaca de 384 pozos, en el lector de placas Varioskan Flash. Se establecieron 6 concentraciones distintas de mBBr (o – 120 µM, aproximadamente), mientras que la concentración de Tsa1 se mantuvo siempre constante (2 µM).

Se siguió la caída en la emisión de triptófano a 340 nm, debida a la transferencia de energía de resonancia de Förster (*FRET*, del inglés Förster Resonance Energy Transfer) entre dicho residuo y la cisteína alquilada con mBBr (*Figura 14*). Los gráficos de *fluorescencia en función del tiempo* se ajustaron a una función de primer orden (*Ecuación 3*), o primer orden más recta (*Ecuación 4*).



Figura 14. Transferencia de energía de Förster entre Trp y el producto de alquilación con mBBr. La transferencia de energía requiere cierta proximidad entre dos fluoróforos, uno donante de energía y otro aceptor. En el caso de Tsa1, el FRET entre Trp (donante) y la cisteína alquilada con mBBr (aceptor) es posible debido a que ambas cisteínas, tanto la peroxidática como la resolutiva, presentan triptófanos cercanos. Las longitudes de onda para el Trp son: λ exc = 280 nm, λ em = 340 nm, y para el producto de alquilación con mBBr: λ exc = 396 nm, λ em = 475 nm. La disminución en la emisión a 340 nm (donante) se da por un solapamiento con el espectro de excitación del aceptor. Hay una transferencia directa de energía que redunda en un efecto de *quenching* del primero.

$$F = Amp(e^{-k_{obs}t}) + Finf$$

$$F = Amp(e^{-k_{obs}t}) + Finf + bt$$

Ecuación 3

Ecuación 4

Donde *F* es emisión de fluorescencia a 340nm, *Amp* es la diferencia entre la fluorescencia final y la inicial, k_{obs} es la constante de velocidad observada para la reacción entre la proteína y el mBBr, *t* es el tiempo, F_{inf} es la fluorescencia a tiempo final y *b* es un parámetro de ajuste lineal que considera la desaparición del fluoróforo, que si bien es un proceso lento, ocurre [85].

Una vez que se obtuvieron las diferentes constantes observadas para cada condición ensayada, se graficó k_{obs} versus [mBBr], y se ajustó a una recta cuya pendiente es la constante de segundo orden para la reacción en estudio (**Ecuación 5**).

$$k_{obs} = k_2[mBBr]$$

Donde *k*² corresponde a la constante de velocidad aparente de segundo orden al pH estudiado.

Teniendo en cuenta el perfil de pH obtenido según lo descrito en la sección anterior, se pudo determinar un factor de proporcionalidad (*Figura 15*) que permitió obtener las constantes de velocidad de segundo orden independientes de pH, a partir del ajuste a la *Ecuación 1* del gráfico mostrado en el panel 4 de la *Figura 15*.



Figura 15. Obtención de las constantes independientes de pH. (1) La interpolación del pH experimental (*x*) en el perfil de pH obtenido para el cálculo de pKa, permitió hallar el valor equivalente a la pendiente en las condiciones del experimento (p_x). (2) Cálculo del factor de proporcionalidad (FP) como k_x/p_x , donde k_z es la constante aparente que se obtuvo a partir de la *Ecuación 5.* (3) Obtención de las k_{app} para diferentes pHs: $k_{app} = p_i(FP)$, donde p_i es la pendiente para cada valor de pH. (4) Gráfico de k_{app} en función de pH.

En este caso, a_1 , a_2 y a_3 cobran significado; a_1 es la constante de velocidad de segundo orden independiente de pH para la especie totalmente protonada (ambas cisteínas en forma de tiol), a_2 es la constante para la especie con una cisteína en forma de tiolato, y a_3 es la constante para la especie con ambas cisteínas en su forma desprotonada.

Así, a partir de este ajuste se obtuvieron las constantes de velocidad independientes de pH para cada cisteína.

La concentración real de monobromobimano en estos experimentos se determinó mediante su absorbancia a 396 nm (ϵ = 5300 M⁻¹cm⁻¹).

Determinación de la constante de velocidad para la reacción entre Cys47 y H₂O₂

La constante de segundo orden para la reacción entre Tsa1 y H₂O₂ se determinó por medio de dos metodologías diferentes: (1) competencia con peroxidasa de rábano (HRP), siguiendo su oxidación por medio de la absorbancia a 403 nm [26], y (2) emisión de triptófano a 340 nm en condiciones de pseudo primer orden (con exceso del peróxido) [86]. La primera fue utilizada en el caso de Tsa1 wt, ya que con la otra metodología no se detectaron cambios en la fluorescencia.

La competencia entre HRP y Tsa1 por el sustrato peróxido se realizó manteniendo constante la concentración de peroxidasa (5.5 μ M), y aumentando la concentración de Tsa1 (o - 8.5 μ M). La concentración de peróxido también se mantuvo constante (2 μ M). Se empleó amortiguador Fosfato.

Se siguió la oxidación de HRP mediante caída en la absorbancia a 403 nm en un espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SX20. A partir de los gráficos de A_{403} versus tiempo se calculó un Δ Abs, teniendo en cuenta los valores de absorbancia a tiempo cero, y a tiempo final, para cada concentración de Tsa1. Posteriormente, se calculó el factor de inhibición para cada una de estas concentraciones, según se indica en la **Ecuación 6**.

Ecuación 6

$$F = (\varDelta \overline{Abs_0} - \varDelta Abs_n) / \varDelta \overline{Abs_0}$$

Donde $\Delta \overline{Abs_0}$ (promedio de diez corridas) es el ΔAbs en ausencia de Tsa1, y ΔAbs_n es el ΔAbs para cada concentración de Tsa1.

Teniendo en cuenta este factor de inhibición, la concentración de peroxidasa y la constante de velocidad para la reacción entre HRP y H₂O₂, se calculó una constante de velocidad observada para la reacción entre Tsa1 y el peróxido (*Ecuación 7*) [26].

Ecuación 7

$$k_{obs} = \left(\frac{F}{1-F}\right) k_{HRP} [HRP]$$

Donde k_{obs} es la constante de velocidad observada para la reacción entre Tsa1 y H₂O₂, el término [F/(1-F)] considera la competencia entre ambas proteínas por el peróxido, y la constante de velocidad para HRP es de 1.7 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹ [26].

Con los valores obtenidos a partir de la *Ecuación 7*, se graficó *constante de velocidad observada en función de la concentración de Tsa*1. La pendiente de la recta resultante corresponde a la *constante de velocidad de segundo orden* para la reacción entre la peroxirredoxina y el peróxido (*Ecuación 8*).

$$k_{obs} = k_2[Tsa1]$$

Ecuación 8

La reacción entre Tsa1 y H₂O₂ en condiciones de pseudo primer se llevó a cabo tanto en el espectrofotómetro de flujo detenido Applied Photophysics SX20 como en el lector de placas Varioskan Flash. El primero de los equipos permitió determinar la constante de velocidad para Tsa1 T44A, mientras que el segundo equipo se utilizó para medir la constante de velocidad de Tsa1 R123G.

Se siguió la oxidación de la proteína por caída en la emisión del triptófano a 340 nm. La concentración de proteína se mantuvo constante (1 – 2 μ M), y se fue variando la concentración de H₂O₂ (o – 300 μ M). El buffer utilizado fue Tris-Acético-MES. La temperatura a la cual transcurrió la reacción fue de (25 ± 1) °C.

Los cursos temporales a 340 nm obtenidos de los experimentos realizados en el espectrofotómetro de flujo detenido mostraron un comportamiento bifásico, por lo que se ajustaron a una ecuación que considera una doble exponencial (*Ecuación g*) o una doble exponencial más recta (*Ecuación 10*).

$$F = F_{inf} + Amp_1(e^{-k_1 t}) + Amp_2(e^{-k_2 t})$$

Ecuación 9

$$F = F_{inf} + Amp_1(e^{-k_1 t}) + Amp_2(e^{-k_2 t}) + bt$$

Donde *F* es la emisión de fluorescencia a 340 nm, F_{inf} es la fluorescencia a tiempo final, Amp₁ y k_1 son el ΔF y la constante de velocidad de segundo orden, respectivamente, para una de las poblaciones de datos, Amp₂ y k_2 son sus análogas para otra población de datos, y *b* es un parámetro de ajuste lineal para el tramo final de la gráfica.

Los gráficos de *Emisión a 340 nm versus tiempo*, obtenidos en el lector de placas, mostraron ajustarse a una ecuación de primer orden (*Ecuación 3*), o primer orden más recta (*Ecuación 4*).

A partir de los ajustes realizados por medio de las *Ecuaciones* 3, 4, 9 y 10, se hallaron las diferentes constantes observadas para cada concentración de H_2O_2 , y se graficaron en función de dichas concentraciones. El resultado fue una recta cuya pendiente corresponde a la constante de segundo orden para la reacción entre Tsa1 y H_2O_2 (*Ecuación* 11).

$$k_{obs} = k_2 [H_2 O_2]$$

Ecuación 11

En estos experimentos fue preciso conocer la concentración inicial del peróxido, la cual se obtuvo a partir de su absorbancia a 240 nm (ε = 43.6 M⁻¹cm⁻¹).

RESULTADOS

Expresión y purificación de Tsa1

En la *Figura* 16 se muestra el gel correspondiente a la expresión y purificación de Tsa1 *wt* que, tal como se puede apreciar en el carril 6, efectivamente se logró obtener en una concentración considerable. En los siguientes volúmenes eluidos (carriles 8, 10) también se obtuvo proteína pero en menor cantidad. Cabe destacar que a lo largo del proceso de expresión y purificación no hubo pérdidas significativas de muestra proteica (carriles 2-5). Al igual que Tsa1 *wt*, las mutantes T44V, T44A y R123G no mostraron problemas durante su expresión y purificación.



Figura **16**. **Gel de poliacrilamida 15% con las diferentes muestras colectadas durante la expresión y purificación de Tsa1 wt.** <u>Carriles</u>: **(1)** Marcador de peso molecular; **(2)** Antes de inducir con IPTG; **(3)** Sobrenadante de la centrifugación luego de resuspender con PBS **1**X; **(4)** Fracción no unida a las columnas durante *IMAC*; **(5)** Pellet de la centrifugación luego de agitación con ultrasonido; **(6)** Primeros 4 mL eluidos de IMAC; **(7)** Sin sembrar; **(8)** Siguientes 4 mL eluidos de IMAC; **(9)** Sin sembrar; **(10)** Últimos 4 mL eluidos de IMAC.

Determinación de la constante de acidez de Cys47 para Tsa1 wt, T44V, T44A y R123G

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las constantes de acidez de las diferentes proteínas, a partir de su reacción con mBBr. En todos los casos los perfiles de pH mostraron dos etapas, por lo que se ajustaron a la *Ecuación* 1. Este comportamiento puede atribuirse a la alquilación de la cisteína peroxidática (Cys47) y de la cisteína resolutiva (Cys170), respectivamente.



Figura 17. Perfil de pH para la velocidad de alquilación de Tsa1 con mBBr. Las pendientes iniciales se normalizaron teniendo en cuenta la concentración inicial de Tsa1 y mBBr. Valores del mejor ajuste: A) *WT*: *pKa1* 5.6 ± 0.2; *pKa2* 8.2 ± 0.2; *a1* 0; *a2* (1.3 ± 0.3) × 10⁻⁴; *a3* (2.7 ± 0.8) × 10⁻⁴. B) *T44V*: *pKa1* 5.1 ± 0.2; *pKa2* 7.8 ± 0.1; *a1* 0; *a2* (1.0 ± 0.2) × 10⁻⁴; *a3* (2.7 ± 0.2) × 10⁻³. C) *T44A*: *pKa1* 4.9 ± 0.1; *pKa2* 7.9 ± 0.1; *a1* 0; *a2* (3.9 ± 0.5) × 10⁻⁵; *a3* (6.0 ± 0.7) × 10⁻³. D) *R123G*: *pKa1* 5.5 ± 0.3; *pKa2* 8.4 ± 0.8; *a1* 0; *a2* (2 ± 1) × 10⁻⁴; *a3* (2 ± 2) × 10⁻².

Tabla 4. Valores promedio de pKas obtenidos para las diferentes proteínas mediante la reacción de alquilación con mBBr.

Tsaı	рКаı	Intervalo de pKa1	pKa2	RSH/Proteína (%)	n	Valores reportados
wild type	5.7 <u>+</u> 0.2	5.5-5.9	8.2 <u>+</u> 0.2	85-95	3	5.4 [26]
T44V	4.4 <u>+</u> 0.6	4.0-5.1	7.8 <u>+</u> 0.4	80-100	4	-
T44A	5.6 <u>+</u> 0.4	5.3-5.9	7.5 <u>+</u> 0.2	95-100	3	-
R123G	4.9 <u>+</u> 0.5	4.2-5.5	8.2 <u>+</u> 0.4	80-90	3	-

El pKa de la Cys47 también se obtuvo siguiendo el máximo de emisión de triptófano (Figura 18).



Figura 18. Perfil de pH para la titulación de Tsa1 con HCl. En todos los casos el agregado de ácido clorhídrico resultó en una disminución del máximo de emisión, así como en un leve corrimiento a longitudes de onda menores. Los perfiles de pH en A y C mostraron un comportamiento sigmoideo, por lo que se ajustaron a la *Ecuación 1*. Los perfiles de pH en B y D se ajustaron a la *Ecuación 2*. Valores del mejor ajuste para el pKa de la cisteína peroxidática: A) *WT: pKa* 5.50 ± 0.03; B) *T44V: pKa* 4.07 ± 0.06; C) *T44A: pKa* 5.91 ± 0.03; D) *R123G: pKa* 4.0 ± 0.1.

Claramente se puede apreciar una disminución en el máximo de emisión de Trp, así como un corrimiento menor hacia el azul luego de cada adición de ácido clorhídrico en todas las proteínas. Es preciso señalar que una vez concluido el experimento tanto en el caso de T44A como R123G, se procedió al agregado de Tris de manera tal de volver a las condiciones iniciales de pH. Contrario a lo que se esperaba, el aumento de pH no condujo a una mayor emisión del Trp, lo que da la pauta de que el proceso y/o cambio que está teniendo lugar es irreversible.

Para verificar este hecho puntual, se llevó a cabo un experimento en el que se fue agregando NaOH en lugar de HCI. Efectivamente, el máximo de emisión del triptófano disminuyó tras la adición de hidróxido; la única diferencia observada respecto al experimento con HCI fue un corrimiento del máximo hacia el rojo. Las dos proteínas ensayadas en esta oportunidad fueron las mutantes T44A y R123G. Para T44A el pKa de su cisteína peroxidática fue de 3.9 ± 0.1, unos puntos por debajo del valor obtenido anteriormente pero muy similar al pKa de la variante T44V. Para R123G el pKa fue de 4.2 ± 0.1, prácticamente igual al hallado en experimentos previos.

Determinación de la nucleofilia de Cys47 para Tsa1 wt, T44V, T44A y R123G

La *Figura 19* muestra los cursos temporales y las constantes de velocidad observadas para la reacción entre Tsa1 y mBBr en condiciones de pseudo primer orden, con exceso de mBBr.

La caída en la emisión a 340 nm se debe a la transferencia de energía desde el triptófano a la cisteína alquilada con mBBr.



Figura 19. Caída en la emisión de Trp a 340 nm debido a FRET con mBBr y constante de velocidad observada para la reacción de alquilación. Valores del mejor ajuste: **A)** *WT:* k_2 (pH 7.04) 60 ± 2 M⁻¹s⁻¹. **B)** *T*44*V:* k_2 (pH 7.05) 37 ± 4 M⁻¹s⁻¹. **C)** *T*44*A:* k_2 (pH 6.86) 48 ± 1 M⁻¹s⁻¹. **D)** *R*123*G:* k_2 (pH 7.05) 26 ± 3 M⁻¹s⁻¹.



Figura 20. Determinación de nucleofilia para Tsa1. En todos los casos los gráficos de k_{app} versus *pH* se ajustaron a la *Ecuación 2.* Valores del mejor ajuste: **A)** *WT*: *a*1 o; *a*2 (29 ± 8) M⁻¹s⁻¹; *a*3 (6 ± 2) × 10² M⁻¹s⁻¹. **B)** *T*44*V*: *a*1 o; *a*2 (7 ± 2) M⁻¹s⁻¹; *a*3 (1.9 ± 0.1) 10² M⁻¹s⁻¹. **C)** *T*44*A*: *a*1 o; *a*2 (4.1 ± 0.5) M⁻¹s⁻¹; *a*3 (6.3 ± 0.7) × 10² M⁻¹s⁻¹. **D)** *R*123*G*: *a*1 o; *a*2 (5 ± 3) M⁻¹s⁻¹; *a*3 (5 ± 7) × 10² M⁻¹s⁻¹.

En la **Tabla 5**, se puede observar que la nucleofilia de la Cys47 fue ligeramente menor en el caso de las mutantes, mientras que la segunda cisteína (Cys170) no presentó diferencias significativas entre las distintas proteínas. Esto queda reflejado en la **Figura 20**, donde los gráficos de k_{app} versus pH presentan mucha similitud entre sí.

Tabla 5. Promedio de constantes de velocidad de segundo orden independientes de pH para la reacción entre Tsa1 y mBBr. *a2* corresponde a la constante para la reacción de Cys47 con mBBr, y *a*3 es la constante para la reacción de ambas cisteínas (Cys47 y Cys170).

Tsaı	α2 (M ⁻¹ s ⁻¹)	Intervalo de α2 (M ⁻¹ s ⁻¹)	α3 Μ⁻¹s⁻¹	n
wild type	24 <u>+</u> 7	18-29	500 <u>+</u> 100	2
T44V	8 <u>+</u> 2	7-8	200 <u>+</u> 20	2
T44A	4.1 <u>+</u> 0.5	-	630 <u>+</u> 70	1
R123G	6 <u>+</u> 4	5-7	500 <u>+</u> 800	3

Determinación de la reactividad de Cys47 para Tsa1 wt, T44A y R123G, ante H2O2

Los gráficos a partir de los que se obtuvieron las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción entre Cys47 de las diferentes proteínas y H₂O₂, se muestran en la *Figura 21*.



Figura 21. Constante de segundo orden para la reacción entre Tsa1 y H_2O_2 . Valores del mejor ajuste: A) *WT*: k_{obs} (5 ± 1) x 10⁶ M⁻¹s⁻¹. B) *T44A*: k_{obs} (1.6 ± 0.8) x 10⁵ M⁻¹s⁻¹. C) *R123G*: k_{obs} (1.5 ± 0.1) M⁻¹s⁻¹. Para Tsa1 *wt*, la constante de velocidad observada {(F/(1-F))k_{HRP}[HRP]} fue determinada mediante ensayo de competencia con HRP. En los tres casos, se trabajó a pH 7.

Tsaı	<i>k</i> 2 (M⁻¹s⁻¹) pH 7	Intervalo de <i>k2</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)	n	Valores reportados (M ⁻¹ s ⁻¹)
Wild Type	(5 <u>+</u> 1) × 10 ⁶	-	1	2.2 x 10 ⁷ [26]
T44A	(1.7 <u>+</u> 0.5) X 10 ⁵	(1.6-1.8) x 10 ⁵	2	-
R123G	1.1 <u>+</u> 0.1	0.7-1.5	2	-

Tabla 6. Promedio de constantes de velocidad para la reacción entre Tsa1 y H₂O₂.

DISCUSIÓN

Determinación de las constantes de acidez

De acuerdo a lo mostrado en la **Tabla 4** el pKa para la Cys47 en Tsa1 *wild type* fue de 5.7 \pm 0.2, lo que concuerda con el valor reportado en la literatura [26]. Por su parte, la Cys170 mostró un pKa de 8.2 \pm 0.2.

El hecho de que el pKa de la cisteína peroxidática sea menor a 7, significa que a pH neutro dicho residuo se encontrará mayoritariamente en su forma desprotonada; en el caso de la Cys170 como su pKa está por encima de 7, la especie predominante será el tiol. Debido a que la Cys47 se encuentra en un 95% como tiolato, y la Cys170 únicamente en un 6%, sería razonable pensar que a pH neutro la cisteína peroxidática será más reactiva que la resolutiva frente a un electrófilo inespecífico como mBBr. No obstante, el razonamiento no es tan lineal como parece. Teniendo en cuenta estos porcentajes y la constante independiente de pH para cada cisteína (Tabla 5) se puede calcular la constante de velocidad aparente a pH 7 para cada residuo, cuya suma debería dar muy similar a la k_{apa} medida a ese pH (*Figura 19*, panel A). Así, para Cys47 se tiene una constante de 23 M⁻¹s⁻¹ y para Cys170 de 29 M⁻¹s⁻¹. Pese a encontrarse mayoritariamente en su forma desprotonada, la Cys47 presenta una contribución levemente menor a la k_{app} que la Cys170; esto se debe a que la nucleofilia de cada una de ellas en una reacción inespecífica también depende del pKa, de acuerdo a la relación de Brønsted (Figura 23). De esta manera, la Cys170 presenta una nucleofilia mayor a la Cys47 en la reacción con mBBr, pero cuando la reacción es la específica de la enzima (por ejemplo, con H₂O₂) la Cys47 es mucho más reactiva, y esto se debe a la reactividad específica que presenta la cisteína peroxidática hacia dicho peróxido.

Como se dijo con anterioridad, la Cys47 está acompañada por otros dos aminoácidos con los que forma la triada catalítica: Thr44 y Arg123. Ambos residuos se han descrito como los encargados de aumentar la acidez de la cisteína reactiva por medio de la estabilización de la especie desprotonada a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno [74].

Por otro lado, la Cys170 presenta un residuo de leucina (Leu168), otro de prolina (Pro169) y una asparagina (Asn171) cercanos en la estructura cuaternaria; los tres residuos son neutros, por lo que resulta lógico que la acidez de dicha cisteína no se vea afectada por interacciones polares como en el caso de la cisteína peroxidática.

En la *Figura* **17** (panel B) se puede ver el perfil de pH para una de las mutantes en treonina, T44V. Según lo antedicho, se esperaría que una mutación en ese residuo se reflejara en un aumento del pKa de la cisteína catalítica, sin embargo, no fue así. El pKa de la Cys47 fue de 4.4 ± 0.6, 1.3 unidades por debajo de lo visto en *wild type*. Un descenso similar se vio para la misma mutación en PRDX5 humana [87], lo que dejaría entrever que el residuo de treonina no estaría influyendo en la acidez de la Cys47, no sólo en el caso de Tsa1 sino que también en otras peroxirredoxinas.

Tal como se muestra en la *Figura 6*, el grupo hidroxilo presente en el residuo de treonina interacciona directamente con el tiolato de la cisteína catalítica y ayuda a su estabilización; esta interacción es posible debido a la proximidad entre ambos residuos (3.0 Å) [69]. En T44V, el residuo de treonina fue mutado por valina, la cual carece de ese grupo –OH. Pese a esto, la mutación no reflejó cambios en la acidez de la Cys47, lo que lleva a pensar en que hay algo más en el entorno de dicha cisteína que permite la estabilización de su forma desprotonada. Es preciso mencionar, que en la posición 49 hay otro residuo de treonina (*Figura 22*), cercano espacialmente a la Cys47, y quizás no sea la Thr44 la responsable del bajo pKa de esta cisteína sino que sea la Thr49. También cabe la posibilidad de que en Tsa1 la ausencia de la treonina 44 produzca un rearreglo en la red de interacciones de hidrógeno y Thr49 establezca estos nuevos enlaces con Cys47.

Respecto al pKa de la Cys170, esta mutante no presentó cambios significativos respecto a la proteína salvaje tal como se esperaba, ya que la mutación realizada no se encuentra en el entorno inmediato de este residuo.



Figura 22. Estructura del sitio activo de Tsan C47S. Como se puede apreciar, la treonina 49 se encuentra cercana a la cisteína catalítica. Código de colores: verde – carbono; rojo – oxígeno; azul – nitrógeno. La imagen fue obtenida con el programa *PyMOL*, a partir de la estructura presente en *Protein Data Bank*, PDB ID: 3SBC.

La otra mutante en treonina, T44A, presentó un comportamiento similar al de T44V (Figura 17, panel C). El pKa para la Cys47 en esta proteína fue de 5.6 + 0.4, lo que confirmaría que la Thr44 no sería responsable del pKa de dicha cisteína, o al menos, su ausencia no afectaría este parámetro. Lo mismo fue observado por el grupo de Luis Eduardo Soares Netto, quien ha colaborado activamente en la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo. Asimismo, también plantean cierta relación entre el estado de oligomerización y la presencia de treonina en la posición 44; los resultados que obtuvieron por cromatografía de gel filtración muestran que cuando dicha treonina se sustituye por valina, Tsa1 se encuentra principalmente como dímero, mientras que cuando se muta por serina la estructura predominante es un decámero. Esto concuerda con el hecho de que en Tsa2 (homóloga a Tsa1 con un 96% de identidad en la secuencia aminoacídica) hay una serina en lugar de la treonina conservada, y siempre migra como decámero sin importar su estado de oxidación. En la forma reducida de Tsa1, el decámero es estabilizado por interacciones polares y apolares entre cada interfase dímero-dímero. Según el análisis de superficie que realizó este grupo, el sitio activo de Tsa1 se encuentra en la interfase formada entre dos dímeros consecutivos del decámero; la Thr44 se encuentra en esta interfase estableciendo enlaces de hidrógeno con la Cys47 por un lado, e interacciones hidrofóbicas con el anillo aromático de la Tyr77 del dímero adyacente por lo que su ausencia desestabilizaría la estructura decamérica.

Por último, en el panel D de la *Figura 17* se muestra el perfil de pH para la mutante en arginina, R123G. El pKa para la Cys47 de esta proteína fue de 4.9 <u>+</u> 0.5.

De acuerdo a lo encontrado en la bibliografía [51], y a experiencias anteriores del grupo de laboratorio con otras peroxirredoxinas [84], se esperaba que al sustituir la arginina por una glicina el pKa de la Cys47 aumentara. Este aumento vendría dado por la ausencia de la carga positiva proveniente del grupo guanidinio de la Arg ya que esta carga es la responsable, en mayor medida, de la acidez de la cisteína reactiva [88].

No obstante, los resultados obtenidos muestran que la mutación de dicho residuo no estaría afectando el valor de pKa de la Cys47.

A diferencia de lo que podría estar sucediendo con el residuo de Thr44, donde la presencia de otra treonina en la posición 49 podría explicar el comportamiento observado en T44V y T44A, la existencia de una arginina cercana al sitio activo (Arg146) no explicaría lo sucedido con la mutante R123G. El residuo de arginina en la posición 146 se encuentra conservado en varias subfamilias (AhpC/Prx1, Prx6 y AhpE); en Tsa1 se encuentra a 8.5 Å de la cisteína peroxidática por lo que no sería factible que estabilizara el tiolato mediante enlaces de hidrógeno. Se cree que la Arg146 podría asistir indirectamente a la Arg123 en adoptar una orientación tal que la posicione cercana al átomo de azufre de la Cys47 y al oxígeno proximal del sustrato peróxido [89], pero no se postula una interacción directa con la cisteína catalítica. Por otra parte, la Arg146 sería importante para la interacción Tsa1-Trx, y regeneración de la enzima activa. Cuando se utiliza DTT como reductor, la actividad peroxidasa de la mutante es igual a *wild type*, mientras que en presencia de Trx la constante de velocidad para la reacción con peróxido es diez veces menor [89].

Sin embargo, el rol de la Arg146 parece no ser siempre el mismo. En Prx2 y Prx3 humanas estaría involucrada directamente en la actividad peroxidática de la cisteína catalítica, al igual que la arginina del sitio activo; la mutación de un residuo de arginina u otro causa la pérdida de 5 órdenes de magnitud y, a su vez, la doble mutante provoca que la cisteína peroxidática se comporte como una cisteína libre, lo que indica cierta cooperación entre ambos residuos de arginina. De esta manera, la Arg146 estaría proporcionando enlaces de hidrógeno adicionales que ayudan a disminuir la barrera de energía de activación del estado de transición, facilitando la ocurrencia de la reacción [90].

Respecto a los valores de pKa obtenidos mediante titulación con HCl, si bien se correspondieron con los hallados por alquilación con mBBr, no queda claro el motivo por el cual unos perfiles muestran comportamiento sigmoideo y otros no; más precisamente, en el caso de las mutantes T44V y R123G, el ajuste de los perfiles de pH a la *Ecuación 2* resultó imposible por lo que se ajustaron a la *Ecuación 1*. No obstante, a diferencia del método con mBBr, en este experimento la determinación de pKa es indirecta ya que se sigue la emisión de triptófano y no la reacción directa con el residuo de cisteína; por tanto no resulta evidente cuál de los dos valores que arroja el ajuste es el correspondiente al pKa de la Cys47.

Determinación de la nucleofilia

Las constantes de velocidad independientes de pH para Cys47 y Cys170 en Tsa1 *wt* fueron de (24 \pm 7) $M^{-1}s^{-1}$ y (500 \pm 100) $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente (*Tabla 5*).

Durante el ciclo catalítico ambas cisteínas participan en ataques nucleofílicos; la Cys47 es la encargada de llevar a cabo el ataque inicial sobre el sustrato, y como resultado de ello se oxida a la forma de ácido cisteín sulfénico. A continuación, la Cys170 de otra subunidad se encarga del ataque a ese sulfénico, formando el disulfuro intermolecular característico de este tipo de peroxirredoxinas.

Las constantes de velocidad obtenidas indican que la cisteína resolutiva presenta una nucleofilia mayor que la cisteína peroxidática. Esto concuerda con lo representado en el gráfico de Brønsted (*Figura 23*), donde claramente se puede ver que a valores de pKa mayores, mayor será la nucleofilia del residuo.

No obstante, la reacción con mBBr permite determinar la nucleofilia intrínseca de ambas cisteínas, lo cual no se corresponde con su reactividad específica que únicamente se manifiesta ante el sustrato correcto.

La mutante T44V no mostró cambios significativos respecto a la proteína salvaje. La constante de velocidad independiente de pH para la Cys47 fue de (8 \pm 2) M⁻¹s⁻¹, y de (200 \pm 20) M⁻¹s⁻¹ para la Cys170.

Según la bibliografía, la red de interacciones que se forman entre los residuos conservados del sitio activo y la cisteína catalítica, no sólo es responsable del bajo pKa de la Cys47, sino que a su vez permite mantener baja la nucleofilia en ausencia de un sustrato específico [74]. Por lo tanto, era de esperar que la mutación en la treonina produjera un aumento en la nucleofilia, y que la constante de velocidad para la reacción con mBBr (sustrato inespecífico) fuera mayor que la constante para *wild type*. Contrariamente, si bien los valores para una y otra proteína no presentan una diferencia considerable, se puede decir que hay una leve disminución de la constante para el caso de la mutante. Dicho esto, el residuo de Thr44 en Tsa1 no participaría en la estabilización de la Cys47 en ausencia de sustrato, o quizás, como se mencionó anteriormente, la presencia de la Thr49 supliría su falta.

En cuanto a la constante de velocidad para la cisteína resolutiva, se observa un valor ligeramente menor (2.5 veces); esta disminución no puede ser asociada directamente a la mutación ya que la Cys170 se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína, lejos del residuo mutado.

Para R123G tampoco se observaron diferencias. Las constantes para Cys47 y Cys17o fueron de $(6 \pm 4) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y (500 \pm 800) $\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. El error asociado a la segunda de las constantes refleja lo que se observa en la *Figura 20* (panel D), donde se puede apreciar que la parte superior del gráfico de *kapp versus pH* no está bien definida; esta situación se mantuvo en las sucesivas repeticiones.

Al igual que lo esperado para la mutación en treonina, la ausencia de arginina debería haber provocado un aumento en la nucleofilia de la Cys47 debido a la falta de una carga positiva que estabilice la especie reactiva (hecho que queda en evidencia en otras peroxirredoxinas) [84]. Sin embargo, en Tsa1 parece no ser así; la arginina tampoco estaría modulando la reactividad de la cisteína peroxidática.

Pese a los resultados obtenidos, si se tiene en cuenta las constantes de velocidad para cada una de las variantes de Tsa1 en su reacción con mBBr, se ve claramente que todas ellas siguen la tendencia mostrada por tioles de bajo peso molecular. Esto resulta coherente con que mBBr es un sustrato inespecífico, y en tal caso, la cisteína peroxidática se tiene que mostrar como cualquier otra cisteína.



Figura 23. Gráfico de Brønsted para la reacción de tioles de bajo peso molecular con mBBr a 25 °C. Ajuste lineal: k = 0.52 pKa - 2.1. Referencia para tioles de bajo peso molecular (■): A: N-acetilcisteína; B: 2mercaptoetanol; C: captopril; D: ácido 2,3dimercaptosuccínico; E: cisteína; F: L-cisteína etil éster; G: glutatión. Las constantes de velocidad independientes de pH para Tsa1 (• Cys47; • Cys170) se incluyen como comparación, pero no se utilizan en la regresión lineal.

Determinación de la reactividad ante H₂O₂

Como se muestra en la **Tabla 6**, la constante de velocidad para la reacción de la Cys47 en Tsa1 *wt* con H_2O_2 fue de $(5 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor es aproximadamente 4 veces menor que el reportado en la literatura $(2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$ [26]. Si bien se optó por esta metodología debido a que no se detectaron cambios en la fluorescencia del triptófano cuando se siguió la caída en su emisión a 340 nm, hay que tener en cuenta que la competencia con HRP es un método más complicado ya que tiene más variables en las que se puede introducir error.

Es preciso hacer notar la diferencia entre el comportamiento de la Cys₄₇ ante un sustrato inespecífico como el mBBr, y ante H_2O_2 . Para la primera de las reacciones se ve claramente que la cisteína peroxidática de la proteína salvaje se comporta como un tiol de bajo peso molecular, mientras que para la reacción con el peróxido se da un apartamiento en 6 órdenes de magnitud respecto a la línea de tendencia (*Figura 24*). Esto ratifica la especificidad de Tsa1 hacia H_2O_2 .

En el caso de T44A la constante de velocidad fue de (1.7 <u>+</u> 0.5) x 10⁵ M⁻¹s⁻¹, aproximadamente 30 veces menor respecto a la proteína salvaje, y 129 veces menor al valor reportado en la literatura [26].

Según la bibliografía, la Thr44 está implicada en el correcto posicionamiento del sustrato para que se dé la reacción de peroxidación [74]. Al no estar dicho residuo, el peróxido no podría posicionarse de manera adecuada, y la eficiencia catalítica de la reacción sería menor, tal como se evidenció en este caso. Más aún, de acuerdo a estudios computacionales recientes en PRDX5 humana, la Thr44 estaría implicada en la modulación de la nucleofilia durante el ingreso del peróxido, activando al tiolato para que se dé el ataque nucleofílico [87].

En PrxQ de Arabidopsis thaliana la treonina conservada en la posición 107 provoca una disminución del 60-90% en la actividad peroxidasa cuando se emplea Trx como reductor, por lo que además de ser importante para la reactividad de la cisteína catalítica, parecería ser importante en la regeneración de la proteína [91].

Por último, la mutante R123G prácticamente no reaccionó frente a H_2O_2 si se la compara con *wild type*. La constante de velocidad en esta proteína fue de (1.1 <u>+</u> 0.1) M⁻¹s⁻¹, 6 órdenes de magnitud menos que la proteína salvaje.

En ausencia de sustrato, la carga positiva del grupo guanidinio presente en la arginina estabiliza el tiolato mediante enlaces de hidrógeno. Cuando se da el acercamiento de un sustrato y su correcto posicionamiento por parte de la Thr44, los enlaces de hidrógeno entre la Arg123 y Cys47 se reordenan desplazándose hacia el peróxido y provocando la ocurrencia de la reacción [51].

Es de esperar que en ausencia del residuo de arginina no se produzca la estabilización de ese estado de transición formado por Arg123, Cys47 y H_2O_2 , y por ende, que la reacción no se dé. Es más, posiblemente en ausencia de la arginina el sitio activo pierda su estructura y la cisteína peroxidática pase a comportarse como un tiol de bajo peso molecular. Dado a que efectivamente la eficiencia catalítica para Tsa1 R123G fue nula en su reacción con H_2O_2 (*Figura 24*), la arginina modularía la especificidad de la Cys47 hacia dicho sustrato.

Este mismo efecto se ve en otras peroxirredoxinas; en triparredoxina peroxidasa de *Crithidia fasciculata* la sustitución de la Arg128 por un residuo ácido provoca la inactivación y desnaturalización de la proteína; se cree que la activación del sulfhidrilo de la cisteína peroxidática para la reducción de hidroperóxidos se da por medio del nitrógeno imino de la arginina [92]. Esto también se ha visto en otras triparredoxinas peroxidasas [93].



Figura 24. Gráfico de Brønsted de las constantes de velocidad aparente de tioles de bajo peso molecular con H_2O_2 a pH 7.06 ± o.04 y 25 °C. Los valores de k_{app} (■) se ajustaron a la ecuación: log k_{app} = pKa (β - 1) + log G - log (Ka + [H⁺]) donde β es el factor de nucleofilia de Brønsted, log G es la ordenada en el origen del gráfico de Brønsted y [H⁺] es la concentración de ion hidrógeno en el experimento.

Valores ajustados β = 0.27 ± 0.06, log G = -1.1 ± 0.5, línea roja. Referencia para tioles de bajo peso molecular: A: N-acetilcisteína; B: 2mercaptoetanol; C: captopril; D: ácido 2,3-

dimercaptosuccínico; E: cisteína; F: L-cisteína etil éster; G: glutatión; H: L-cisteinilglicina; I: DL-homocisteína. Los valores para las variantes de Tsa1 () se incluyen en la gráfica pero no se consideran en el ajuste.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- La mutación tanto de Thr44 como de Arg123 no estaría afectando la acidez de la cisteína peroxidática, por lo que en Tsa1 estos residuos no serían los responsables de su bajo pKa.
- Ninguna de las mutaciones afectaría la nucleofilia de la cisteína peroxidática en su reacción con mBBr, con lo cual se estarían descartando ambos residuos como los responsables en mantener una baja reactividad en presencia de dicho sustrato.
- En Tsa1 el residuo de Thr44 estaría implicado en el correcto posicionamiento de H₂O₂ y en la modulación de la nucleofilia de la cisteína peroxidática durante el ingreso del mismo, posibilitando la reacción tal como se establece para otras peroxirredoxinas. A su vez, el residuo de Arg123 efectivamente sería el responsable de mantener la estructura del sitio activo, logrando que la cisteína peroxidática actúe como tal y no como una cisteína ordinaria.

REFERENCIAS

- Halliwell, B., Gutterridge, J. M. C. (1998). Free Radicals in Biology and Medicine, 4th Ed., Oxford, Oxford Univ. Press
- [2] Halliwell, B., Gutterridge, J. M. C. (1989). Protection against Radical Damage: Systems with Problems. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **2nd Ed**., Clarendon Press, Oxford.
- [3] Butterfield, D. A., Yatin, S. M., Varadarajan, S., Koppal, T. (1999). Amyloid beta-peptideassociated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol*, **309**: 746–768.
- [4] Kim, K. S., Choi, S. Y., Kwon, H. Y., Won, M. H., Kang, T. C., Kang, J. H. (2002). Aggregation of alfa-synuclein induced by the Cu, Zn-super-oxide dismutase and hydrogen peroxide system. *Free Radic. Biol. Med.*, 32: 544–550.
- [5] Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B., Ames, B. N. (1990). Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.*, **6**: 363–368.
- [6] Hendrick, J. P., Hartl, F. U. (1993). Molecular chaperone functions of heat shock proteins. Annu. Rev. Biochem., 62: 349–384.
- [7] Rhee, S. G., Chae, H. Z., Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 38: 1543–1552.
- [8] Wood, Z. A., Schröder, E., Robin Harris, J., Poole, L. B. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.*, **28**: 32–40.
- [9] Hofmann, B., Hecht, H. J., Flohé, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biol. Chem.*, 383: 347–364.
- [10] Kim, K., Kim, I. H., Lee, K. Y., Rhee, S. G., Stadtman, E. R. (1988). The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O2 mixedfunction oxidation system. J. Biol. Chem., 263:4704–4711.
- [11] Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S. W., Rhee, S. G., Stadtman, E. R. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. J. Biol. Chem. 271: 15315–15321.
- [12] Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., Kim, I. H. (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 275(8): 5723-5732.
- [13] Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, 407: 211–215.
- [14] Wong, C. M., Zhou, Y. Ng, R. W. M., Kung, H. F., Jin, D. Y. (2002). Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. J. Biol. Chem., 277: 5385–5394.
- [15] Munhoz, D. C., Netto, L. E. S. (2004). Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult. J. Biol. Chem., 279: 35219–35227.
- [16] Wong, C. M., Siu, K. L., Jin, D. Y. (2004). Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. J. Biol. Chem., 279: 23207–23213.

- [17] Jacobson, F. S. et al. (1989). An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. J. Biol. Chem., 264: 1488–1496.
- [18] Poole, L. B., Ellis, H.R. (1996). Flavin-dependent alkyl hydro- peroxide reductase from Salmonella typhimurium. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins. Biochemistry, 35: 56–64.
- [19] Peshenko, I. V., Shichi, H. (2001). Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.*, **31**: 292– 303.
- [20] Chae, H. Z., Chung, S. J., Rhee, S. G. (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J. Biol. Chem., 269: 27670–27678.
- [21] Link, A. J. et al. (1997). Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis*, **18**: 1259–1313.
- [22] Moore, R. B. et al. (1991). Reconstitution of Ca2b-dependent Kb transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein. J. Biol. Chem., 266: 18964–18968.
- [23] Chae, H. Z. et al. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **45**: 101–112.
- [24] Tavender, T. J., Bulleid, N. J. (2010). Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation. *Journal of Cell*, **123**: 2672-2679.
- [25] Jin, D. Y., Jeang, K. T. (2000). Peroxiredoxins in cell signaling and HIV infection. Antioxidant and Redox Regulation of Genes (Sen, C. K. et al., eds), 381–407, Academic Press.
- [26] Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E. S., Augusto, O. (2007). Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free radical biology & medicine*, **42 (3)**: 326-334.
- [27] Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., Lee, S. Y. (2004). Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, **117**: 625–635.
- [28] Moon, J. C., Hah, Y. S., Kim, W. Y., Jung, B. G., Jang, H. H., Lee, J. R., Kim, S. Y., Lee, Y. M., Jeon, M. G., Kim, C. W., Cho, M. J., Lee, S. Y. (2005). Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H2O2-induced cell death. J. Biol. Chem., 280: 28775–28784.
- [29] Fomenko, D. E., Koc, A., Agisheva, N., Jacobsen, M., Kaya, A., Malinouski, M., Rutherford, J. C., Siu, K. L., Jin, D. Y., Winge, D. R., Gladyshev, V. N. (2011). Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *PNAS*, 108 (7): 2729-2734.

- [30] Flohé, L., Wingender, E., Brigelius-Flohé, R. (1997). Regulation of glutathione peroxidases. Oxidative stress and signal transduction. H. J. Forman, H. Cadenas (eds.), Chapman and Hall, New York, 415-440.
- [31] Fujii, J., Ikeda, Y. (2002). Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep.*, **7**: 123–130.
- [32] Park, J., Lee, S., Lee, S-H., Kang, S. W. (2014). 2-Cys Peroxiredoxins: Emerging hubs determining redox dependency of mammalian signaling networks. *International Journal of Cell Biology*, ID 715867.
- [33] Wang, J., Lin, D., Peng, H., Huang, Y., Huang, J., Gu, J. (2013). Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. *Cell Death and Disease*, doi: 10.1038/cddis.2013.474.
- [34] Duan, J., Lang, Y., Song, C., Xiong, J., Wang, Y., Yan, Y. (2013). SiRNA targeting of PRDX3 enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells through the suppression of the NFκB signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, **7**: 1688-1694.
- [35] Rhee, S. G, Woo, H. A, Kil, I. S., Bae, S. H. (2012). Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *The Journal of Biological Chemistry*, **287(7)**: 4403-4410.
- [36] Hillar, A. et al. (2000). Modulation of the activities of catalase- peroxidase HPI of *Escherichia coli* by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **39**: 5868–5875.
- [37] Costa Seaver, L. Imlay, J.A. (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **183**: 7173–7181.
- [38] Marino, S. M, Gladyshev, V. N. (2012). Analysis and Functional Prediction of Reactive Cysteine. Journal of Biological Chemistry, **287 (7)**: 4419-4425.
- [39] Leonard, S. E., Reddie, K. G., Carroll, K. S. (2009). Mining the thiol proteome for sulfenic acid modifications reveals new targets for oxidation in cells. *ACS Chem. Biol.*, **4**: 783–799.
- [40] Poole, L. B., Karplus, P. A., Claiborne, A. (2004). Protein sulfenic acids in redox signaling. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 44: 325–347.
- [41] Shenton, D., Grant, C. M. (2003). Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **374**: 513–519.
- [42] Cabiscol, E., Levine, R. L. (1996). The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 4170–4174.
- [43] Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., Stamler, J. S. (2005). Protein Snitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol,.* 6: 150–166.
- [44] Marino, S. M., Gladyshev, V. N. (2010). Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *J. Mol. Biol.*, **404**: 902–916.
- [45] Schröder, E., Ponting, C. P. (1998). Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. *Protein Sci.*, **7**: 2465–2468.
- [46] Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem. 54: 237-271.

- [47] Kitano, K., Niimura, Y., Nishiyama, Y., Miki, K. J. (1999). Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus. *Biochem*, 126: 313-9.
- [48] Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A, Poole, L. B. (2005). Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Biochemistry*, 44: 10583-92.
- [49] Fourquet, S., Huang, M. E., D'Autreaux, B., Toledano, M. B. (2008). The dual functions of thiolbased peroxidases in H2O2 scavenging and signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, **9**: 1565–1576.
- [50] Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., Ursini, F. (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms. Antioxid. Redox Signal, 15: 763–780.
- [51] Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., Denicola, A. (2011). Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.*, **24**: 434–450.
- [52] Chae, H.Z. et al. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 91: 7017–7021.
- [53] Verdoucq, L., Vignols, F., Jacquot, J. P., Chartier, Y., Meyer, Y. (1999). In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. J. Biol. Chem., 274: 19714-19722.
- [54] Flohé, L., Harris, J. R. (2007). Peroxiredoxin Systems. Structures and Functions. Springer Press, 44: 31-33.
- [55] Soito, L., Williamson, C., Knutson, S. T., Fetrow, J. S., Poole, L. B., Nelson, K. J. PREX: PeroxiRedoxin classification indEX [en línea]. Última actualización: 2012-06-26. Disponible en la web: http://www.csb.wfu.edu/prex/.
- [56] Lian, F. M., Yu, J., Ma, X. X., Yu, X. J., Chen, Y., Zhou, C. Z. (2012). Structural Snapshots of Yeast Alkyl Hydroperoxide Reductase Ahp1 Peroxiredoxin Reveal a Novel Two-cysteine Mechanism of Electron Transfer to Eliminate Reactive Oxygen Species. J. Biol. Chem., 287(21): 17077–17087.
- [57] Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H., Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J. Biol. Chem., 275: 20346–20354.
- [58] Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, **52**: 35–41.
- [59] Ellis, H. R., Poole, L.B. (1997). Novel application of 7-chloro-4- nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry*, 36: 15013–15018.
- [60] Ellis, H.R., Poole, L.B. (1997). Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, 36: 13349–13356.

- [61] Choi, H. J. et al. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 A° resolution. Nat. Struct. Biol., 5: 400–406.
- [62] Hirotsu, S. et al. (1999). Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96: 12333– 12338.
- [63] Schröder, E. et al. (2000). Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 A° resolution. Structure, 8: 605–615.
- [64] Alphey, M. S. et al. (2000). The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2-Cys peroxiredoxins. J. Mol. Biol., 300: 903–916.
- [65] Wood, Z. A. et al. (2002). Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry*, **41**: 5493–5504.
- [66] Nogoceke, E. et al. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothionemediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.*, **378**: 827–836.
- [67] Poole, L.B. et al. (2000). AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6126–6133.
- [68] Bryk, R. et al. (2002). Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. Science, 295: 1073–1077.
- [69] Declercq, J. P. et al. (2001). Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. J. Mol. Biol., 311: 751–759.
- [70] Fisher, A. B. et al. (1999). Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **274**: 21326–21334.
- [71] Lee, S. P. et al. (2001). Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity.
 J. Biol. Chem., 276: 29826–29832.
- [72] Monteiro, G., Horta, B., Carvalho, D., Augusto, O., Netto, L. E. S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. PNAS, 104(12): 4886-4891.
- [73] Pedrajas, J. R., Padilla, C. A., McDonagh, B., Bárcena, J. A. (2010). Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitocondrial 1-Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(3): 249-258.
- [74] Russo, A., Bump, E. A. (1988). Detection and quantitation of biological sulfhydryls. *Methods Biochem. Anal.*, 33: 165-241.
- [75] Poole, L. B. (2007). The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem.*, 44: 61-81.
- [76] Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., Karplus, P. A. (2010). Structural Evidence that Peroxiredoxin Catalytic Power Is Based on Transition-State Stabilization. *Journal of Molecular Biology*, 402(1): 194-209.
- [77] Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., Toledano, M. B. (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. J Biol Chem, 274: 4537–4544.

- [78] Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N. et al. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**: 737–741.
- [79] Tachibana, T., Okazaki, S., Murayama, A., Naganuma, A., Nomoto, A. & Kuge, S. (2009). 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.
- [80] Monje-Casas, F., Michan, C., Pueyo, C. (2004). Absolute transcript levels of thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems in *Saccharomyces cerevisiae*: response to stress and modulation with growth. *Biochem J*, 383: 139–147.
- [81] Huang, M. E., Rio, A. G., Nicolas, A., Kolodner, R. D. (2003). A genomewide screen in Saccharomyces cerevisiae for genes that suppress the accumulation of mutations. Proc Natl Acad Sci, 100: 11529–11534.
- [82] Iraqui, I., Kienda, G., Soeur, J., Faye, G., Baldacci, G., Kolodner, R. D., Huang, M. E. (2009). Peroxiredoxin Tsa1 Is the Key Peroxidase Suppressing Genome Instability and Protecting against Cell Death in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Genetics, 5(6): e1000524.
- [83] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernández, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H. SIB ExPASy Bioformatics Resources Portal [en línea]. *Creado en 2011-06*. Disponible en la web: http://www.expasy.org/
- [84] Portillo, S. (2012). Estudio teórico experimental de la peroxirredoxina V humana. Tesina de Graduación. Facultad de Ciencias, UdelaR.
- [85] Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., Ferrer-Sueta, G. (2013). Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, **435**: 74-82.
- [86] Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B., Radi, R. (2007). Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Science*, 467: 95-106.
- [87] Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., Ferrer-Sueta, G. (2014). Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin-5 Peroxidatic Cysteine. *Biochemistry*, 53 (38): 6113-6125.
- [88] Harris, T. K., Turner, G. J. (2002). Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life*, **53(2)**: 85-98.
- [89] Tairum, C., Oliveira, M. A., Horta, B., Zara, F., Netto, L. E. S. (2012). Disulfide Biochemistry in 2-Cys Peroxiredoxin: Requirement of Glu50 and Arg146 for the Reduction of Yeast Tsa1 by Thioredoxin. JMB, 424: 28-41.
- [90] Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A., Pace, P., O'Reilly, R., Hampton, M., Radom, L., Winterbourn, C. (2011). Model for de Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(20): 18048-18055.
- [91] Lamkemeyer, P., Laxa, M., Collin, V., Li, W., Finkemeier, I., Schottler, M. A., Holtkamp, V., Tognett, V. B., Issakidis-Bourguet, E., Kandlbinder, A., Weis, E., Miginiac-Maslow, M., Dietz, K. J. (2006). Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *The Plant Journal*, **45**: 968-81.
- [92] Montemartini, M., Kalisz, H. M., Hecht, H., Steinert, P., Flohé, L. (1999). Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type tryparedoxin peroxidase of *Crithidia fasciculate*. *FEBS*, 264: 516-524.
- [93] Flohé, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., Hecht, H. J. (2002). Tryparedoxin Peroxidase of *Leishmania donovani*: Molecular Cloning, Heterologous Expression, Specificity, and Catalytic Mechanism. *Arch Biochem Biophys*, **397(2)**: 324-35.