



Universidad de la República
Facultad de Ciencias

Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica

REDUCCIÓN DE PEROXINITRITO POR PEROXIRREDOXINA 3 MITOCONDRIAL HUMANA

ROMINA ESTEVES GONZÁLEZ

Tutora: Dra. Madia Trujillo
Co-tutora: Dra. Verónica Tórtora

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina y Centro de
Investigaciones Biomédicas, Universidad de la República.

Montevideo, Uruguay

Noviembre 2015

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, dos grandes pilares, gracias por su apoyo y dedicación incondicional, quienes más allá de compartir alegrías, supieron también estar en los momentos difíciles, siempre con una palabra de aliento y un voto de confianza, quienes anhelaron tanto éste día como yo.

A mi tutora Madia Trujillo por haber dedicado constantemente parte de su tiempo en este trabajo. Una profesional admirable de quién aprendí muchísimo y una gran compañera del día a día durante todos los meses de trabajo, a quién volvería a elegir siempre.

A mi cotutora Verónica Tórtora por haber estado siempre dispuesta de la mejor manera cada vez que la necesite, quién con mucha dedicación me enseñó a realizar los inmunoensayos de la tesina e interpretar sus resultados.

A mis compañeros de laboratorio, que desde el primer día me hicieron sentir como en casa, estando siempre con la mejor disponibilidad cada vez que los necesite. Me llevo muy lindos recuerdos de haber pasado por el CEINBIO, un gran grupo humano más allá de profesionales. En particular, gracias a Marcelo Reyes quién colaboró siempre con los trabajos de la tesina, a Mauricio Mastrogiovanni quién me ayudo a realizar el experimento de EM y a Paola Rosenberg por siempre haber estado dispuesta a los pedidos que le hice.

Gracias a las Glendas, por haber sido mis compañeras de lucha, de alegrías y de disgustos durante todos estos años, quienes se volvieron amigas tan indispensables para mí, a quienes elegiría siempre y para siempre. Por otro lado a mi amigo Gabi quien nunca ha dejado de estar presente, más allá de la distancia. A mi amiga Nandy, gracias por haber sido la mejor compañera que pude haber tenido durante aquel intenso 2011.

A mi familia, gracias a todos los que de una forma u otra supieron estar durante este tiempo, con los mejores deseos y motivaciones. En especial a mis adoradas abuelas quienes tanto soñaron con mi recibimiento.

A mis amigas y amigos muchas gracias por todos los momentos compartidos, por el aguante incondicional y por siempre estar presentes con buenos deseos y energía cada vez que tuve un parcial o un examen.

RESUMEN:

Las peroxirredoxinas (Prx) son una familia de enzimas antioxidantes presentes en la mayoría de los organismos vivos, que poseen actividad peroxidasa y participan en la detoxificación de peróxidos y en la señalización redox. Catalizan reacciones bi-sustráticas por un mecanismo de tipo ping-pong y tienen una amplia variedad de sustratos oxidantes, catalizando la reducción de peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos de ácidos grasos y peroxinitrito, con eficiencia catalítica variable dependiendo de la subfamilia de Prx. Poseen por lo menos un residuo de cisteína crítico para la catálisis conocido como cisteína peroxidática (C_P), que reduce el hidroperóxido en cuestión y se oxida para formar ácido sulfénico (C_P -SOH). Generalmente, son reducidas por tioredoxina u otra proteína relacionada. Son susceptibles a modificaciones post-traduccionales, tales como la hiperoxidación de su C_P a ácido sulfínico (C_P -SO₂H) que produce la inactivación enzimática, mientras al menos para Prx2 humana, la nitración de un residuo de tirosina particular conduce a incrementos en la actividad peroxidasa.

En este trabajo caracterizamos la actividad peroxinitrito reductasa de la Prx3 humana, enzima exclusivamente mitocondrial, realizando ensayos de cinética de ciclo catalítico único, utilizando un espectrofotómetro/fluorímetro de flujo detenido. Demostramos que la enzima reduce rápidamente peroxinitrito, y utilizando ensayos de competencia, determinamos una constante de velocidad de reacción de $8.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C, pH 7.8.

Mediante la utilización de anticuerpos específicos, demostramos que la exposición de la enzima a peroxinitrito en exceso conduce a la hiperoxidación de su tiol peroxidático, y a la nitración de residuos de tirosina.

Por su parte, utilizando el cambio de fluorescencia intrínseca de la enzima dependiente de su estado redox, determinamos una constante de velocidad de formación del enlace disulfuro entre la C_P oxidada y la resolutive de $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ a 14°C, pH 7.8.

Nuestros datos cinéticos permiten predecir que la Prx3, conjuntamente con la Prx5 anteriormente estudiada en nuestro laboratorio, serían responsables de ~

90% de la reducción de peroxinitrito intramitocondrial. Asimismo, la reacción de peroxinitrito con CO₂, que origina radicales secundarios que participan de reacciones de nitración y oxidación, daría cuenta de una fracción no despreciable del consumo de peroxinitrito generado en la mitocondria (~ 3%).

PALABRAS CLAVES:

Estrés nitro-oxidativo; regulación redox; peroxinitrito; peroxirredoxina 3; ácido sulfénico; hiperoxidación; 3-nitrotirosina.

ABREVIATURAS:

AhpE: Alquil hidroperóxido reductasa E

ATP: Trifosfato de adenosina

BCP/PrxQ: Proteína comigratoria con bacterioferritina/ Peroxirredoxina Q.

CBA: Boronato de Cumarina

C_P: Cisteína Peroxidática

C_R: Cisteína Resolutiva

DTPA: Pentaacetato de dietilentriamina

DTT: 4-ditiotreitol

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

ERO: Especie reactiva del oxígeno

ERN: Especie reactiva del nitrógeno

FF: Fully Folded (completamente plegada)

k: Constante de velocidad

k_{CAT}: Constante catalítica

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

Gpx: Glutación peroxidasa

Grx: Glutarredoxina

GSH: Glutación

HRP: Peroxidasa de rábano

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LPS: Lipopolisacárido

LB: Caldo de lisogenia

LU: Locally unfolded (localmente desplegada)

MnSOD: Manganeso superóxido dismutasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NEM: N-etilmaleimida.

NOS: Óxido nítrico sintasa

PBS: Buffer fosfato salino

PM: Peso molecular

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Prxs: Peroxirredoxinas

Prx1/AhpC: Peroxirredoxina 1 / Alquil hidroperóxido reductasa C

P13K: Fosfoinositol 3-quinasa

PTP-1B: Proteína tirosina fosfatasa-1B

SDS: Dodecilsulfato sódico

SOD: Superóxido dismutasa

Srx: Sulfirredoxina

TEV: Tobacco Etch Virus (Virus del grabado del tabaco)

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

Tpx: Tiorredoxina peroxidasa

TR: Tiorredoxina reductasa

Trx: Tiorredoxina

TABAL DE CONTENIDO:

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ESTRÉS NITRO-OXIDATIVO:	1
1.2	PEROXINITRITO:	3
1.2.1	Peroxinitrito como agente oxidante:	4
1.2.1.1	Oxidación de compuestos con grupos tiol:	5
1.2.1.2	Oxidación de centros con metales de transición:	8
1.2.2	Peroxinitrito como agente nitrante: nitración de residuos de tirosina y triptófano:	8
1.2.3	Peroxinitrito y patologías asociadas:	11
1.3	PEROXIRREDOXINAS:	13
1.3.1	Ciclo catalítico:	15
1.3.2	Hiperoxidación:	17
1.3.3	Peroxirredoxinas en eucariotas:	18
1.4	PEROXIRREDOXINA 3 HUMANA:	18
1.4.1	Catálisis:	19
1.4.2	Hiperoxidación:	19
1.4.3	Estructura:	20
1.4.4	Funciones de Prx3:	22
1.4.4.1	Defensa antioxidante:	22
1.4.4.2	Señalización redox mediada por Prx3:	23
1.4.5	Especificidad de sustrato oxidante de Prx3:	24
I.	Prx3 y Peróxido de hidrógeno:	24
II.	Prx3 e hidroperóxidos de ácidos grasos:	25
III.	Prx3 y peroxinitrito:	26
2	OBJETIVOS:	27
2.1	OBJETIVO GENERAL:	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	27
3	MATERIALES Y MÉTODOS:	28
3.1	MATERIALES:	28
3.2	MÉTODOS:	31
3.2.1	Transformación, expresión y purificación de Prx3 humana:	31
I.	Preparación de células competentes y transformación:	32
II.	Expresión de Prx3 humana:	33
III.	Purificación de Prx3 humana:	33
3.2.2	Expresión y purificación de TEV proteasa:	34
I.	Expresión de Tev proteasa:	35
II.	Purificación de Tev proteasa:	35
3.2.3	Corte de cola de histidina de Prx3 con TEV proteasa:	36

3.2.4 Evaluación de la purificación y escisión de cola de histidinas de Prx3 por espectrometría de masas:.....	38
3.2.5 Ensayo de cinética directo: reducción de peroxinitrito por Prx3 humana	39
3.2.6 Ensayos de cinética de competencia:	40
I. Competencia Prx3-HRP:	40
II. Competencia Prx3-CBA:	42
3.2.7 Evaluación de posibles modificaciones postraduccionales producto de la interacción de Prx3 con peroxinitrito:.....	43
3.2.8 Fluorescencia intrínseca de Prx3:	46
4 RESULTADOS:	47
4.1 PURIFICACIÓN DE PRX3 HUMANA:	47
4.2 CORTE DE LA COLA DE HISTIDINA DE PRX3 CON TEV PROTEASA:	48
4.3 EVALUACIÓN DE LA PURIFICACIÓN Y ESCISIÓN DE COLA DE HISTIDINAS DE PRX3 POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS:.....	49
4.4 DESCOMPOSICIÓN DE PEROXINITRITO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE PRX3 : ..	51
4.5 COMPETENCIA PRX3-HRP:.....	53
4.6 COMPETENCIA PRX3-CBA:	56
4.7 EVALUACIÓN DE POSIBLES MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PRX3 POR INTERACCIÓN CON PEROXINITRITO:	59
4.7.1 SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras:	59
4.7.1 Detección por Western blot de hiperoxidación de Prx3 mediada por peroxinitrito:.....	61
4.7.3 Detección por Western blot de nitración de tirosinas en Prx3 tratada con peroxinitrito:.....	64
4.8 CAMBIOS DE FLUORESCENCIA INTRÍNSECA DE PRX3 ASOCIADOS A SU ESTADO REDOX:.....	65
5 DISCUSIÓN:	70
6 CONCLUSIONES:	81
7 PERSPECTIVAS:	82
8 BIBLIOGRAFÍA:	84

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés nitro-oxidativo:

Los organismos aeróbicos obtienen energía a través de un proceso conocido como respiración celular, que implica una serie de reacciones bioquímicas a nivel mitocondrial, donde ciertos compuestos químicos son oxidados en un proceso que se acompaña de la reducción del oxígeno a agua, actuando este último como aceptor final de electrones. Sin embargo la respiración celular no es un proceso totalmente perfecto, y como subproducto del metabolismo oxidativo ocurre la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente).

Las ERO incluyen el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales peroxilo (ROO^\bullet), el radical hidroperóxido (HOO^\bullet) y peróxidos orgánicos (ROOH). Por su parte las ERN incluyen el radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), el radical dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$), y el peroxinitrito¹ que si bien no es una especie radicalar, es un potente agente oxidante-nitrante. Un incremento en los niveles de estos puede causar daño en los componentes de la célula hasta incluso llevar a su muerte, es por lo que las células cuentan con mecanismos propios de defensa antioxidante para la eliminación de estas especies. Los antioxidantes celulares se pueden clasificar en dos grupos: enzimáticos, que incluyen una amplia variedad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasas (Gpxs) y peroxirredoxinas (Prxs) entre muchas otras, y antioxidantes no-enzimáticos que incluyen moléculas de bajo peso molecular como la vitamina E, ácido ascórbico, tocoferol, coenzima Q, ácido úrico, glutatión (GHS) y carotenoides que son capaces de retardar o inhibir la oxidación

¹ El término peroxinitrito es utilizado para hacer referencia a la suma de peroxinitrito anión (ONOO^-) y su ácido conjugado, ácido peroxinitroso (ONOOH).

de otras biomoléculas, reaccionando con las ERO-ERN y oxidándose ellos mismos (1).

Si bien inicialmente se consideraba que las modificaciones causadas por estas especies oxidantes-nitrantes en proteínas y otras biomoléculas tendrían como consecuencia llevar al desequilibrio y daño celular, más recientemente se comenzó a reconocer la posible participación de éstas como mensajeros intracelulares en la regulación de la expresión de genes y como moduladores en la transducción de señales, proceso conocido como señalización redox (2-4). Por ejemplo, se ha demostrado que el peroxinitrito participa en la inhibición de cascadas de fosforilación promoviendo la oxidación de grupos tioles en enzimas fosfatasas y la activación por oxidación-nitración de enzimas tirosina quinasas (5). También se conoce que mecanismos de señalización celular mediada por peróxidos están implicados en diferentes procesos celulares incluyendo proliferación celular, apoptosis, senescencia, angiogénesis (6-8).

El estrés nitro-oxidativo había sido definido en un principio como un desbalance entre las ERO-ERN y la capacidad de la célula de detoxificación de las mismas, a favor de los primeros, sin considerar la participación benéfica de estas especies como moduladores en la señalización redox. Por esta razón recientemente Jones re-definió el concepto de estrés oxidativo como una interrupción de la señalización redox y su control (9).

En este trabajo nos centraremos en el rol del peroxinitrito como agente oxidante-nitrante en proteínas. Tal modificación postraducciona puede llevar (o no) a una alteración en la funcionalidad de la proteína, que no necesariamente se ha visto asociada únicamente a la pérdida de función, sino que hay casos en los que se las relaciona con activación de la proteína y más sorprendentemente con la adquisición de una nueva función (10). También se ha reportado que la reacción de peroxinitrito con algunas proteínas puede causar la agregación de las mismas (11, 12) así

como la degradación proteolítica, al aumentar la tendencia a su degradación en el proteosoma (13, 14).

1.2 Peroxinitrito:

El peroxinitrito es una especie reactiva del nitrógeno que se produce a nivel celular por la reacción rápida entre dos radicales libres, el $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$ como muestra la reacción (1) (15):



La constante de velocidad para esta reacción es muy alta, en el rango de 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (16-18). La cinética de esta reacción hace que la formación del peroxinitrito sea un proceso que compite con la reacción de dismutación que catalizan las SODs de diferentes compartimentos (19), particularmente en condiciones de incrementos de concentraciones intracelulares de $\bullet\text{NO}$ tales como ocurren en procesos inflamatorios (20, 21).

El $\bullet\text{NO}$ es una molécula señalizadora que funciona como mensajero intracelular participando en muchos procesos fisiológicos: actúa como neurotransmisor del sistema nervioso, participa en la relajación del músculo liso mediante la estimulación de la producción de GMPc por la enzima guanilato ciclasa, mecanismo por el cual regula el flujo sanguíneo corporal y también participa en la defensa contra infecciones por diferentes microorganismos (22).

Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina y NADPH en reacciones catalizadas por óxido nítrico sintasas (NOS), existiendo 3 isoformas de esta flavoproteína en células de mamífero: neuronal (constitutiva, que puede expresarse en mitocondria), endotelial (constitutiva) e inducible (23).

EL $\bullet\text{NO}$ es una molécula pequeña, gaseosa, sin carga que tiene la capacidad de difundir libremente a través de las membranas celulares, lo que lleva a que la formación de peroxinitrito no requiera que el $\bullet\text{NO}$ y el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se produzcan en la misma célula o compartimento (24). Por su parte la carga negativa del $\text{O}_2^{\bullet-}$, cuyo ácido conjugado tiene un pK_a de 4.8, no le permite su libre difusión transmembrana favoreciendo que la reacción de formación del peroxinitrito se de en los compartimientos celulares donde ocurre formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (25). Las principales fuentes intracelulares de $\text{O}_2^{\bullet-}$ son la fuga de electrones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la reducción monovalente de oxígeno por la xantino oxidasa, diferentes NADPH oxidasas u otras oxidasas (26-28).

El peroxinitrito a pH fisiológico predomina en su forma aniónica dado que su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso tiene un pK_a de 6.5-6.8 (17, 18, 29). Este último puede difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica mientras que la forma aniónica depende de canales aniónicos presentes en la membrana para su difusión (30).

1.2.1 Peroxinitrito como agente oxidante:

El peroxinitrito es capaz de mediar la oxidación de sus moléculas diana a través de dos mecanismos, directo e indirecto, respectivamente.

La oxidación directa es un proceso selectivo (21), dado que el peroxinitrito puede reaccionar directamente con un número acotado de biomoléculas siendo sus dianas más frecuentes compuestos con grupos tiol de bajo peso molecular (PM) tales como el glutatión o presentes en residuos de Cys de proteínas (31, 32); compuestos con centro hierro-azufre (33); centros metálicos tales como los presentes en hemoproteínas (34, 35), zinc tiolatos (36), y el dióxido de carbono (CO_2) (37).

El peroxinitrito puede mediar reacciones de oxidación indirectamente ya que en su forma protonada (ONOOH) es un compuesto inestable, que homoliza espontáneamente produciendo hasta un 30% de rendimiento de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) ($k = 0.9 \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C), que pueden actuar como agentes oxidantes y nitrantes secundarios (38).

Teniendo en cuenta la rápida reactividad directa del peroxinitrito con los diferentes blancos anteriormente mencionados, la homólisis del ácido peroxinitroso se considera muy minoritaria en la mayoría de los compartimentos celulares. Por otra parte, la reacción del peroxinitrito con CO_2 ($k = 4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C) se ve favorecida por la alta concentración intracelular de este último (1.3 mM), rindiendo nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-). Este último homoliza para dar radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y $\bullet\text{NO}_2$ (37, 39). Aproximadamente un 35% de éstos radicales secundarios pueden escapar de la caja de solvente sin reaccionar entre sí, para pasar a ser radicales libres que son oxidantes por un electrón de diferentes residuos en proteínas incluyendo cisteína (a radical tío) (40), tirosina (a radical tirosilo), y triptofano (a radical triptofanilo) (41). La recombinación de radicales tirosilo o triptofanilo con el $\bullet\text{NO}_2$ conduce a la nitración de dichos residuos. Por otra parte, la recombinación de dos radicales tirosilo genera 3,3'-ditirosina (42).

1.2.1.1 Oxidación de compuestos con grupos tiol:

Una de las reacciones de oxidación más probables llevada a cabo por el peroxinitrito es la oxidación directa por dos electrones de la forma deprotonada de tioles (tiolato, RS^-) a su correspondiente ácido sulfénico (RSOH) (32). Este último a su vez puede reaccionar con otro tiol para formar disulfuros (RSSR). En el caso de tioles proteicos, ese segundo tiol puede provenir de la misma u otra proteína (causando la formación de

disulfuros intra- o inter-moleculares, respectivamente) o puede ser un tiol de bajo peso molecular presente en la célula (causando la tiolación, más frecuentemente glutationilación de la proteína) (34). Alternativamente el ácido sulfénico puede dismutar para formar tiosulfinato ($\text{RS(O)SR}'$) o reaccionar con una amina/amida para formar sulfenamidas (RSNHR'). Un exceso de agente oxidante conduce a la hiperoxidación por dos electrones del ácido sulfénico para dar ácido sulfínico (RSO_2H) que puede incluso ser oxidado a ácido sulfónico (RSO_3H) (32) (Figura 1), siendo estas dos últimas modificaciones irreversibles a nivel biológico, exceptuando el caso de las formas oxidadas a sulfínico del tiol peroxidático de peroxirredoxinas de dos cisteínas típicas que en algunos organismos pueden ser reducidas por enzimas específicas (sulfirredoxinas) (43).

A su vez el peroxinitrito puede mediar indirectamente la oxidación de tiolatos por un electrón a través de sus radicales derivados ($\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$), para dar radicales tiilos (RS^\bullet) (40, 44), que pueden recombinar para formar disulfuros o pueden seguir otras vías de reacción, siendo la más relevantes la reacción con otros tioles para formar el potente agente reductor disulfuro anión radical ($\text{RSSR}^{\bullet-}$), que puede reducir al oxígeno para formar disulfuros (RSSR) y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (45), y la reacción con oxígeno para formar radical peroxilo (RSOO^\bullet), seguido de un reordenamiento para dar radical sulfinilo (RSO_2^\bullet) y posteriormente ácido sulfónico-sulfínico (46) (Figura 1).

Por su parte los radicales tiílo también son capaces de recombinar con $\bullet\text{NO}$ para dar S-nitrosotioles (RSNO) (47) (Figura 1).

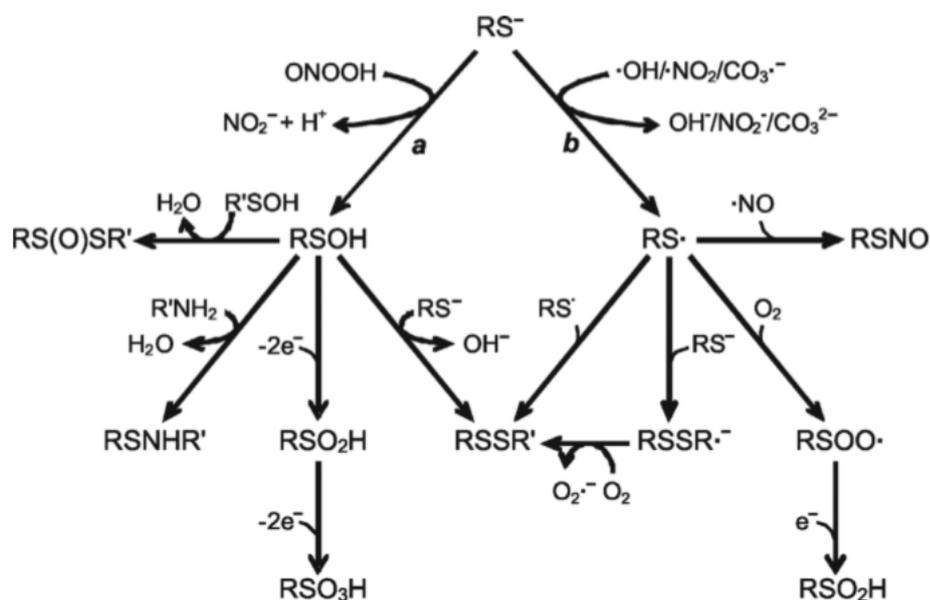


Figura 1: Oxidación de tioles mediada por peroxinitrito. **a)** Oxidación directa por dos electrones: el ácido peroxinitroso oxida el grupo tiolato para dar ácido sulfénico (RSOH), este último puede seguir diferentes vías de reacción, pudiendo dismutar para formar tiosulfinato (RS(O)SR'), reaccionar con una amina/amida para formar sulfenamidas (RSNHR'), hiperoxidarse por dos electrones para dar ácido sulfínico (RSO₂H) e incluso ácido sulfónico (RSO₃H) o reaccionar con otro tiol para formar disulfuro (RSSR). **b)** Oxidación indirecta por un electrón: radicales derivados del peroxinitrito oxidan grupos tiolatos para rendir radicales tíolos, que pueden recombinar para formar disulfuros (RSSR), reaccionar con óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) para formar S-nitrosotioles (RSNO), reaccionar con otro tiol para dar disulfuro anión radical (RSSR \cdot^-), capaz de reducir el oxígeno para formar disulfuros (RSSR) y anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) o reaccionar con oxígeno rindiendo radical peroxilo (RSOO \cdot), para finalmente formar ácido sulfínico (RSO₂H). Tomado de referencia (48).

Si bien algunas enzimas pierden su actividad catalítica al ser oxidadas por peroxinitrito en sus residuos de cisteínas críticos, siendo ejemplo de ello la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la vía glucolítica (49), y las enzimas de la cadena respiratoria (50), otras enzimas pueden

activarse al ser oxidadas por peroxinitrito en cisteínas, siendo ejemplo de ello la enzima metaloproteinasa de matriz, la cual está asociada a citotoxicidad mediada por peroxinitrito en patologías del corazón (51, 52).

1.2.1.2 Oxidación de centros con metales de transición:

El peroxinitrito es capaz de reaccionar rápidamente de forma directa con centros metálicos de transición que contienen preferencialmente hierro, cobre o manganeso, presentes en compuestos de bajo peso molecular y en proteínas como hemoglobina (53), mioglobina (54), citocromo c^{2+} (55), manganeso SOD (56) y hemoperoxidasas (57), con constantes de velocidad que están en el rango de 10^4 - $10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$ (58). La reacción puede conducir a la isomerización del peroxinitrito a nitrato, o puede producir la oxidación por uno o por dos electrones del compuesto metálico; en estos últimos casos se acompaña de la reducción del peroxinitrito a $NO_2^{\bullet-}$ o nitrito (NO_2^-), respectivamente, y en algunos casos, de la formación de complejos oxo-metálicos oxidantes (58).

1.2.2 Peroxinitrito como agente nitrante: nitración de residuos de tirosina y triptófano

El peroxinitrito es capaz de inducir la nitración de residuos de tirosina y de triptófano en proteínas, para dar 3'-nitrotirosina y triptófano nitrado en diferentes posiciones, respectivamente (59). Si bien estos productos y particularmente la 3'-nitrotirosina también pueden ser producidos por otros mecanismos, incluyendo mecanismos enzimáticos dependientes de hemo-peroxidasa (60), suelen ser utilizados como marcadores biológicos de estrés nitrosativo, y se han utilizado para evidenciar la formación de peroxinitrito en células y tejidos (61).

Como el peroxinitrito puede oxidar de forma directa el triptófano con una constante de velocidad lenta ($k = 37 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C) (59), en condiciones fisiológicas se espera que predomine la formación de radical triptofanilo por oxidación indirecta mediada por los radicales derivados del peroxinitrito ($\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$). La posterior recombinación con $\bullet\text{NO}_2$ lleva a la nitración del triptófano (59).

Por su parte el peroxinitrito no oxida directamente a la tirosina porque no es capaz de reaccionar con el grupo fenólico de este residuo. La nitración de tirosina dependiente de peroxinitrito es indirecta, siendo un proceso radicalar, que requiere de la oxidación por un electrón de la tirosina para formar radical tirosilo, cuya posterior recombinación con $\bullet\text{NO}_2$ genera 3'-nitrotirosina. El peroxinitrito, a través de la formación de sus radicales derivados $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$, puede entonces conducir a la formación de 3'-nitrotirosina y ésta reacción compite con la reacción de formación de 3,3-ditirosina por recombinación entre dos radicales tirosilo (62-64) (Figura 2).

La oxidación de tirosina mediada por $\bullet\text{OH}$ puede conducir también a la formación de 3-hidroxitirosina (Figura 2), que ha sido detectada *in vitro* a pH ácido en proteínas, análogos de tirosina y en sistemas celulares expuestos a peroxinitrito (65, 66).

Como el radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ es más selectivo como agente oxidante de la tirosina que el radical $\bullet\text{OH}$ y los rendimientos de radicales son también mayores en presencia de CO_2 , la nitración de tirosina puede incrementarse en presencia de este último (67).

El peroxinitrito también puede producir nitración mediante la oxidación de metales a complejos oxo-metálicos que oxidan a la tirosina a radical tirosilo que reacciona posteriormente con $\bullet\text{NO}_2$ proveniente de la reacción inicial o que se forma como producto de la oxidación del nitrito por el complejo oxo-metálico (Figura 2).

Como se mencionó anteriormente, existen mecanismos enzimáticos independientes de la formación de peroxinitrito para la nitración de residuos de tirosina. Hemoperoxidasas como la mieloperoxidasa, enzima expresada en neutrófilos y monocitos, y que puede encontrarse en plasma luego de la degranulación, es capaz de oxidar por un electrón a la tirosina y al nitrito, rindiendo radical tirosilo y $\cdot\text{NO}_2$, respectivamente (68), que al recombinar forman 3'-nitrotirosina. Por otra parte, se han descrito mecanismos de formación de nitrotirosina proteica a través de la oxidación inicial de tirosina a radical tirosilo, recombinación con $\cdot\text{NO}$, seguida de subsecuentes oxidaciones del nitroso-derivado para dar 3-nitrotirosina (69).

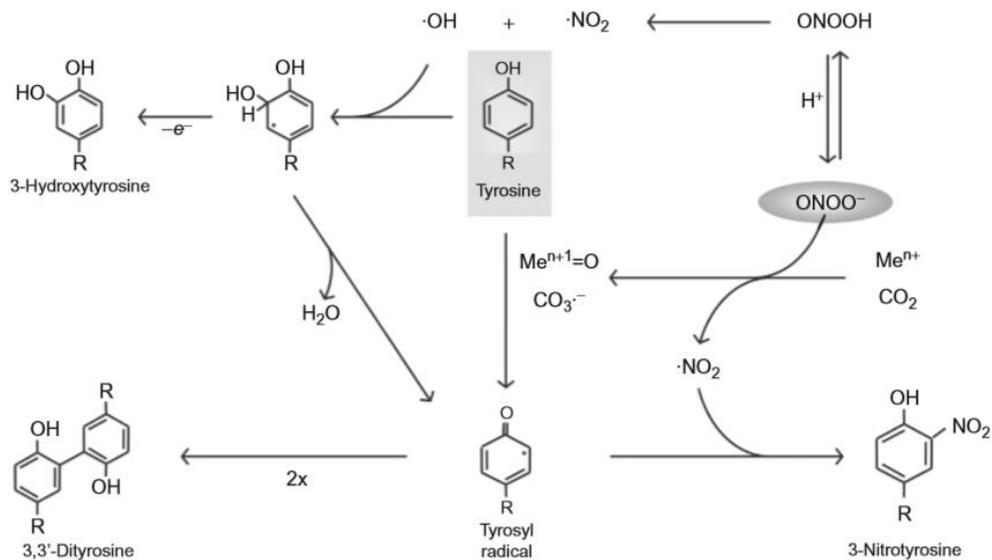


Figura 2: Oxidación indirecta de tirosina mediada por radicales derivados de la homólisis del ácido peroxinitroso, y diferentes vías de formación de 3-nitrotirosina: el peroxinitrito oxida metales a complejos oxo-metálicos, capaces de oxidar la tirosina a radical tirosilo, que puede recombinar con $\bullet\text{NO}_2$ proveniente de la reacción inicial o que se forma como producto de la oxidación del nitrito por el complejo oxo-metálico, para dar 3-nitrotirosina. El radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) oxida a la tirosina conduciendo a la formación de un aducto intermediario que puede dar 3-hidroxitirosina, o deshidratarse para rendir radical tirosilo, que tras reaccionar con $\bullet\text{NO}_2$ rinde 3-nitrotirosina. Dos radicales tirosilo pueden recombinar para producir 3,3'-ditirosina. Tomado de referencia (70).

La nitración de tirosina es un proceso selectivo que se da sobre determinadas proteínas (~1/10.000 tirosinas se nitrán en condiciones normales) y en residuos específicos (71). Si bien las bases moleculares de la especificidad en la nitración proteica son aún desconocidas, el fenómeno no estaría relacionado con la cantidad de residuos de tirosina contenidos en la proteína, sino que se vincula a factores como la exposición del grupo fenólico de la tirosina en la superficie de la proteína así como la ausencia de residuos de cisteína próximos a tirosina, entre otros. Por su parte en el caso de las metaloproteínas, por ejemplo la MnSOD, la especificidad es explicada por la proximidad de la tirosina al centro metálico oxidado (72).

Estudios recientes sugieren que la nitración de tirosina es una modificación postraduccional reversible. Por ejemplo, una actividad desnitrasa específica es capaz de restaurar la funcionalidad de la enzima glutamina sintetasa previamente nitrada utilizando peroxinitrito (73).

1.2.3 Peroxinitrito y patologías asociadas:

Estudios fisiopatológicos han demostrado que incrementos en la producción de peroxinitrito están implicados con el desarrollo de varias

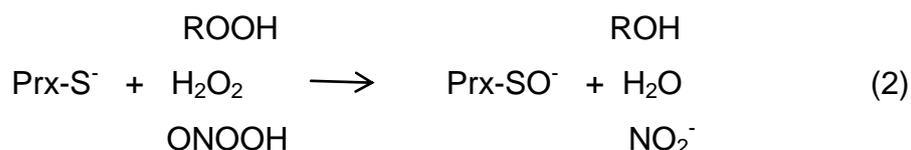
patologías como diabetes (74), trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (75-77), trastornos cardiovasculares como miocarditis, insuficiencia cardíaca crónica, disfunción miocardia y vascular (78, 79) y activación de procesos inflamatorios e inmunológicos como resultado de la activación de múltiples vías de señalización que conducen a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (80, 81).

La nitración de residuos de tirosina mediada por peroxinitrito puede verse acompañada o no, de una alteración estructural y funcional de la proteína en cuestión (82). En varias patologías humanas se ha revelado la presencia de proteínas con tirosinas nitradas, por ejemplo la enzima Mn-SOD mitocondrial al ser nitrada específicamente en un residuo de tirosina (Tyr-34) se vuelve completamente inactiva, conduciendo a la acumulación de $O_2^{\bullet-}$ acompañado de un incremento en la formación de peroxinitrito mitocondrial (83). Se ha detectado Mn-SOD mitocondrial nitrada en el líquido cefalorraquídeo de pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (84) y en pacientes que presentan rechazo de trasplante renal (85).

Si bien en la mayoría de los casos se ha atribuido a la nitración como un factor causante de pérdida de función en proteínas, también existen casos donde se da ganancia de función, como en el caso del citocromo c^{3+} cuya nitración produce un aumento de actividad peroxidasa (86). En peroxirredoxina 2 (Prx2) la nitración de un residuo de tirosina específico también conduce a un aumento de su actividad peroxidasa acompañada de un incremento de resistencia a la hiperoxidación. Se ha detectado Prx2 nitrada en pacientes que padecen de enfermedad de Alzheimer (87).

1.3 Peroxirredoxinas:

Las Prxs son una familia de enzimas antioxidantes, con actividad peroxidasa dependiente de tioles, presentes bajo diferentes isoformas en la inmensa mayoría de los organismos (88). Participan en la señalización redox mediada por peróxidos y desempeñan un rol crucial para las células, protegiéndolas ante el estrés nitro-oxidativo mediante la detoxificación de peróxidos. Tienen una amplia variedad de sustratos oxidantes catalizando la reducción de H₂O₂ a agua, hidroperóxidos de ácidos grasos (ROOH) a sus correspondientes alcoholes orgánicos (ROH) y peroxinitrito a nitrito (NO₂⁻) (reacción (2)), con eficiencia catalítica variable dependiendo de la subfamilia (89).



Las Prxs son enzimas muy abundantes en la célula (~1% de las proteínas celulares solubles) (90), que muestran constantes de velocidad de reducción de peróxidos muy rápidas, en el rango de 10⁴-10⁸ M⁻¹.s⁻¹, lo que las vuelve importantes reguladoras de los niveles de peróxidos intracelulares (91).

Todas las Prxs tienen por lo menos un residuo de cisteína crítico para la catálisis, la cisteína peroxidática ubicado en un motivo conservado universalmente en el sitio activo de la enzima en una secuencia (Pxxx(T/S)xxC) (88).

A las peroxirredoxinas que solo requieren la C_P para la catálisis se las conoce como peroxirredoxinas de una cisteína "1-Cys" y a las

peroxirredoxinas que requieren además otro residuo de cisteína, llamado cisteína resolutive (C_R), se les conoce como peroxirredoxinas de dos cisteínas “2-Cys” (91). Estas últimas se diferencian en dos grupos, “2-Cys típicas” donde la C_P y la C_R se encuentran en diferentes subunidades y “2-Cys atípicas” donde la C_P y la C_R forman parte de la misma subunidad proteica (90).

La C_P de las Prxs tiene un pK_a bajo ≤ 6.3 , debido en parte a la presencia en el sitio activo de residuos de arginina conservados, cargados positivamente. De esta forma la C_P predomina en estado tiolato, actuando como un fuerte nucleófilo para atacar el peróxido (92, 93). A su vez el tiolato se encuentra formando enlaces de hidrógeno con una treonina conservada del sitio activo y de esta forma la tríada catalítica logra alcanzar estabilidad (94). El sitio activo de las Prxs también conserva un residuo de prolina que parece estar implicado en limitar el acceso de solvente a su interior y de este modo proteger a los productos intermedios formados durante la reducción del peróxido, de reacciones con otros tioles (95).

El bajo pK_a de la C_P no alcanza para explicar la gran diferencia de reactividad frente a peróxidos de C_P de Prxs (hasta siete órdenes de magnitud comparado con la cisteína libre). Es por ello que se considera que la arquitectura que dispone el sitio activo de la enzima y los aminoácidos implicados juegan un rol fundamental en la alta reactividad frente a peróxidos. Estudios exhaustivos estructurales indicaron que al menos parte de la alta reactividad con H_2O_2 se explica por la estabilización del estado de transición mediante la formación de una compleja red de puentes de hidrógeno donde participan los residuos de la tríada catalítica (96). Esto ha sido confirmado por estudios computacionales y determinaciones de parámetros de activación experimentales que muestran que la enzima reduce notoriamente la

energía libre de activación de la reacción de peróxido de hidrógeno con la C_P respecto a la Cys libre (97).

Las peroxirredoxinas se clasifican en seis subfamilias diferentes en base a homología de secuencia, ellas son: **Prx1/AhpC**, **Prx6**, **Prx5**, **Tpx**, **BCP/PrxQ** y **AhpE** (<http://www.csb.wfu.edu/prex/>), (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). La Prx objeto de este trabajo, Prx3 mitocondrial, es miembro de la primera subfamilia.

1.3.1 Ciclo catalítico:

Las Prxs catalizan reacciones bisustráticas por un mecanismo de tipo ping-pong. La enzima reducida se encuentra mayoritariamente en una conformación conocida como “fully folded” (FF), el sustrato posicionado en el sitio activo es atacado por la C_P para formar ácido sulfénico (C_P -SOH) y como producto agua, alcohol o nitrito (dependiendo del peróxido en cuestión) (98). Una vez oxidada la enzima un desplegamiento de la estructura alrededor de la C_P favorece la adquisición de una conformación parcialmente desplegada o “locally unfolded” (LU), que en el caso de las Prxs de 2-Cys aproxima el C_P -SOH a la C_R conduciendo a la formación de un enlace disulfuro y agua como producto secundario (Figura 3). Dependiendo si es una Prx 2-Cys típica o atípica se formará un disulfuro intersubunitario o intrasubunitario, respectivamente (91). En las Prx del tipo 1-Cys el tiol resolutivo proviene de otra proteína o de tioles de bajo peso molecular como el glutatión (91).

Si bien los diferentes tipos de Prxs han conservado la estructura del sitio activo y todas comparten el mismo mecanismo catalítico, se diferencian en la forma de reciclaje: las peroxirredoxinas del tipo “1-Cys” son reducidas directamente por reductores endógenos presentes en la célula, como glutatión y ascorbato (99), mientras que en las peroxirredoxinas del tipo “2-Cys” el enlace disulfuro formado entre la C_P y la C_R es reducido

principalmente por tiorredoxina (Trx) o por otras oxido-reductasas de la superfamilia Trx (100). Como resultado la Prx vuelve mayoritariamente a su conformación (FF) (Figura 3).

La forma oxidada de la Trx es reciclada nuevamente a su forma reducida por la enzima Trx reductasa (TR), flavoproteína que en mamíferos contiene un residuo de selenocisteína implicado en la reducción del enlace disulfuro en el sitio activo de la Trx a expensas de NADPH (101).

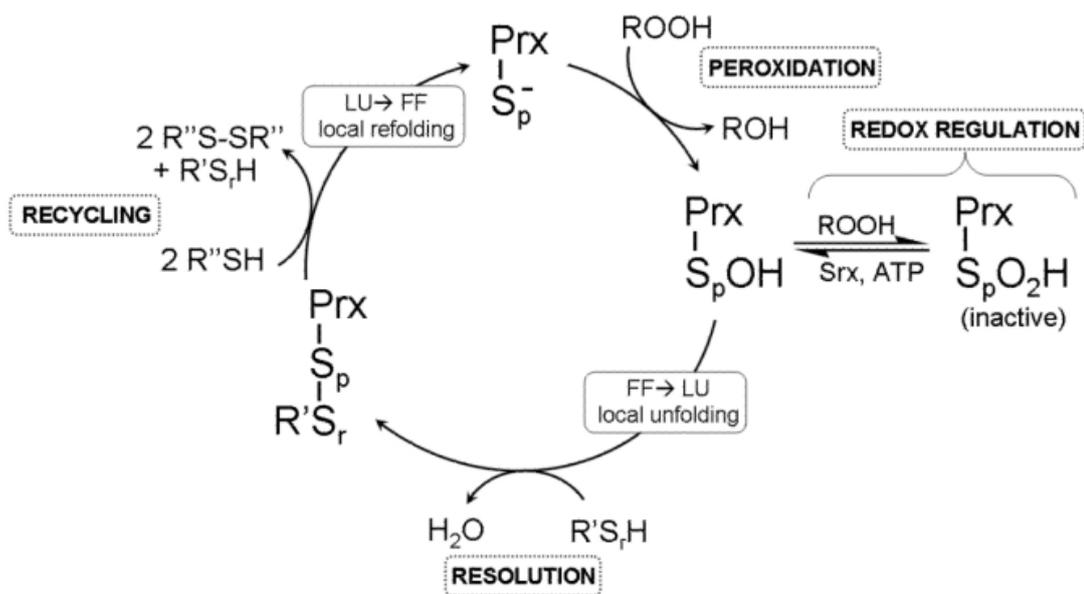


Figura 3: Mecanismo catalítico de Prxs: La cisteína peroxidática (C_p) de la Prx reduce el peróxido formando ácido sulfénico ($C_p\text{SOH}$) (Peroxidación), el cual posteriormente reacciona con un tiol resolutivo ($R'_C R_H$) proveniente de la misma o de otra subunidad proteica, para formar un enlace disulfuro (Resolución). La Prx completa su ciclo catalítico volviendo a su conformación inicial al ser reducida por Trx o alguna oxido-reductasa similar (representada como R'') (Reciclaje). En un principio la enzima reducida se encuentra mayoritariamente en una conformación totalmente plegada (FF) pero una vez oxidada se favorece la adquisición de una conformación localmente desplegada (LU). En exceso de

peróxido, una segunda molécula del mismo puede oxidar el $C_P\text{SOH}$ para formar ácido sulfínico ($C_P\text{SO}_2\text{H}$) inactivando la Prx. La enzima Srx cataliza la reducción de la forma inactiva $C_P\text{SO}_2\text{H}$ a $C_P\text{SOH}$ mediante una reacción dependiente de ATP. Tomado de referencia (102).

1.3.2 Hiperoxidación:

Las Prxs 2-Cys típicas eucariotas, a diferencia de lo que ocurre en procariotas, son más susceptibles a hiperoxidarse en presencia de exceso de peróxido, esto se debe a que las primeras tienen un extremo C-terminal más extenso, con una α -hélice adicional ($\alpha 7$) que contiene un motivo 'YF' que interactúa con un motivo conservado (GGLG) presente en un bucle vecino de la C_P , que retrasa la formación del enlace disulfuro y brinda la oportunidad de que el $C_P\text{-SOH}$, intermediario del ciclo catalítico, reaccione antes con otra molécula de peróxido, oxidándolo para dar $C_P\text{-SO}_2\text{H}$, forma catalíticamente inactiva de la enzima (103). Las sulfirredoxinas (Srx), enzimas citosólicas de 13 KDa, expresadas en la mayoría de los organismos eucariotas y en algunas cianobacterias (104), son capaces de reducir la forma sobreoxidada e inactiva de las Prxs 2-Cys a $C_P\text{-SOH}$ mediante una reacción dependiente de ATP que ocurre muy lentamente ($k_{\text{CAT}} = 0.18 \text{ min}^{-1}$) (43, 105, 106) (Figura 3).

Una estructura cristalina del complejo Prx-Srx muestra que el extremo C-terminal de la Prx se despliega y se envuelve alrededor de la parte trasera de la Srx lejos de su sitio activo, y la C_P -Prx se dispone en el bolsillo del sitio activo de la Srx (Gly-Cys-His-Arg), cerca del ATP unido (107-109).

Incluso cuando los niveles de peróxido son muy altos, el ácido sulfínico ($C_P\text{-SO}_2\text{H}$) se puede oxidar de forma irreversible a ácido sulfónico ($C_P\text{-SO}_3\text{H}$).

Ciertos estudios indican la capacidad de algunas Prxs de manifestar actividad de chaperona celular una vez que se hiperoxidan en presencia

de nivel altos de peróxidos. De esta forma, durante la hiperoxidación por un lado se estaría reprimiendo la actividad peroxidasa y a la misma vez se estaría adquiriendo la actividad de chaperona de la enzima (110). Por otro lado, otros estudios indican que no es necesaria esta hiperoxidación para la funcionalidad chaperona, al menos en algunas Prxs (111).

1.3.3 Peroxirredoxinas en eucariotas:

Existen seis isoformas diferentes de Prxs en eucariotas, las cuales se ubican en diferentes compartimentos celulares, **Prx1**, **Prx2** y **Prx6** predominan en el citosol, **Prx3** es exclusivamente mitocondrial, **Prx4** se expresa en el retículo endoplasmático y también es secretada, **Prx5** predomina tanto en citosol, mitocondria y peroxisomas (89). En muchas células, la mitocondria es el sitio donde se da la mayor producción de especies reactivas del oxígeno-nitrógeno. Este organelo cuenta con importantes sistemas antioxidantes enzimáticos, que incluyen la MnSOD, las peroxidases dependientes de tioles Prx3 y Prx5, así como glutatión peroxidases Gpx1 y Gpx4 dependientes de selenol que se expresan tanto en el citosol como en la mitocondria (112, 113). Adicionalmente, la catalasa se expresa en mitocondrias de cardiomiocitos (114).

1.4 Peroxirredoxina 3 humana:

La Prx3 humana es codificada por un gen localizado en el cromosoma 10 que da como producto una proteína que contiene 256 aminoácidos con un extremo N-terminal de 61 aminoácidos, el cual se escinde para dar lugar a una proteína madura de 21539.5 Da. La C_P es el residuo aminoacídico 47 de la proteína madura, y se encuentra localizado en una región altamente conservada, mientras que la C_R es el residuo 168 localizado en el extremo C-terminal de la proteína (115).

1.4.1 Catálisis:

La Prx3 es una peroxirredoxina del tipo “2-cys” típica, que adopta una estructura dodecamérica donde la unidad funcional es un homodímero orientado “cabeza-cola”, y utiliza para su ciclo catalítico un residuo de cisteína peroxidática (C_P) y un residuo de cisteína resolutive (C_R) que se encuentran en subunidades opuestas dentro del homodímero (115).

La Prx3 oxidada puede ser reducida a su forma nativa por Trx2 mitocondrial o por glutarredoxina 2 mitocondrial (Grx2) por un mecanismo ditiólico. Ambas reductasas muestran constantes catalíticas de reducción de Prx3 similares. A diferencia de Trx2, Grx2 puede catalizar también la formación o reducción de disulfuros mixto con GSH mediante un mecanismo monotiólico (116).

El disulfuro formado en el sitio activo de la Trx2 oxidada es reducido por la TR2 mitocondrial mediante una reacción dependiente de NADPH. Por su parte las Grxs se reducen por GSH, cuya forma oxidada se regenera por la GSH reductasa (GR) (116).

Se conoce que la Prx3 tiene un potencial de reducción de -290 mV (117) y que para reducirse a su forma nativa requiere de un reductor fuerte como lo es la Trx2 mitocondrial, que tiene un potencial de reducción de -292 mV (118). Como Trx2 se encuentra en concentraciones más bajas que las Prxs, en presencia de niveles altos de peróxidos podría llegar a ser un factor limitante para la renovación de la actividad peroxidasa de Prx3.

1.4.2 Hiperoxidación:

Prx3 junto a Prx1, Prx2 y Prx4 componen el grupo de Prxs 2-Cys típicas eucariotas susceptibles a inactivación por hiperoxidación en presencia de

exceso de peróxido. Experimentalmente, Prx3 muestra mayor resistencia a hiperoxidarse por H_2O_2 que Prx1 y Prx2 citosólicas, como consecuencia de la rápida formación del enlace disulfuro intermolecular entre la C_P oxidada y la C_R , atribuido a la presencia de residuos únicos adyacentes a la C_R -229 de Prx3 (Asn-232, Thr-234, Asp-236 y Pro-238). Dado que la mitocondria proporciona un ambiente altamente oxidante, evolutivamente la rápida formación del enlace disulfuro protegería a la Prx3 de la inactivación por hiperoxidación (119, 120).

Como se mencionó antes, la forma hiperoxidada e inactiva de las Prxs 2-Cys típicas, incluida la Prx3, es reducida por la enzima sulfirredoxina citosólica (Srx) mediante una reacción lenta dependiente de ATP. La Srx se transporta desde el citosol a la mitocondria mediante un mecanismo que implica la formación de un complejo disulfuro con la proteína 90 de choque térmico, lo cual es promovido por la liberación de peróxido desde la mitocondria. Si bien *in vitro* Prx3 es más resistente a la hiperoxidación que Prx1 y Prx2 citosólicas, estudios recientes *in vivo* indican que Prx3 es la única Prx hiperoxidada detectada en diferentes tejidos de ratón en condiciones normales (121). También se conoce que Prx3 hiperoxidada tiene una velocidad de reducción más lenta que Prx1 y Prx2 (122).

1.4.3 Estructura:

La Prx3 se caracteriza por formar estructuras cuaternarias complejas como la estructura toroidal dodecamérica que se muestra en la Figura 4 A (123, 124). A diferencia de Prx3 que forma toroides de 12 unidades monoméricas, otras Prxs 2-Cys típicas como Prx1 y Prx2 tienden a formar toroides de 10 monómeros (decaméricos) (125, 126).

Estudios *in vitro* mostraron que toroides de Prx3 pueden apilarse para formar filamentos o entrelazarse entre sí para formar estructuras más complejas (125).

Como en otras Prxs, Prx3 en estado monomérico tiene una estructura globular compacta que dispone de una hoja β con siete giros de hebra rodeado por cuatro α -hélice. En la primer vuelta del extremo N-terminal de la α 2 hélice se sitúa el residuo de cisteína peroxidática (Figura 4 B) (125).

La formación de oligómeros de Prx3 y otras Prxs 2-Cys, depende de varios factores intracelulares como pH, concentración salina, fosforilación, y principalmente de la concentración de la enzima y de su estado redox. A concentraciones bajas predomina la forma dimérica de la enzima mientras que a mayores concentraciones se favorece la formación de toroides de Prxs (127). Por su parte la formación de dímeros de Prxs se favorece cuando la enzima se encuentra en estado oxidado (reversible), mientras que la formación de toroides se ve favorecida cuando se encuentra en estado reducido (124, 128).

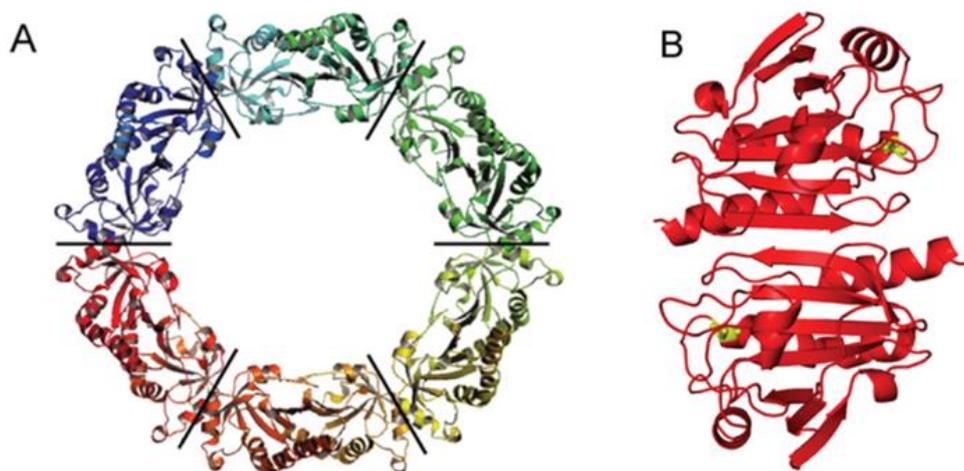


Figura 4: Estructuras cristalinas de Prx3 mitocondrial **A)** Estructura toroidal dodecamérica compuesta por seis unidades diméricas de Prx3 bovina. **B)** Dímero de Prx3 bovina. Tomado de referencia (125).

1.4.4 Funciones de Prx3:

1.4.4.1 Defensa antioxidante:

La Prx3, conjuntamente con la Prx5 juega un papel muy importante en la defensa antioxidante de la mitocondria ya que catalizan la reducción de diferentes peróxidos formados en condiciones de estrés nitro/oxidativo, incluyendo peróxido de hidrogeno, hidroperóxidos orgánicos y probablemente peroxinitrito (éste último al menos para la Prx5).

Con objetivo de investigar las funciones que tiene Prx3 en las células, se han realizado diferentes experimentos *in vivo* donde se altera la expresión de la enzima y se evalúan los efectos consecuentes. Células con sobreexpresión de Prx3 mostraron disminución en los niveles de ERO-ERN y en la peroxidación lipídica así como resistencia a la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno, hipoxia, factor- α de necrosis tumoral (TNF α) y drogas productoras de ERO (129, 130).

Estudios en ratones 'Knockout' para Prx3 e inoculados con lipopolisacáridos (LPS) para inducir inflamación, sugieren que Prx3 es necesaria para la protección de los macrófagos frente al estrés oxidativo (131).

La sobreexpresión de Prx3 en células nerviosas de hipocampo en modelos animales, mostró efectos neuroprotectores frente a la citotoxicidad mediada por glutamato (que probablemente implica la producción de peroxinitrito) inhibiendo la nitración de proteínas (132). De estos resultados se infirió que la Prx3 es capaz de reducir peroxinitrito, pero hasta el momento no hay estudios directos de dicha reactividad.

Ratones transgénicos con sobreexpresión de Prx3 mitocondrial mostraron una buena regulación de la homeostasis de la glucosa una vez suministrada en la dieta (133). Estos ratones también exhibieron una modulación en la actividad de la vía de señalización de fosfoinositol 3-

quinasa (P13K), sugiriendo que Prx3 participa en mecanismos de señalización celular (133). También se observó que las células que sobreexpresaron Prx3 reducían notoriamente los niveles de peróxido conduciendo a un incremento en la resistencia a la muerte celular programada inducida por apoptosis y stress (133).

Estudios en diferentes fenotipos de cáncer humano han revelado la sobreexpresión de diferentes Prxs (134, 135). Estas peroxidases proporcionan al tejido canceroso defensas antioxidantes contra el estrés nitro-oxidativo favoreciendo el desarrollo y proliferación del tumor. Por su parte la ausencia de Prxs conduce al desarrollo de carcinomas, linfomas y sarcomas lo que sugiere que Prxs también actúan como supresores de tumores (136, 137).

1.4.4.2 Señalización redox mediada por Prx3:

Algunas características particulares de las Prxs tales como la existencia de diferentes mecanismos de regulación de su actividad peroxidasa hicieron sospechar que estas enzimas no solo participan en la detoxificación de peróxidos para prevenir el estrés nitro-oxidativo sino que también participan en mecanismos celulares de señalización redox (103, 138, 139).

Con respecto a Prx3, peroxidasa de nuestro interés, existen indicios de su participación en señalización redox mitocondrial, que si bien aún no se ha confirmado, sigue siendo objeto de intensa investigación en la actualidad. En la Figura 5 se ilustran las diferentes vías de señalización redox mitocondrial postulados para Prx3 (115).

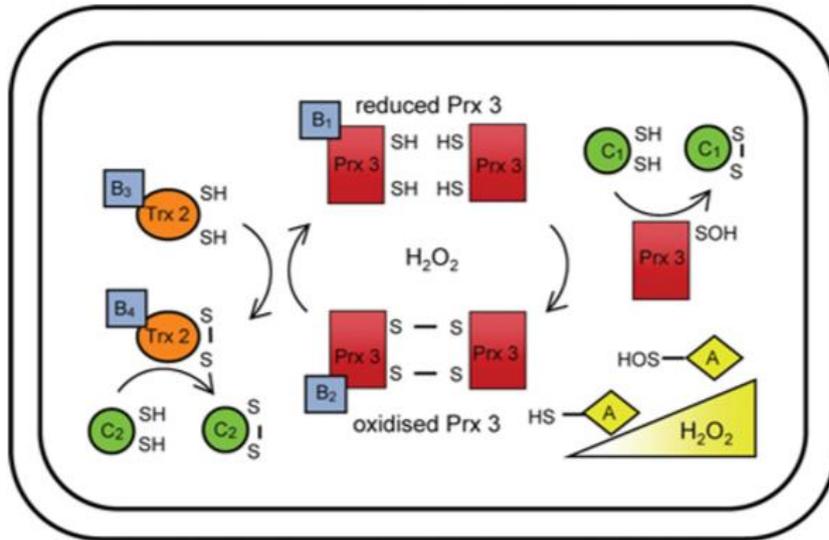


Figura 5: Mecanismos de señalización redox mitocondrial mediado por Prx3: **1)** La Prx3 hiperoxidada conduce a la acumulación de peróxido de hidrogeno que oxidara otras proteínas diana menos reactivas (A). **2)** La señal transmitida depende del estado redox de Prx3 porque las proteínas diana se unen de forma selectiva a Prx3 reducida u oxidada (B1 y B2). **3)** La Prx3 oxidada facilita la oxidación de tioles de proteínas diana menos reactivos (C1). Durante la reducción de Prx3, Trx2 se oxida parcialmente, lo cual interfiere en la interacción de Trx2 con proteínas diana de señalización (B3 y B4) y en el estado redox de proteínas (C2) dependientes Trx2. Tomado de referencia (115)

1.4.5 Especificidad de sustrato oxidante de Prx3:

I. Prx3 y Peróxido de hidrógeno:

La Prx3 reduce el peróxido de hidrógeno (mitocondrial) con una constante de velocidad de $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (117), dos órdenes de magnitud más rápidamente que la reducción por Prx5 ($3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (140).

Un análisis de cinética de competencia realizado para los diferentes reductores de H_2O_2 de la mitocondria, considerando reportes de la

concentración intramitocondrial así como sus constantes de velocidad de reducción (115), sugiere que ~ 90% del peróxido de hidrógeno mitocondrial es reducido por la Prx3 (141, 142) (Tabla 1). Esto ocurriría inicialmente, considerando un 100% de enzima reducida. En condiciones de estrés oxidativo, si la capacidad de reducción de la enzima se satura o la Prx3 se inactiva por hiperoxidación, la fracción de H₂O₂ que reacciona con la Prx podría disminuir. De esa manera, la Prx3 podría regular también la salida de H₂O₂ desde la mitocondria al citosol (121).

Si bien la concentración de peroxidasas varía entre diferentes líneas celulares, un estudio realizado en diferentes tipos de tejidos murinos muestra que Prx3 es siempre la peroxidasa más abundante (143) y su concentración ha sido estimada como cercana a 60 μM (115).

Tabla 1: Cinética comparativa entre diferentes peroxidasas y reducción de H₂O₂ mitocondrial. Tomado de referencia (115).

Peroxidasa mitocondrial	Concentración intracelular	k de reducción de H ₂ O ₂ (M ⁻¹ .s ⁻¹)	% H ₂ O ₂ mitocondrial reducido
Prx3	60 μM	2 X 10 ⁷	90
Prx5	20 μM	3 X 10 ⁵	0.45
Gpx1	2 μM	6 X 10 ⁷	9
Gpx4	2 μM	3 X 10 ⁶	0.45
Catalasa	1.4 nM	1.6 X 10 ⁷	0.0017

II. Prx3 e hidroperóxidos de ácidos grasos:

Si bien la constante de reducción de hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BOOH) e hidroperóxido de cumeno (CumOOH) por Prx3 aún no se ha reportado,

ensayos de actividad enzimática acoplado a Trx2 muestran que Prx3 descompone éstos peróxidos con una actividad enzimática de ~ 80% a la que muestra cuando el sustrato es H₂O₂ (128). El hallazgo de que Prxs 2-Cys típicas son hiperoxidadas por hidroperóxidos lipídicos producidos por la actividad enzimática de lipooxigenasas y ciclooxigenasas celulares, permite sostener la hipótesis de que Prx3 participaría en la detoxificación de hidroperóxidos de ácidos grasos (144).

III. Prx3 y peroxinitrito:

Las altas constantes de velocidad de reducción de peroxinitrito reportadas hasta el momento para diferentes Prxs, tanto procariontas como eucariotas, sugieren que Prx3 podría ser altamente reactiva frente a este sustrato. Prx2 muestra una velocidad de reducción peroxinitrito de $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.4, 25°C, ~ 10 veces más lenta de la que exhibe para la reducción peróxido de hidrogeno ($1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), a pH 7.4, 25°C (145). Por su parte Prx5 descompone el peroxinitrito con una constante de velocidad sumamente rápida de $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.8, pH cercano al de la matriz mitocondrial (140).

La determinación de la constante de velocidad a la cual Prx3 reduce el peroxinitrito es uno de los objetivos de esta tesina.

Por otra parte, la inactivación por hiperoxidación de la C_P puede ser causada por exceso de oxidantes diferentes a H₂O₂, desconociéndose si la Prx3 es susceptible de hiperoxidarse por peroxinitrito.

Finalmente, se desconoce la susceptibilidad de Prx3 a la nitración por peroxinitrito y sus posibles consecuencias estructurales y funcionales, si bien ha detectado nitrada en corazones de ratones diabéticos, patología en la que se ha demostrado incrementos en la formación mitocondrial de peroxinitrito (146).

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo General:

- Contribuir a la comprensión de los mecanismos de detoxificación de peroxinitrito en mitocondria.

2.2 Objetivos Específicos:

- Poner a punto la purificación de Prx3 mitocondrial humana carente de cola de histidina.
- Caracterizar la actividad peroxinitrito reductasa de Prx3.
- Evaluar posibles modificaciones postraduccionales nitro-oxidativas de Prx3 (nitración de residuos de tirosinas e hiperoxidación de C_P) durante la interacción con peroxinitrito.

3 MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 MATERIALES:

-Para todos los experimentos utilizamos agua de alto grado de pureza (nanopura).

-Columnas de cromatografía: HiTrap chelating H de 5 mL, Hitrap desalting de 5 mL, compradas a Sigma Aldrich.

-Medios de cultivo: Se utilizaron medios de cultivo LB (20 gr/L) con kanamicina (30 mg/mL) y con cloranfenicol (30 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL).

-Reactivos: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), 4-ditiotreitól (DTT), pentaacetato de dietilentriamina (DTPA), N-etilmaleimida (NEM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de calcio (CaCl₂), dióxido de manganeso (MnO₂), glutatión (GSH), ADNasa y catalasa fueron comprados a la empresa Sigma. El imidazol ((CH)₂N(NH)CH) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) fueron comprados a la empresa AppliChem. El reactivo de bloqueo comercial se compró a la empresa Li-Cor Biosciences.

La peroxidasa de rábano (250-330 U/mg) (HRP) fue comprada a la empresa Sigma y el boronato de cumarina (CBA) (26,3 mM) fue sintetizado por Natalia Ríos (estudiante de Postgrado de PEDECIBA Química) en nuestro laboratorio.

-Buffers:

- Buffer A (1X): 0.5 M NaCl, 50 mM fosfato de sodio, pH 7.6
- Buffer B (1X): 1 M imidazol, 0.5 M NaCl, 50 mM fosfato de sodio, pH 7.
- Buffer de lisis-A: buffer A + 10mM imidazol.
- Buffer de lisis-B: 50 mM fosfato de sodio, 300 mM NaCl, pH 7.6.
- Buffer de diálisis-1: 50 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7.4

- Buffer de diálisis-2: 20 mM fosfato de sodio, pH 8.0, 100 mM NaCl.
- Buffer de proteólisis TEV proteasa: 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, pH 7.5.
- Buffer de almacenamiento TEV proteasa: 25 mM fosfato de sodio pH 7.0, NaCl 200 mM, 2 mM DTT, 2 mM EDTA.
- PBS (10X) pH 7.4: 1.36 M NaCl, 0.03 M KCl, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.17 M KH₂PO₄.
- Buffer de carga (10X) pH 8.3: 144.2 g/L Glicina, 30.3 g/L Tris, 10 g/L SDS.
- Buffer de transferencia con SDS pH 8.3: 150 mL Buffer de carga (10X) (Tris Glicina con SDS, pH 8.3) + 300 mL metanol + H₂O hasta llegar a 1.5 L.
- Buffers de muestra (2X):
 - Con agente reductor: 2.5 mL buffer 1.25 M Tris-HCl, pH 6.8 + 1 g SDS + 2.5 mL de 2-mercaptoetanol + 5.8 mL glicerol 87% + 5 mg azul de bromofenol + 35 mL agua destilada.
 - Sin agente reductor: igual al anterior pero quitando el 2-mercaptoetanol.

Para preparar los diferentes buffer las siguientes sales utilizadas fueron compradas a la empresa Sigma: fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), fosfato de potasio dibásico (KH₂PO₄), cloruro de sodio (NaCl), Tris/HCl.

-Sustratos oxidantes de Prx3:

El peroxinitrito fue sintetizado previamente en nuestro laboratorio, mezclando nitrito con peróxido de hidrógeno en medio ácido y atrapando rápidamente utilizando NaOH. Para todos los experimentos las soluciones alcalinas de peroxinitrito fueron tratadas previamente con dióxido de manganeso para eliminar posibles trazas de H₂O₂ presente, y la concentración fue calculada midiendo absorbancia a 302 nm y considerando $\epsilon_{\text{ONOO}^-}(302\text{nm}) = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (32, 147).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fue comprado a la compañía Mallinckrodt y fue cuantificado midiendo absorbancia a 240 nm y considerando $\epsilon_{H_2O_2}$ (240nm) = $43.6 M^{-1}.cm^{-1}$ (148).

-Anticuerpos: El anticuerpo primario anti 3-nitrotirosina fue sintetizado en nuestro laboratorio (149). El anticuerpo primario anti-sulfínico/sulfónico (ab16830) fue comprado a la empresa AbCam. El anticuerpo secundario anti-rabbit-680 fue comprado a la empresa LI-COR Biosciences.

-Marcador de peso molecular (MPM): Se utilizó el MPM Chameleon Duo. pre-stained. Protein Ladder (928-60.000) comprado a la empresa LI-COR Biosciences (Figura 6).

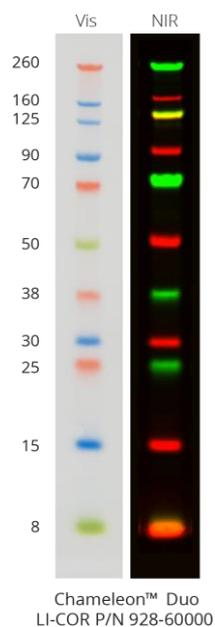


Figura 6: MPM: Incluye 11 bandas de proteínas de 8 a 260 kDa. Tomado de (https://www.licor.com/bio/products/reagents/protein_markers/chameleon_duo.html)

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 Transformación, expresión y purificación de Prx3 humana:

El gen que codifica para Prx3 humana sin la secuencia de señalización a la mitocondria (AA 1-61), con cola de histidina y sitio de corte para Tev proteasa (Tobacco Etch Virus) en el vector de expresión pET-28a (<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>) fue gentilmente cedido por C. Winterbourn, Universidad de Christchurch, Nueva Zelanda y se transformó en la cepa *E.coli* L21 star (Figura 7).

La construcción tiene un sitio de corte para Tev proteasa la cual escinde la cola de histidina dejando a continuación del corte un residuo de serina y tres residuos de glicina, además de la secuencia de Prx3, por lo que se simboliza +4. Esta construcción tiene mejores rendimientos de proteólisis que dejando únicamente un residuo de serina después del corte (+1).

```
GAATTCGAAAACCTGTATTTTCAGTCGGGAGGAGGAGGAgcacctgctgcacc
agcatgcaccctattttaagggtacagccggtgtcaatggagaggtcaaagacctaagccttgatgac
ttaaggggaaatatttgggtgcttttctctatcctttggattcacctttgtgtgtcctacagaaattgttgcctt
tagtgacaaagctaacgaattcacgatgtgaactgtgaagttgtcgcagtctcagtggtattcccacttt
agccatcttgctggataaatacaccaagaaagaatgggtggttgggccacatgaacatcgactct
tgtcagacttaactaagcagatttcccgagactacgggtgtgctgtagaaggttctggtcttgactaag
aggtctctcataattgacccaatggagtcacatcaagcatttgagcgtcaacgatctcccagtgggcc
gaagcgtggaagaaaccctccgcttgggtgaaggcgttccagtatgtagaaacacatggagaagtc
tgcccagcgaactggacaccggattctcctacgatcaagccaagtccagctgcttccaaagagtagc
ttcagaaggtaaatacagtgactcgcag
```

Figura 7: Secuencia nucleotídica del inserto de Prx3 en pET-28a (+4).

A partir de la secuencia nucleotídica de Prx3 (Figura 7), se obtuvo la secuencia aminoacídica de Prx 3 utilizando el programa ExPASy-

Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>), donde se señala el sitio de corte por TEV proteasa (Figura 8).



Figura 8: Secuencia aminoacídica de Prx3 donde se señala el sitio de corte TEV proteasa.

Utilizando el programa ExPASy- ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), se calculó el PM para Prx3 con la cola de histidina escindida, el cual corresponde a **21797.7 Da**. La diferencia en masa con respecto a la proteína madura (21539.5 Da) es la esperada por la presencia de los 4 residuos adicionales.

I. Preparación de células competentes y transformación:

- Se realizó un precultivo en 3 mL de LB a partir de una colonia aislada de *E.coli* BL21 star y se dejó crecer hasta un D.O. de aproximadamente 0.4 UA.
- Se centrifugó a 10000g durante 1 minuto para bajar las células.
- Se resuspendió en 100 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril frío.

- Se centrifugó a 10000 g durante un minuto. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 100 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril frío.
- Se agregó 100 ng de plásmido (pET-28a) con el inserto del gen de Prx3 humana y se incubó 60 minutos en hielo.
- Se incubó por 3 minutos a 37°C.
- Se incubó por 3 minutos en hielo.
- Se agregó 400 mL de LB sin antibiótico e se incubó 1 hora a 37°C a 220 rpm.
- Se cultivó las células en placas con medio selectivo (LB agar con kanamicina 30 µg/ml).

II. Expresión de Prx3 humana:

- Precultivo: se inocularon 20 mL de LB estéril con kanamicina (30 µg/mL) con 100 µL de inóculo de *E.coli* BL21 star transformada y se incubó toda la noche a 37 °C, con agitación.
- Al día siguiente se adicionó el precultivo a 2 L de LB estéril más kanamicina (30 µg/mL), y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.9 UA a 600 nm, 3-4 hr.
- Se indujo con IPTG (0.75mM), a 26°C, 4-6 hr.
- Se centrifugó 30´ a 8000 rpm, 4°C, y se guardó el pellet congelado.

III. Purificación de Prx3 humana:

- Se resuspendió el pellet congelado en buffer de lisis-A (20 mL/pellet de litro de cultivo). Se agregó inhibidor de proteasa 0.2 mM de PMSF (200 mM) y 100 µL de ADNasa.
- Se lisaron las células sonicando en frío con 5 ciclos de 30 segundos (Intensidad = 4, Duty cycle 40%).

- Se centrifugó el lisado 30 minutos a 8000 rpm y 4°C.
- Se filtró el sobrenadante.
- Trabajando en la cámara fría se continuó la purificación utilizando una columna Hitrap chelating de 5 ml previamente cargada con níquel (Ni^{2+}) y equilibrada con buffer A con 10 mM Imidazol:
 - 1) Se pasó el sobrenadante filtrado, fracción “Flow through” .
 - 2) Se lavó la columna con 80 mL de buffer A + 5 mM Imidazol.
 - 3) Se lavó la columna con 80 mL de buffer A + 20 mM Imidazol.

 - 4) Se lavó la columna con 10 mL de buffer A + 50 mM Imidazol.
 - 5) Se lavó la columna con 10 mL de buffer A + 100 mM Imidazol.
 - 6) Se eluyó la proteína utilizando 15 mL (o más) de buffer A + 500 mM Imidazol. En este punto se recolectó en alícuotas de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm.
 - 7) Se regeneró la columna antes de guardarla.
- Se dializó en buffer de diálisis-1 las alícuotas con absorbancia > 0.5 UA recolectadas en el punto 6: en 2 L toda la noche a 4°C y a continuación en 2 L, 4hr a 4°C.
- Luego se congeló la enzima en alícuotas de 1 mL a -80°C.
- Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras para ver la pureza de la enzima.

3.2.2 Expresión y purificación de TEV proteasa:

- Las bacterias Rosseta (DE3)pLys transformadas con el vector pTH24 (Gateway) modificado conteniendo el gen de la proteasa TEV desarrollado por Van der Berg (150), se obtuvieron de Marcelo Comini, Instituto Pasteur Montevideo.

I. Expresión de Tev proteasa:

- Precultivo: se inocularon 20 mL de LB estéril con cloranfenicol 40 mg/ml y ampicilina 100 mg/ml con 100 μ L de croinóculo de Rosseta (DE3)pLys transformada y se incubó toda la noche a 37 °C, con agitación.
- Se dejó crecer el precultivo en 2 L de LB estéril con cloranfenicol 40 mg/ml y ampicilina 100 mg/ml a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de ~ 0.6 UA.
- Se indujo con IPTG (1 mM) a 20 °C y se agitó a 230 rpm toda la noche (máximo 20 hrs).
- Se centrifugó 20 minutos a 4000-5000 g, 4°C y se guardó el pellet congelado.

II. Purificación de Tev proteasa:

- Se resuspendió el pellet congelado en buffer de lisis-B (20 mL/pellet de litro de cultivo). Se agregó 0.2 mM de inhibidor de proteasa PMSF (0.2 mM).
- Se lisaron las células sonicando en frío 5 ciclos de 30 segundos (Intensidad = 4, Duty cycle 40%).
- Se añadieron 100 μ L de triton-X100 por cada 10 mL de lisado.
- Se centrifugó el lisado 45 minutos a 15000-18000 g a 4°C.
- Se filtró el sobrenadante (0.45 μ m).
- Trabajando en la cámara fría, se pasó el sobrenadante filtrado por una columna de Ni²⁺ previamente equilibrada con buffer A.
- Se lavó la columna con 100 mL de buffer A + 20 mM imidazol.
- Se eluyó la proteína con buffer A + 500 mM imidazol, se recolectó en alícuotas de 1mL y se midió absorbancia a 280 nm.

- Se desalaron las alícuotas con proteína utilizando una columna de exclusión molecular (Hitrap desalting) equilibrada con buffer de almacenamiento de Tev proteasa. A la proteína eluida se le agregó 10% de glicerol, se alícuotó, y se guardó congelada a -80°C.

3.2.3 Corte de cola de histidina de Prx3 con TEV proteasa:

Si bien se consideraba que la cola de histidinas en Prx3 humana recombinante, no interfería con la región del sitio activo de la enzima (implicada en la catálisis), estudios recientes sugieren que la presencia de éstos residuos de histidinas en Prx3, afectan la estructura oligomérica y disminuyen a 1/3 la actividad enzimática de Prx3 (128). Por tanto, para asemejarnos más a las condiciones *in vivo* en la célula, en esta tesina decidimos trabajar con Prx3 sin cola de histidina, escindiendo la misma de la siguiente manera:

Día 1:

Cuantificación de Prx3 y TEV proteasa: se realizó el espectro de absorción (210-440 nm) de cada proteína (dilución 1/10) y se obtuvo el valor de absorbancia a 280 nm. Como conocemos el coeficiente de absorptividad molar ($\epsilon_{\text{PRX3 (280nm)}} = 0.88 \text{ mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ o $21.500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{TEV (280nm)}} = 36.130 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (calculado de acuerdo a la secuencia aminoacídica utilizando la herramienta Protparam de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)), se aplicó la ley de Lambert y Beer, y se calculó la concentración de ambas proteínas.

De acuerdo al volumen de Prx3 purificada se calculó el volumen final requerido para llevarla a una concentración final 2 mg/mL y a partir de este dato se calculó de volumen de TEV proteasa necesario para mantener una relación 10:1 de Prx3-TEV. El volumen final calculado se

completó con buffer de corte. La mezcla Prx3, TEV proteasa y buffer de corte se dejó agitando lentamente toda la noche a 4°C.

Previamente se probaron diferentes condiciones de corte de cola de histidina de Prx3 con TEV proteasa, tanto 2 horas a 25°C como toda la noche a 4°C y determinó que el mayor rendimiento de corte se da cuando se utilizó esta última condición y una relación Prx3-TEV proteasa de 10:1 con una concentración final de 2 mg/mL para Prx3 (datos no mostrados).

Día 2:

Se dializó la mezcla anterior en 2 L de buffer de diálisis-1 por 4 h a 4°C, seguido en 2 L toda la noche a 4°C, para eliminar el DTT y el EDTA del buffer de corte.

Día 3:

Trabajando en la cámara fría, se utilizó la columna de níquel (Ni^{2+}) regenerada para separar Prx3 cortada, de Tev proteasa, de colas de histidina y de posible enzima sin cortar.

- 1) Se pasó por la columna la mezcla dializada el día 2.
- 2) Se lavó con buffer A + 10 mM imidazol, se recolectó en alícuotas de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm. (Si la enzima no se eluye en este punto, aumentar la concentración de imidazol).
- 3) Se lavó con buffer A + 20 mM imidazol, se recolectó en alícuotas de 1 mL y se midió absorbancia a 280 nm. Usualmente, la Prx3 sin cola eluye en este punto.
- 4) Se lavó con buffer A, 500 mM imidazol para eluir las colas de histidina, Prx3 sin cortar y la TEV proteasa.
- 5) Se regeneró la columna.

A continuación se juntaron las alícuotas recolectadas en el punto 3 y se dializó en 2 L de buffer de diálisis-2 por 4 h a 4°C y en 2 L toda la noche a 4°C para separar la Prx3 del imidazol.

Se realizó una SDS-PAGE en condiciones reductoras para determinar si hubo corte de las colas de histidina de Prx3 y con cuanto rendimiento.

3.2.4 Evaluación de la purificación y escisión de cola de histidinas de Prx3 por espectrometría de masas:

Se comenzó por reducir la enzima incubándola con 2 mM de DTT durante 30 minutos a 4°C y cuantificarla a partir de la medida de absorbancia a 280 nm. A continuación la muestra de Prx3 (15 µM) en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7.8 se desaló usando microcolumnas de filtración molecular (biospines) (Bio-Rad), equilibrados en buffer bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) 10 mM, pH 7.

Para el uso del espectrómetro de masas contamos con la ayuda de Mauricio Mastrogiovanni, integrante de nuestro laboratorio y de la unidad de espectrometría de masa del CEINBIO. La masa molecular de la Prx3 se determinó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), empleando un sistema cromatográfico Agilent 1200 Infinity series, y un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (ESI-MS) y analizador de triple cuadrupolo, QTRAP 4500, ABSciex, Framingham, MA. La separación de la proteína se realizó inyectando la muestra (volumen de inyección: 5 µL) en una columna de fase reversa C4 (5 µm, 150 x 1 mm de Grace Vydac, Hesperia, CA), con el solvente A (0.1% ácido fórmico en H₂O) y el solvente B (0.1% ácido fórmico en acetonitrilo). El gradiente de elución fue: 0-2 min 5% solvente B, 2-10 min 5 a 50% solvente B, 10-20 min 50% solvente B, 20-21 min 50-5% solvente B y posterior re-equilibrado con la condición inicial durante 14 min. Se utilizó un flujo de 100 µL/min.

El análisis de masas se realizó en modo positivo, con voltaje de electrospray de 5 kV y temperatura de la fuente de 300°C y consistió en

un escaneo simple de 500–1500 m/z, en cuadrupolo 1 (Q1) empleando el software Analyst 1.6.2 (ABSciex, Framingham, MA). Para obtener la masa molecular de la proteína mediante deconvolución de los datos adquiridos se utilizó el software PeakView 2.2 (ABSciex, Framingham, MA).

3.2.5 Ensayo de cinética directo: reducción de peroxinitrito por Prx3 humana

Inmediatamente antes de comenzar el experimento la enzima se redujo mediante la incubación con 2 mM de DTT durante 30 minutos a 4°C. El exceso de DTT se separó de la enzima utilizando una columna de gel filtración HiTrap previamente equilibrada con el buffer de elución fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 + 0.1 mM dtpa + 1 mg catalasa (para minimizar posible contaminación con trazas de H₂O₂) siguiendo la absorbancia a 280 nm. Para evitar la re-oxidación se recolectó en un tubo con tapa y tamaño pequeño de modo de que quede el menor volumen libre posible, y se mantuvo bajo una atmósfera de argón en frío. Se calculó la concentración proteica a partir de la absorbancia a 280 nm.

Se realizó un ensayo de cinética directo siguiendo la descomposición del peroxinitrito (20 µM) preparado en NaOH (20 mM), al mezclarse en forma rápida con buffer (fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa a pH 7.4), en ausencia y presencia de Prx3 reducida (15.6 µM), pH final 7.8, 25°C, siguiendo cambios de absorbancia a 310 nm ($\epsilon_{\text{Peroxinitrito}}(310\text{nm}) = 1600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se decidió trabajar a esta longitud de onda para evitar posibles interferencias derivadas de la absorción de proteínas. Para ello se utilizó un espectrofotómetro/fluorímetro de flujo detenido (Stopped flow Applied Biophysics SX20) disponible en nuestro laboratorio, el cual permite estudiar la cinética de reacciones que ocurren muy rápido en solución (tiempo de mezclado 1.5 milisegundos).

3.2.6 Ensayos de cinética de competencia:

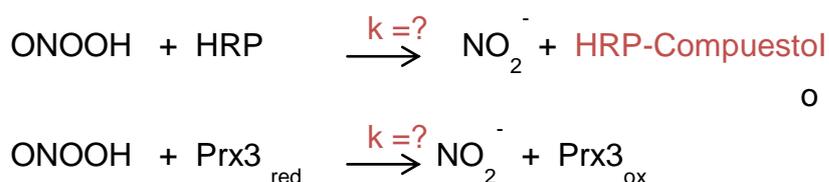
Para calcular la constante de velocidad de reducción de peroxinitrito por Prx3 reducida, se realizaron diferentes ensayos de competencia (con HRP y CBA), y se utilizó el equipo de flujo detenido mencionado anteriormente.

I. Competencia Prx3-HRP:

Se preparó 500 μL de solución de HRP 15 mg/mL y para determinar en forma precisa la concentración de la enzima se realizó una dilución 1/100 en buffer fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa pH 7.4 y se midió la absorbancia a 403 nm, considerando $\epsilon_{\text{HRP}}(403\text{nm}) = 103.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (151).

La HRP al reaccionar con peroxinitrito se oxida por dos electrones para formar compuesto I de HRP produciendo un descenso de absorbancia a 403 nm. Este compuesto es una especie inestable que en presencia de un reductor como por ejemplo el nitrito, se convierte rápidamente en compuesto II de HRP. Como nos interesa determinar únicamente la formación de compuesto I, y que nuestros registros no se vean afectados por cambios de absorbancia durante el pasaje de compuesto I a compuesto II, se siguió la formación de compuesto I de HRP a 398 nm, punto isobético entre ambos compuestos.

Las reacciones durante la competencia entre Prx3 y HRP por peroxinitrito son:



La constante de velocidad de reacción de HRP con peroxinitrito ha sido anteriormente reportada (57), pero varía con las condiciones experimentales y batch de enzima utilizado (152). Se determinó entonces dicha constante bajo las condiciones experimentales utilizadas y para ello se siguió la formación de compuesto I a 398 nm utilizando 1 μ M peroxinitrito y concentraciones en exceso de HRP (5 μ M, 7.5 μ M, 10 μ M y 12.5 μ M). El curso temporal de la reacción se ajustó a una exponencial simple, y las constantes observadas del proceso se graficaron en función de la concentración de HRP para obtener la constante de velocidad de segundo orden entre ambas especies (pendiente de la recta) utilizando el software OriginPro 8.

Por su parte, se siguió la formación de compuesto I de HRP a 398 nm, al incubar peroxinitrito (1 μ M) con HRP (5 μ M) en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Prx3 previamente reducida, en buffer fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa, pH final 7.8, 25°C. Dado que no se utilizaron condiciones de pseudoprimer orden, la constante de velocidad de oxidación de Prx3 por peroxinitrito se calculó utilizando la ecuación 1, tomada de referencia (151), donde k_1 es la constante de velocidad de oxidación de HRP por peroxinitrito, k_2 es la constante de velocidad de oxidación de Prx3 por peroxinitrito, $[A_1]_0$ es la concentración de HRP (5 μ M), $[A_2]_0$ es la concentración de Prx3 (variable), $[P_1]_\infty$ es la concentración de compuesto 1 formado y $[P_2]_\infty$ corresponde a la diferencia entre la concentración de compuesto 1 formado en ausencia de Prx3 y en presencia de Prx3. Los rendimientos de formación de compuesto 1 se calcularon utilizando $\epsilon = 42.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ correspondiente al punto isobético entre compuesto I y compuesto II.

Ecuación 1:

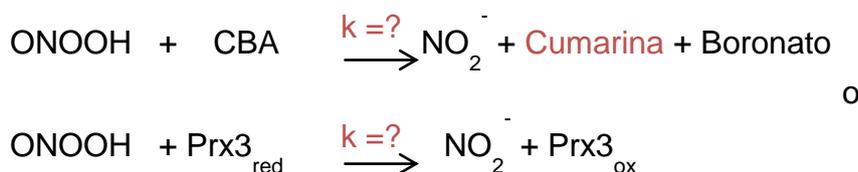
$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln \left\{ \frac{[A_1]_0}{[A_1]_0 - [P_1]_\infty} \right\}}{\ln \left\{ \frac{[A_2]_0}{[A_2]_0 - [P_2]_\infty} \right\}}$$

Alternativamente, considerando que la concentración de HRP utilizada (5 μM) no fue de gran exceso con respecto a la concentración de peroxinitrito (1 μM), también se ajustó el curso temporal de la reacción a una exponencial simple, y las constantes observadas se graficaron en función de la concentración de Prx3 para obtener la constante de velocidad de segundo orden entre Prx3 y peroxinitrito, utilizando el software OriginPro 8.

II. Competencia Prx3-CBA:

A partir de CBA (26.3 mM) disponible en nuestro laboratorio, se preparó una solución de CBA 263 μM en buffer fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa a pH 7.4.

Las posibles reacciones durante la competencia de Prx3-CBA por peroxinitrito son:



El CBA al reaccionar con peroxinitrito es oxidado para formar boronato y cumarina, éste último fluoresce cuando se excita a 332 nm. La constante de velocidad de esta reacción ha sido reportada como $k = 1.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25°C (153). La constante de velocidad de oxidación de CBA por peroxinitrito bajo las condiciones experimentales utilizadas (25°C y pH final: 7.8), se determinó siguiendo la formación de cumarina a 332 nm, utilizando peroxinitrito 0.2 μM y concentraciones de CBA en exceso (5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM).

Como estamos en condiciones de pseudoprimer orden, para calcular la constante velocidad de reacción de Prx3 con peroxinitrito se siguió la formación de cumarina en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Prx3 previamente reducida de forma de evaluar el efecto de la presencia de Prx3 en las constantes observadas para la formación de cumarina. El curso temporal de la reacción se ajustó a una exponencial simple, y las constantes observadas se graficaron en función de la concentración de Prx3 para obtener la constante de velocidad de segundo orden entre Prx3 y peroxinitrito, utilizando el software OriginPro 8.

3.2.7 Evaluación de posibles modificaciones postraduccionales producto de la interacción de Prx3 con peroxinitrito:

Antes de comenzar el experimento se redujo y cuantificó la enzima bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

A continuación se prepararon tres stock de peroxinitrito en diferentes condiciones:

Stock 1: 1 mL Peroxinitrito 1.25 mM en NaOH (0.01M).

Stock 2: 1 mL Peroxinitrito 20 mM en NaOH (0.01M).

Stock 3: 1 mL Peroxinitrito 20 mM en HCl (1N).

Preparación de las muestras:

Tabla 2: se muestran las diferentes condiciones para las ocho adiciones de peroxinitrito en diferentes concentraciones (tubo 1-8) y la adición reversa (tubo 9):

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9 (AR)
Prx3 (µL) en buffer	90	90	90	90	90	90	90	90	90
Peroxinitrito (µL)	0	0.6 (Stock 1)	1.2 (Stock 1)	2.4 (Stock 1)	6 (Stock 1)	1 (Stock 2)	25 (Stock 2)	5 (Stock 2)	5 (Stock 3)
Peroxinitrito (µM)	0	9,5	19	38	95	200	500	1000	1000
Buffer (µL)	10	9.4	8.8	7.6	4	9	7.5	5	5
NEM (200mM) (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Primero se colocó en cada tubo el volumen de buffer (fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa pH 7.4) calculado, a continuación se agregó la Prx3 (19 µM) y por último el peroxinitrito, como éste se descompone de forma

muy rápida al reaccionar con la enzima, se agregó rápidamente bajo agitación. Una vez agregado éste último se contaron 2 minutos, las muestras se incubaron con 20 μ L del agente alquilante NEM (200mM) durante 30 minutos, para cortar la reacción. Las incubaciones se realizaron a 25°C.

Se entiende por adición reversa (AR) al agregado de peroxinitrito descompuesto, lo que permite evaluar el efecto de los productos de descomposición del peroxinitrito sobre la enzima.

SDS-PAGE:

Se realizaron dos SDS-PAGE de las muestras de la Tabla 2, en geles de poliacrilamida 12%, en condiciones reductoras y no reductoras (buffer de muestra con y sin mercaptoetanol respectivamente). Revelamos mediante tinción con Azul de Coomassie.

Western blot anti-3nitrotirosina y anti-sulfínico:

Se realizaron un western Blot anti-3-nitrotirosina y otro anti-sulfínico/sulfónico para las muestras de la tabla 2 (en condiciones reductoras y no reductoras). La transferencia se realizó en membrana de celulosa durante 1 hora y 10 minutos, 50 mV/gel. Para asegurarnos que la proteína se transfirió se realizó una tinción de la membrana con Rojo Ponceau.

A continuación se realizó el bloqueo de las membranas durante 1 h utilizando reactivo de bloqueo comercial diluido al medio en PBS.

Al día siguiente se incubó el anticuerpo primario durante 1 h (para el anti-3-nitrotirosina se hizo una dilución 1/1000 en PBS (1X) y para el anti-sulfínico/sulfónico comercial se hizo una dilución 1/2000 en PBS (1X) según indicaba el manual). A continuación se hicieron tres lavados de la membrana de 10 minutos cada uno utilizando PBS (1X) + 0.3% Tween.

Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario anti-rabbit-680 (dilución 1/10.000) en PBS (1X), por 1 hora. Luego se hicieron 3 lavados en las mismas condiciones que para el anticuerpo primario.

El revelado de las membranas se realizó a 680 nm utilizando el sistema de imágenes para Western Blot Li-Cor "Odyssey".

3.2.8 Fluorescencia intrínseca de Prx3:

Utilizando el espectrofotómetro/espectrofluorímetro de flujo detenido (stopped flow, Applied Biophysics SX20) disponible en nuestro laboratorio, se siguió el cambio de fluorescencia intrínseca de Prx3 (previamente reducida) al mezclarla con H₂O₂ en concentraciones crecientes, en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa a pH 7.8, utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{Ex}) de 295 nm y registrando el cambio de intensidad de fluorescencia total. El experimento se realizó a dos temperaturas diferentes, 7.5°C y 14°C respectivamente. Estas temperaturas se seleccionaron para poder poner de manifiesto la primera fase de cambio de fluorescencia de la enzima al oxidarse, que fue muy rápida (ver más adelante).

Las constantes observadas del proceso (ajustadas a un decaimiento exponencial) se graficaron en función de la concentración de H₂O₂, utilizando el software OriginPro 8.

Basándonos en que los cambios de fluorescencia intrínseca de Prx3 al ser tratada con H₂O₂ han sido estudiados por otros métodos, se decidió comenzar a trabajar utilizando H₂O₂ como agente oxidante en lugar de peroxinitrito.

4 RESULTADOS:

4.1 Purificación de Prx3 humana:

La enzima se expresó y purificó siguiendo los pasos descritos en materiales y métodos, finalmente realizamos una electroforesis SDS-Page en condiciones reductoras revelada con azul de Coomassie que muestra que obtuvimos Prx3 humana con alto nivel de pureza la cual se eluyó a altas concentraciones de imidazol (Carril 7, Figura 9).

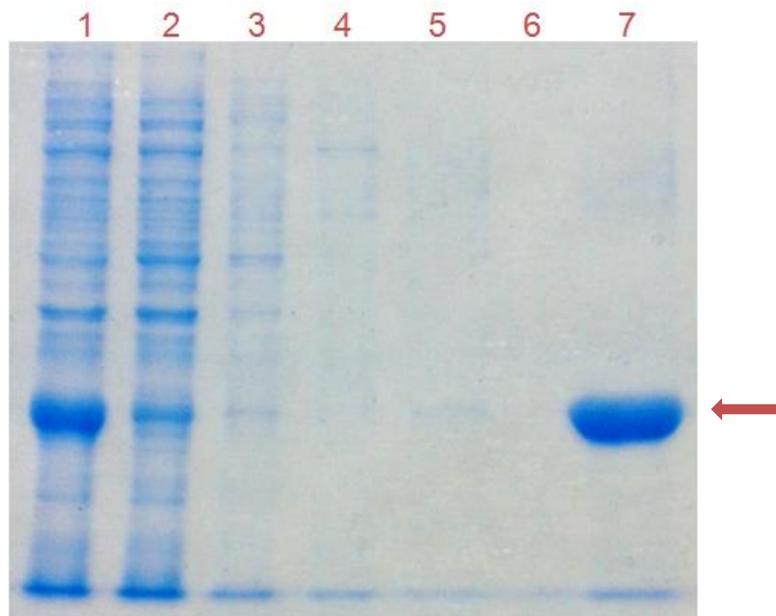


Figura 9: SDS-PAGE en condición reductora de la purificación de Prx3 humana, revelado con azul de Coomassie. Carril 1: filtrado del lisado de *E.coli* inducido con IPTG para la expresión de Prx recombinante. Carril 2: fracción no retenida del lisado una vez pasado por la columna. Carril 3, 4, 5: diferentes lavados con buffer A con concentraciones de imidazol crecientes (5 mM, 20 mM, 50 mM) para remover proteínas unidas a la columna de forma inespecífica. Carril 7: eluido con buffer A más alta concentración de imidazol (500 mM) para recolectar proteínas

unidas específicamente a la columna de afinidad debido a la presencia de la cola de histidina. La fecha señala la banda correspondiente a Prx3.

4.2 Corte de la cola de histidina de Prx3 con Tev Proteasa:

La escisión de la cola de histidina de la Prx3 con Tev proteasa fue realizada siguiendo los pasos mencionados en materiales y métodos. La pureza de la proteína escindida fue evaluada mediante una electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 10). En el carril 1 se muestra la Tev proteasa utilizada, purificada por nosotros mismos con alto nivel de pureza y con un peso molecular que se encuentra cercana a la banda de 30 kDA del marcado de PM, como corresponde a su PM (carril 7).

El carril 3 corresponde a la mezcla de corte Prx3-Tev (1:10) después del tratamiento toda la noche, la banda que migró menos corresponde a la Tev proteasa, a continuación le sigue la banda que corresponde a Prx3 cortada y por último la banda que más migró corresponden a las colas de histidinas de bajo PM.

Observamos que la proteína después del tratamiento de corte overnight, eluída en la cromatografía con buffer A y 20 mM imidazol (sembrada en el carril 4), migra más que la Prx3 sin cortar (sembrada en el carril 2) porque tiene un PM menor que se corresponde a la escisión de la cola de histidinas. También vemos que la enzima está totalmente cortada y fue eluída con alta pureza.

El carril 5 y 6 corresponde al lavado con buffer A y alta concentración de imidazol, donde se eluye la Tev proteasa y las colas de histidina cortadas que estaban unidas de forma específica a la columna. También podemos observar que en este lavado perdemos una pequeña fracción de Prx3

cortada que no había sido eluída cuando se lavó con buffer A y 20 mM imidazol.

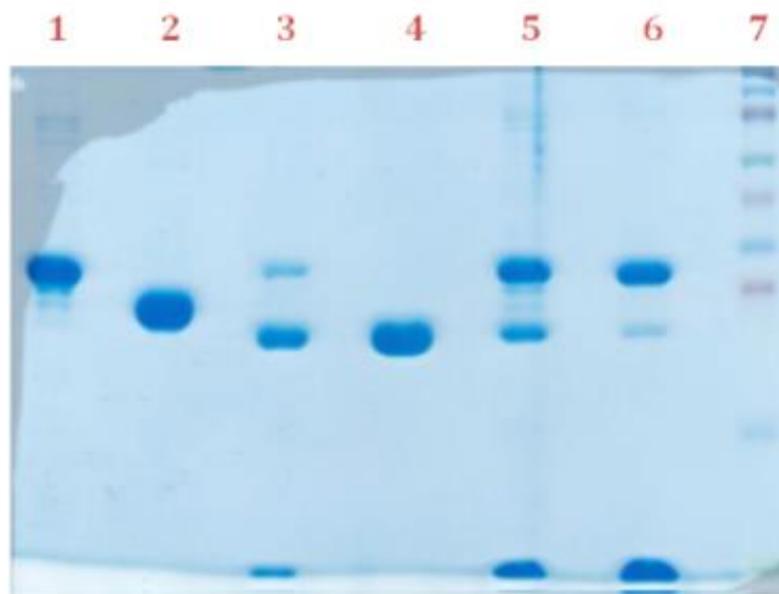


Figura 10: SDS-PAGE en condiciones reductoras del corte de la cola de histidina de Prx3 por Tev proteasa, revelado con Azul de Comassie. Carril 1: Tev proteasa con alta pureza. Carril 2: Prx3 previo al corte de cola de histidina. Carril 3: mezcla de Prx3 con cola de histidina + Tev proteasa en relación 1:10. Carril 4: lavado con 20 mM imidazol donde se eluye Prx3 sin cola de histidina y alta pureza, Carril 5 y 6: eluído con buffer A + 500 mM imidazol. Carril 7: MPM.

4.3 Evaluación de la purificación y escisión de cola de histidinas de Prx3 por Espectrometría de masas:

A partir de los datos adquiridos por el MS, obtuvimos el espectro de masa/carga (m/z) de la Prx3 purificada luego de escindir la cola de histidina, que se muestra en la Figura 11. Cada pico observado corresponde con los diferentes estados de ionización de la enzima según la carga que toma en la fuente de ESI.

A partir de la deconvolución del espectro anterior (m/z) se obtuvo el espectro de masas de la Prx3 (Figura 12), en el que se representa la masa molecular de la misma, pudiéndose observar la presencia de un único pico de gran intensidad con un peso molecular de 21797.4 Da que se corresponde con el peso molecular teórico de Prx3 cortada por TEV proteasa de 21797.7 Da, calculado anteriormente. Este resultado nos permite inferir que la cola de histidinas de la Prx3 fue cortada eficazmente, y que la enzima se encuentra con alto nivel de pureza (como ya habíamos visto en el gel de la purificación), razón por la que vemos en el espectro de masas un único pico con el peso molecular esperado.

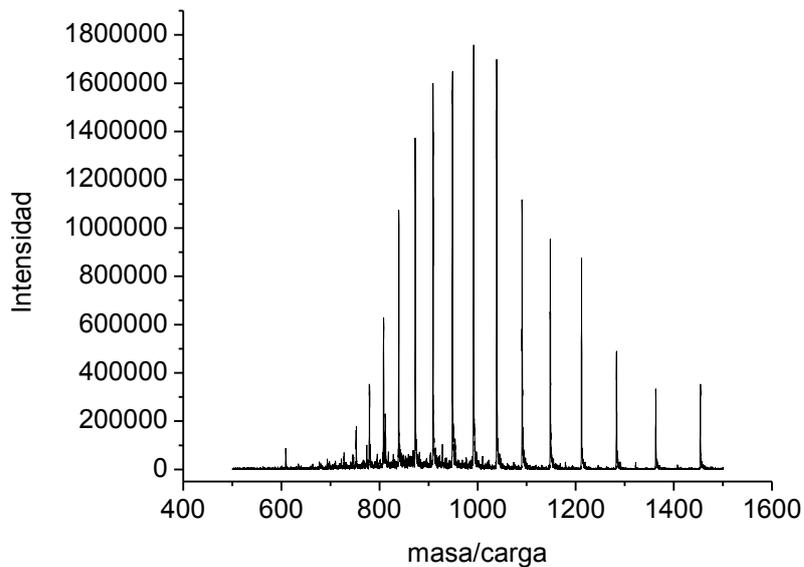


Figura 11: Espectro de masa/carga de la Prx3 con cola de histidina escindida

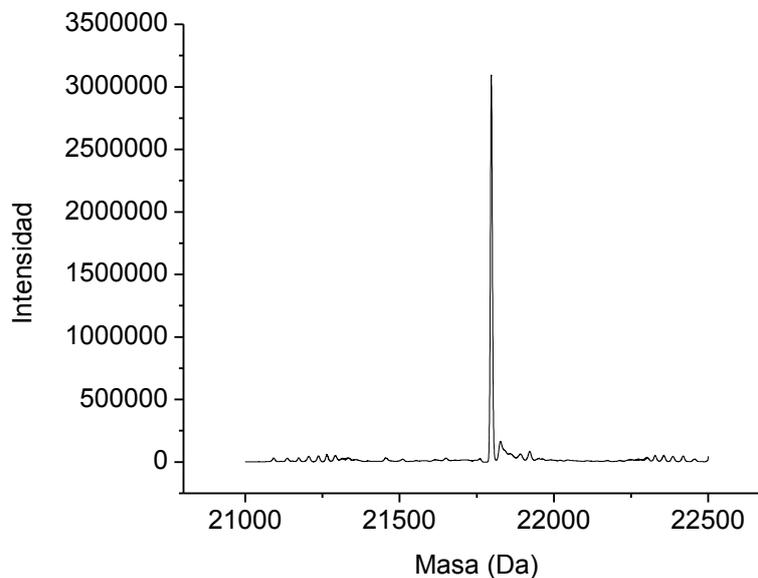


Figura 12: Espectro de masa de la Prx3 con cola de histidinas escindida, obtenido tras deconvolución. El pico de gran intensidad corresponde a la enzima y tiene un peso molecular de 21797.4 Da.

4.4 Descomposición de peroxinitrito en ausencia y presencia de Prx3 :

La constante de descomposición del peroxinitrito depende del pH, cuanto más ácido sea éste último más rápida es la descomposición. Trabajando a pH 7.8 solo un 10% del peroxinitrito se encuentra como ácido peroxinitroso, siendo la constante teórica aparente (pH dependiente, k') de decaimiento de peroxinitrito a este pH de 0.13 s^{-1} , de acuerdo a:

$$k' = k \times \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a},$$

siendo k la constante pH independiente de homólisis del ONOOH a 25°C ($k = 1.3 \text{ s}^{-1}$) y K_a su constante de acidez .

Como era de esperarse el peroxinitrito es una especie inestable que se descompuso por si solo en buffer fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa a pH 7.8, 25°C (Figura 13), con una constante de velocidad observada de 0.16 s^{-1} , similar a la calculada.

En presencia de Prx3 reducida podemos observar que se acelera la descomposición de peroxinitrito a pH 7.8, lo que evidencia la existencia de actividad peroxinitrito reductasa de la Prx3. La velocidad de descomposición fue demasiado rápida como para seguirla de forma directa, dado que en el tiempo de mezclado del stopped flow (1.5 ms) ya dejamos de estar en condiciones de velocidad inicial, por lo tanto para determinar la constante de velocidad de esta reacción utilizamos ensayos de competencia.

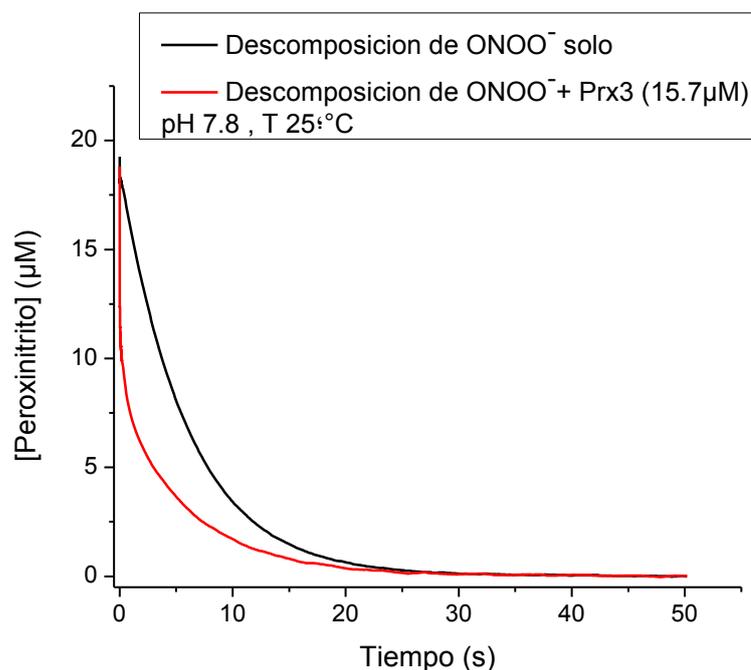


Figura 13: Ensayo directo de la cinética de descomposición de peroxinitrito (20 μM) en buffer (fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.8), solo (línea negra) y en presencia de Prx3 reducida (15.7 μM) (línea roja), seguido a 310 nm, 25°C.

4.5 Competencia Prx3-HRP:

Determinamos experimentalmente la constante de reacción de HRP con peroxinitrito en nuestras condiciones de trabajo, siguiendo la formación de complejo I a 398 nm al utilizar peroxinitrito 1 μM y concentraciones de HRP en exceso (5 μM, 7.5 μM, 10 μM, 12.5 μM). Las constantes observadas del proceso fueron obtenidas del ajuste de los cursos temporales a una exponencial simple y se graficaron en función de la concentración de HRP. Mediante el ajuste lineal de este gráfico se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de reacción entre la HRP y el peroxinitrito a pH 7.8 y 25°C de $(2.2 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.8 y 25°C (Figura 14).

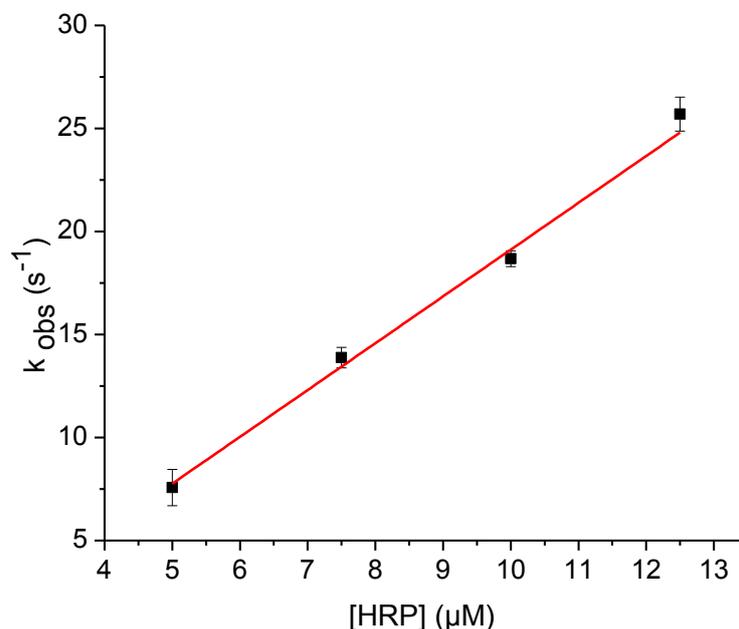


Figura 14: Ajuste lineal de las constantes observadas (s^{-1}) de formación de compuesto I a partir de la reacción de peroxinitrito con HRP en exceso, a pH 7.8, 25°C, en función de la concentración de HRP (μM).

Seguimos el curso temporal de la formación de compuesto I a 398 nm al incubar peroxinitrito (1 μM) con HRP (5 μM), en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Prx3 (1 μM , 2 μM , 3 μM) a 25 °C, pH final 7.8 (Figura 15). Podemos observar que la mayor concentración de compuesto I se alcanza en ausencia de Prx3 (línea negra), en esta instancia todo el peroxinitrito reacciona con la HRP oxidándola por dos electrones para formar compuesto I.

A medida que aumentamos la concentración de Prx3 vemos como disminuye la formación de compuesto I porque cada vez se vuelve menor la fracción de peroxinitrito disponible para reaccionar con la HRP porque parte de éste comenzó a reaccionar con la Prx3.

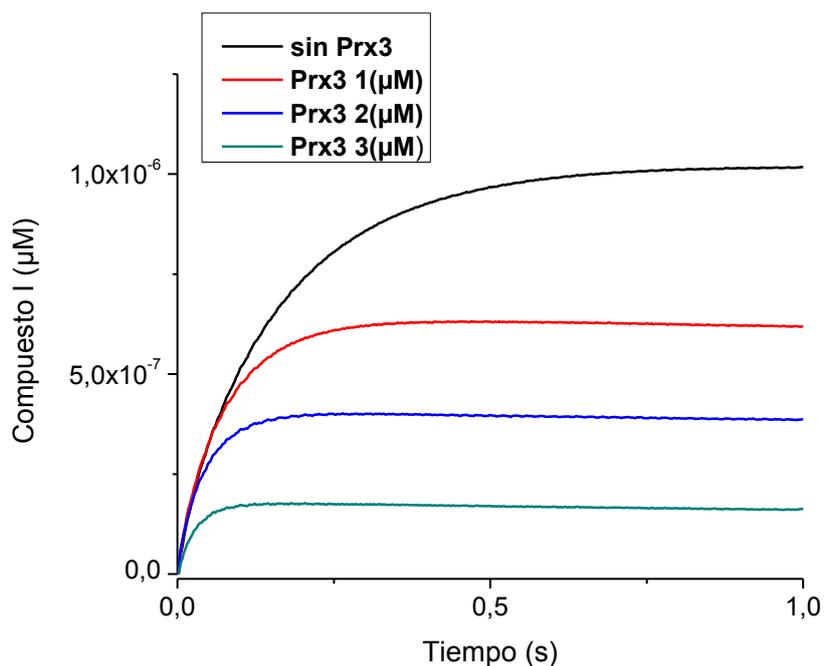


Figura 15: Seguimiento de la formación de compuesto I en el tiempo a 398 nm, al incubar HRP (5 μM) con peroxinitrito (1 μM), en buffer fosfato de sodio 100 mM pH final 7.8 y 25°C, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Prx3 (1 μM , 2 μM y 3 μM).

Aplicando la ecuación 1 mostrada en materiales y métodos para cada concentración de Prx3, se obtuvo que la constante de velocidad de reacción entre la Prx3 y el peroxinitrito fue de $k = (8.7 \pm 5.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.8, 25°C, (valor promedio de dos experimentos independientes).

Alternativamente, las constantes observadas del proceso ajustadas a una exponencial simple se graficaron en función de la concentración de Prx3 y mediante el ajuste lineal de este gráfico se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de reacción entre la Prx3 y el peroxinitrito a pH 7.8 y 25°C que corresponde a $(5.6 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 16), valor similar al anterior.

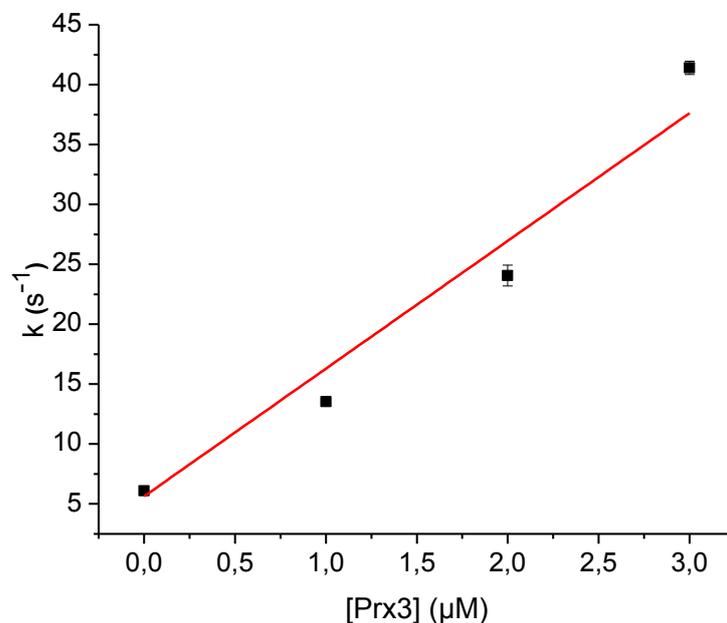


Figura 16: Ajuste lineal de las constantes observadas (s^{-1}) de formación de compuesto I, a partir de la reacción de peroxinitrito ($1 \mu M$) con HRP ($5 \mu M$), en ausencia y presencia de Prx3 en concentraciones crecientes (a pH 7.8, $25^{\circ}C$), en función de la concentración de Prx3 (μM).

4.6 Competencia Prx3-CBA:

Seguimos la formación de cumarina en el tiempo a 332 nm al incubar peroxinitrito ($0.2 \mu M$) con CBA ($10 \mu M$), en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Prx3 ($1 \mu M$, $1.5 \mu M$, $2 \mu M$ y $2.5 \mu M$) a $25^{\circ}C$, pH final 7.8 (Figura 17). Vemos que en ausencia de Prx3 (línea negra) la intensidad de fluorescencia es mayor porque todo el peroxinitrito reaccionó con el CBA para formar cumarina (producto que fluoresce) y boronato. Por su parte a medida que agregamos Prx3 en concentraciones crecientes la intensidad de fluorescencia alcanzada comienza a disminuir

cada vez más debido a que hay menos formación de cumarina porque parte del peroxinitrito reaccionó con la Prx3.

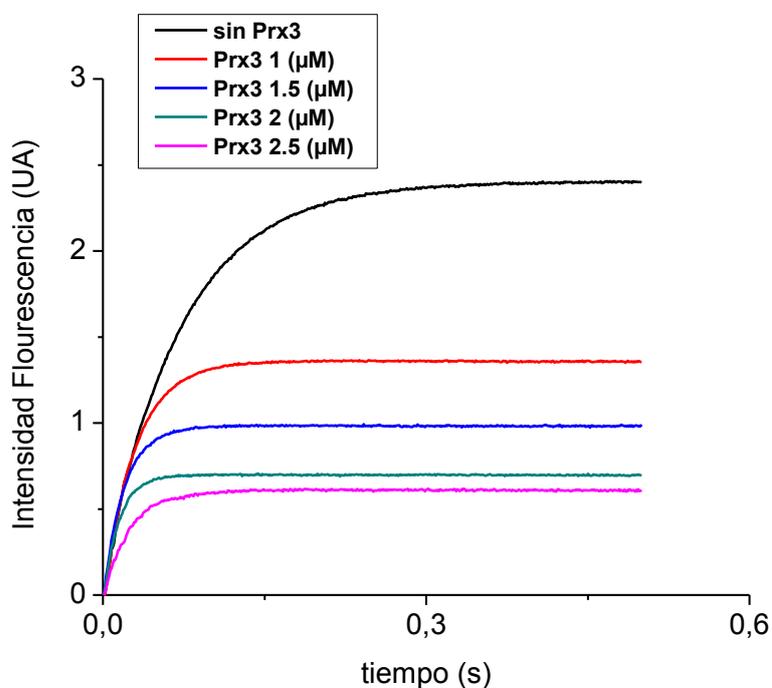


Figura 17: Seguimiento de la formación de cumarina en el tiempo a 332 nm, al incubarse boronato de cumarina (10 µM) con peroxinitrito (0.2 µM), en buffer fosfato de sodio 100 mM pH final 7.8 y 25°C, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de Prx3 (1 µM, 1.5 µM, 2 µM y 2.5 µM).

Las constantes observadas del proceso ajustadas a una exponencial simple se graficaron en función de la concentración de Prx3 y mediante el ajuste lineal de este gráfico se obtuvo una constante de velocidad de segundo orden de reacción entre la Prx3 y el peroxinitrito a pH 7.8 y 25°C que corresponde a $(7.3 \pm 3.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figura 18). (Valor promedio de tres experimentos independientes).

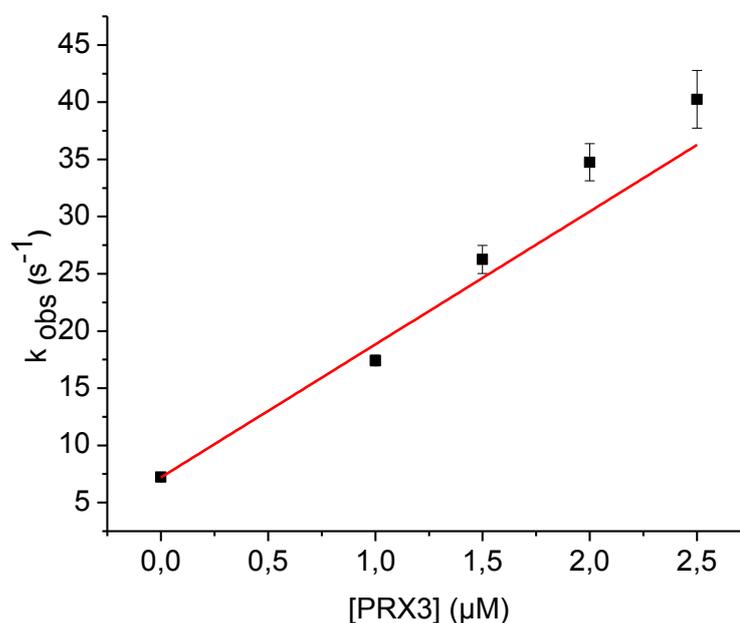


Figura 18: Ajuste lineal de las constantes observadas (s^{-1}) de formación de cumarina a partir de la reacción de peroxinitrito con CBA, en ausencia y presencia de Prx3 en concentraciones crecientes (a pH 7.8, 25°C) en función de la concentración de Prx3 (μM).

Por su parte, la ordenada en el origen de este gráfico debería coincidir con la k_{obs} de la reacción de peroxinitrito con CBA 10 μM bajo las mismas condiciones experimentales ($k_{obs} = k \times [CBA]$). Para determinar la constante esta reacción a pH 7.8 y 25°C, seguimos la formación de cumarina utilizando peroxinitrito 0.2 μM y concentraciones de CBA en exceso. Las constantes observadas del proceso ajustadas a una exponencial simple se graficaron en función de la concentración de CBA y mediante el ajuste lineal de este gráfico se obtuvo que la constante de velocidad de reacción entre el CBA y el peroxinitrito a pH 7.8 y 25°C es de **$(7.1 \pm 0.2) \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$** (Figura 19), valor que explica la ordenada en el origen del gráfico mostrado en la figura 17 ($7.1 \times 10^5 M^{-1}s^{-1} \times 10 \times 10^{-6} M = 7.1 s^{-1}$).

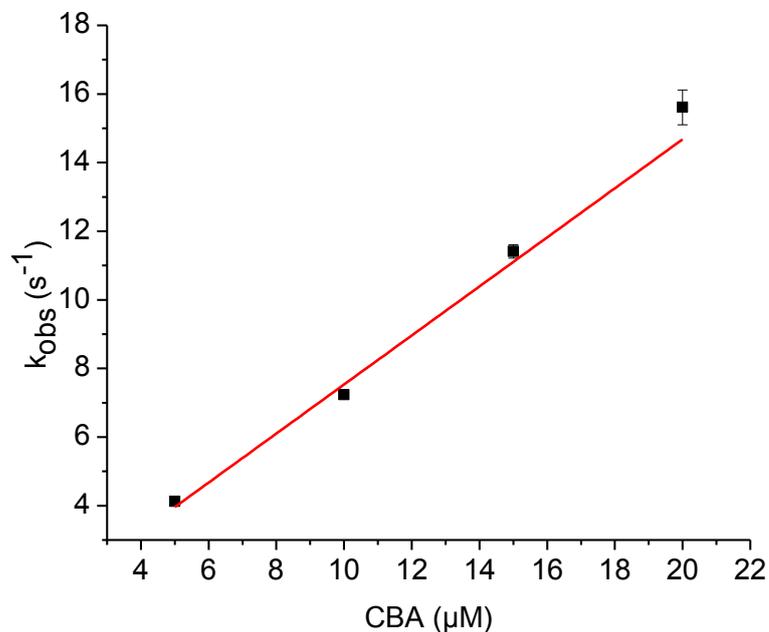


Figura 19: Ajuste lineal de las constantes observadas (s^{-1}) de formación de cumarina a partir de la reacción de peroxinitrito con CBA en exceso, a pH 7.8, 25°C, en función de la concentración de CBA (μM).

4.7 Evaluación de posibles modificaciones postraduccionales de Prx3 por interacción con peroxinitrito:

4.7.1 SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras:

En la SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 20 A) podemos ver que la Prx3 tratada con diferentes concentraciones de peroxinitrito migra en todos los carriles como monómero (M). No se ve la aparición de la forma dimérica de la enzima porque los enlaces disulfuros formados

durante la oxidación por peroxinitrito, son reducidos por el agente reductor β -mercaptoetanol.

Con respecto a la SDS-Page en condiciones no reductoras (Figura 20 B), en el carril 1 (en ausencia de agente oxidante) observamos que partimos con una pequeña fracción de enzima oxidada. Este experimento fue repetido más de una vez en esta tesina y si bien se intentó solucionar éste inconveniente agregando un mínimo de catalasa en el buffer utilizado en los experimentos y degaseándolo mucho antes de usarlo, nunca se logró partir de una enzima completamente en estado reducido. Este inconveniente había sido señalado por C. Winterbourn trabajando con la misma enzima previamente reducida y fue atribuido a la presencia de trazas de peróxido de hidrógeno en las muestras (117).

En el carril 2 y 3 al ir aumentando la concentración de peroxinitrito la enzima comienza a oxidarse y se puede ver la aparición de su forma dimérica (D), aunque no en su totalidad. El carril 4 muestra que se requirió una concentración mayor a la relación 1:1 de Prx3: Peroxinitrito para ver la oxidación completa de la enzima, evidenciada por su migración como dímero en ausencia de monómero.

En los carriles 7 y 8 de la Figura 20 B (a altas concentraciones de peroxinitrito), se observa una disminución de la fracción de Prx3 que migra como dímero, que podría reflejar la hiperoxidación de la C_P en ambas subunidades de la enzima impidiendo la formación de enlaces disulfuros intermoleculares. La sensibilidad de la técnica no permite ver de forma precisa la reaparición de fracción de enzima monomérica (que sí se ponen de manifiesto por técnicas inmunolectroforéticas, ver adelante en Figura 20 B).

La adición reversa en el carril 9 muestra que los productos de descomposición del peroxinitrito no producen la oxidación de la enzima, por lo que se comporta como lo observado en el carril 1 (sin peroxinitrito),

donde la enzima se encuentra mayoritariamente monomérica con una pequeña fracción inicial oxidada.

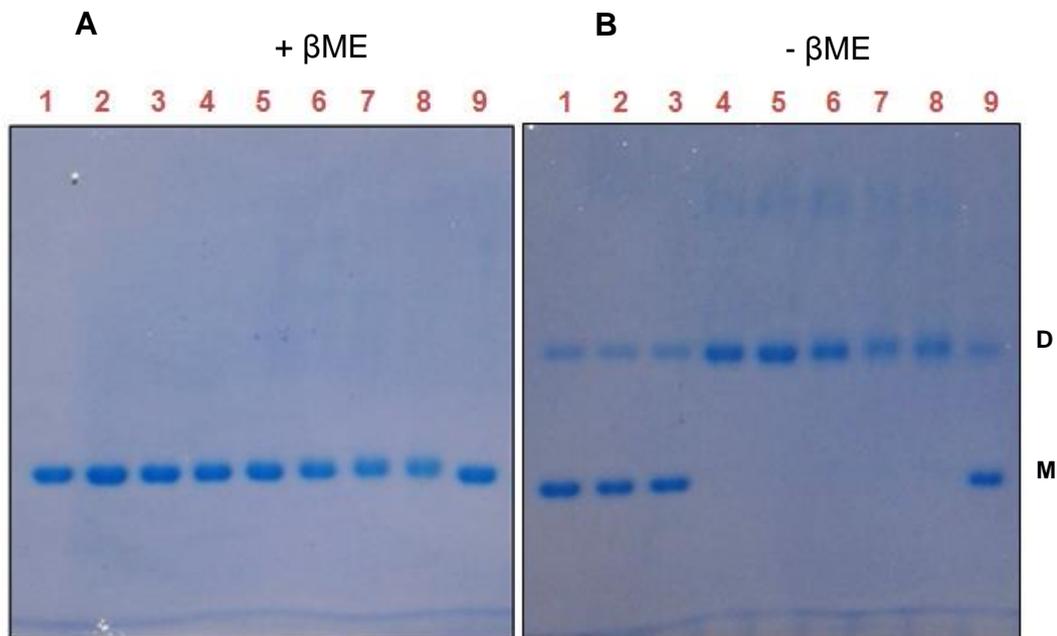


Figura 20: SDS-Page en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B) de las muestras de la tabla 2, revelado con azul de Coomassie. Todas las muestras contienen la misma concentración final de Prx3: 19 μ M y peroxinitrito en concentraciones creciente: Carril 1: Prx3, sin peroxinitrito Carril 2: Prx3 + peroxinitrito 9.5 μ M, Carril 3: Prx3 + peroxinitrito 19 μ M, Carril 4: Prx3 + peroxinitrito 38 μ M, Carril 5: Prx3 + peroxinitrito 95 μ M, Carril 6: Prx3 + peroxinitrito 200 μ M, Carril 7: Prx3 + peroxinitrito 500 μ M, Carril 8: Prx3 + peroxinitrito 1mM, Carril 9: Adición reversa.

4.7.1 Detección por Western blot de hiperoxidación de Prx3 mediada por peroxinitrito:

La adición de peroxinitrito a Prx3 previamente reducida, condujo a la detección por western blot anti-sulfínico/sulfónico de formas hiperoxidadas

de la enzima únicamente cuando se adiciona concentraciones de peroxinitrito en exceso respecto de la enzima, a partir del carril 4 (donde hay una relación 2:1 de peroxinitrito: Prx3), hasta el carril 8 inclusive, tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 21 A y B, respectivamente). La señal se vuelve más intensa a medida que hay más peroxinitrito en exceso, como se observa en los carriles 6, 7 y 8.

En condiciones no reductoras (Figura 21 B) como es de esperarse, primero se hiperoxida una de las dos subunidades de la unidad funcional dimérica de la enzima y se sigue viendo la forma dimérica porque la otra subunidad mantiene la formación de un enlace disulfuro entre la C_P y C_R , característico de las Prxs 2-Cys típicas. A altas concentraciones de peroxinitrito empieza a aparecer una fracción de enzima que migra como monómero (carril 6, 7 y 8), de lo que concluimos que sus dos tioles peroxidáticos están hiperoxidados y no pueden participar de enlaces disulfuro con C_R . Cabe destacar que, ni utilizando un exceso de 50 veces de peroxinitrito con respecto a la enzima se logra hiperoxidar los dos tioles peroxidáticos de toda la enzima por completo, por lo que en todas las condiciones se mantiene una fracción de enzima dimérica donde solo el tiol peroxidático de una subunidad se hiperoxida y eso se explicaría ya que el cierre de disulfuro es una reacción que ocurre muy rápido (ver más adelante).

La sensibilidad de la técnica permitió detectar la formación de aductos covalentes de alto peso molecular sobreoxidados a altas concentraciones de peroxinitrito (Figura 21 A y B, carril 7 y 8), que no habían sido detectados mediante SDS-PAGE (Figura 20 A y B). Estos productos no reducibles por β -mercaptoetanol sugieren la formación de formas de la enzima que contienen entrecruzamientos por di-tirosinas y que poseen C_P hiperoxidadas.

La adición reversa en ambas condiciones (carril 9), no mostró señal, indicando que los productos de descomposición de peroxinitrito no son capaces de causar hiperoxidación de Prx3.

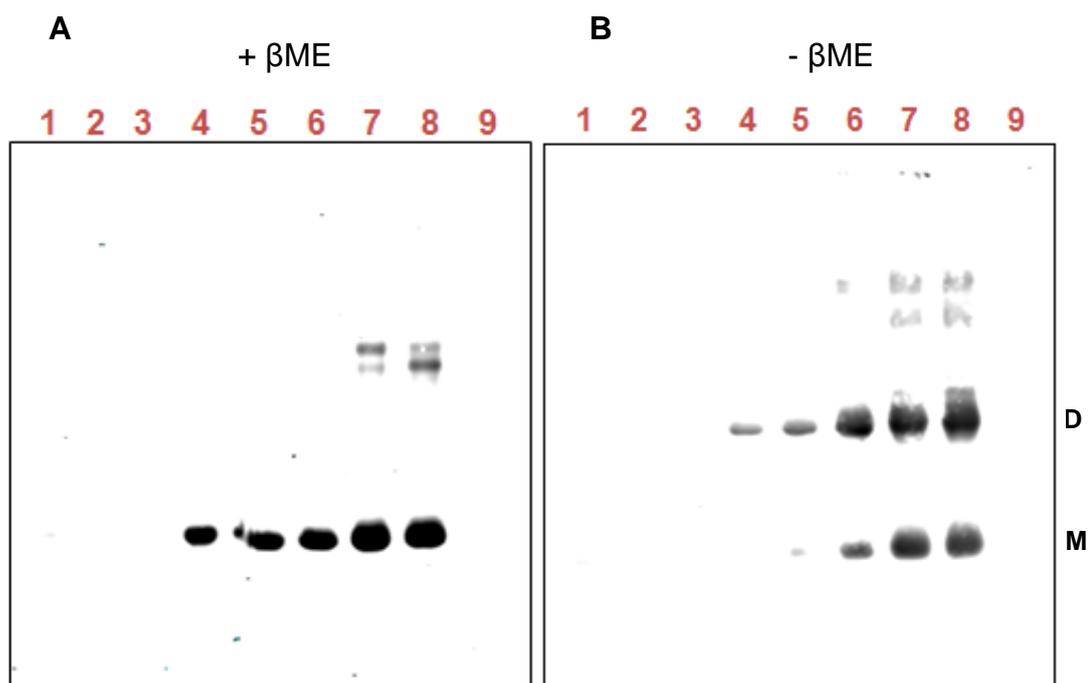


Figura 21: Western Blot anti-sulfínico de las muestras de la tabla 2 en condiciones reductoras (A) y no reductoras (B), revelado a 680 nm en el sistema de imágenes para Western Blot Li-Cor “Odyssey”. Todas las muestras contienen la misma cantidad de Prx3 previamente reducida (19 μ M), tratada con concentraciones crecientes de peroxinitrito, en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.4. Carril 1: Prx3, sin peroxinitrito Carril 2: Prx3 + peroxinitrito 9,5 μ M, Carril 3: Prx3 + peroxinitrito 19 μ M, Carril 4: Prx3 + peroxinitrito 38 μ M, Carril 5: Prx3 + peroxinitrito 95 μ M, Carril 6: Prx3 + peroxinitrito 200 μ M, Carril 7: Prx3 + peroxinitrito 500 μ M, Carril 8: Prx3 + peroxinitrito 1 mM, Carril 9: AR.

4.7.3 Detección por Western blot de nitración de tirosinas en Prx3 tratada con peroxinitrito:

En el western blot anti-3 nitrotirosina en condiciones reductoras para las muestras de la Tabla 2 (Figura 22) podemos ver que a concentraciones bajas de peroxinitrito no se observa señal (carril 2, 3 y 4). En esas condiciones, en forma consistente con la alta constante de velocidad de reacción reportada en este trabajo, todo el peroxinitrito se espera que reaccione directamente con el tiol peroxidático de la Prx3 (19 μM) y por lo tanto no se formarían especies radicalares capaces de nitrificar a la enzima. Solo cuando el peroxinitrito está en exceso respecto a la enzima parte del mismo se espera que decaiga a radicales secundarios, que son los responsables de la nitración en la posición 3 de residuos de tirosina de la Prx3, señal que se comienza a detectar en el carril 5 donde la relación peroxinitrito:enzima es 5:1. A medida que aumenta la concentración de peroxinitrito se observa un incremento en la intensidad de la señal de nitración (carril 6, 7 y 8).

En los carriles 7 y 8 en presencia de gran exceso de peroxinitrito (500 μM y 1000 μM respectivamente) también se puede detectar la aparición de aductos covalentes de mayor peso molecular no reducibles por β -mercaptoetanol, que probablemente se tratan de formas de Prx3 conteniendo di-tirosinas y residuos de tirosina nitradas.

La adición reversa que se muestra en el carril 9 no evidencia señal, al igual que el carril 1 sin peroxinitrito, como era de esperarse.

En el carril 10 se ve una señal correspondiente al control positivo (Fe-SOD de *Trypanosoma cruzi* nitrada por exposición a peroxinitrito, cedida por Alejandra Martínez, asistente del Departamento de Bioquímica e integrante de nuestro grupo de investigación).

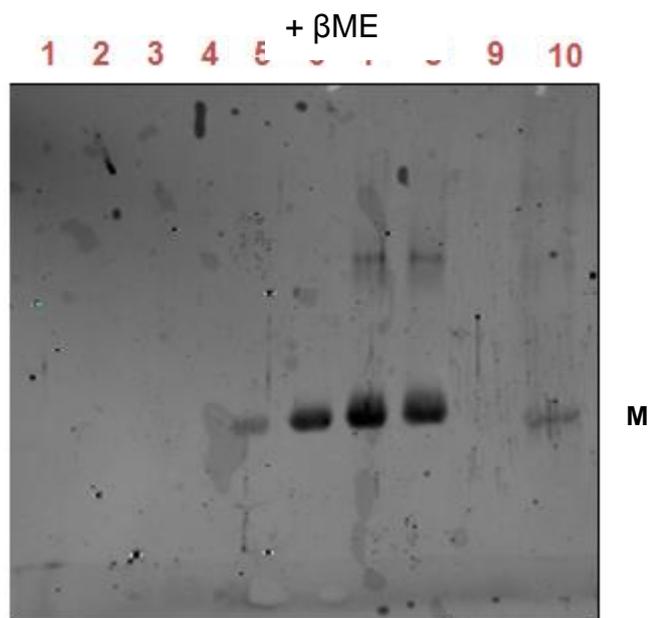


Figura 22: Western blot anti-3 nitrotirosina de las muestras de la tabla 2 en condiciones reductoras, revelado a 680 nm en el sistema de imágenes para Western Blot Li-Cor “Odyssey”. Todas las muestras contienen la misma cantidad de Prx3 previamente reducida (19 μM) tratada con concentraciones crecientes de peroxinitrito, en buffer fosfato de sodio 100 mM + 0.1 mM dtpa, pH 7.4. **Carril 1:** Prx3, sin peroxinitrito **Carril 2:** Prx3 + peroxinitrito 9,5 μM , **Carril 3:** Prx3 + peroxinitrito 19 μM , **Carril 4:** Prx3 + peroxinitrito 38 μM , **Carril 5:** Prx3 + peroxinitrito 95 μM , **Carril 6:** Prx3 + peroxinitrito 200 μM , **Carril 7:** Prx3 + peroxinitrito 500 μM , **Carril 8:** Prx3 + peroxinitrito 1 mM, **Carril 9:** AR, **Carril 10:** control positivo: superóxido dismutasa de Fe nitrada (Fe-SOD).

4.8 Cambios de fluorescencia intrínseca de Prx3 asociados a su estado redox:

Cuando se incubó la enzima reducida con una concentración equimolecular de H_2O_2 a 14°C se observó un cambio de fluorescencia intrínseca de Trp ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, registro de emisión total) bifásico con una primera fase muy rápida de decaimiento de fluorescencia que se completó aproximadamente en los primeros 10 ms y una segunda fase donde se da

un incremento de la intensidad de fluorescencia llegando a valores similares a los del inicio y que ocurre de forma más lenta que la primera fase (Figura 23 A). Con el objetivo de lograr ver la primera fase en su totalidad se decidió trabajar a una temperatura menor a 14°C. Como se muestra en la Figura 23 B trabajando a 7.5°C se pudo apreciar desde el inicio el decaimiento de la intensidad de fluorescencia de ésta primer fase.

Observamos que el decaimiento de la intensidad de fluorescencia de la primera fase se acelera al aumentar la concentración de H₂O₂, de tal manera que al utilizar concentraciones de H₂O₂ iguales o mayores a 1 µM ya no pudo ser observada, ni siquiera al disminuir la temperatura de trabajo a 7.5°C, como se muestra en las Figuras 23 C y 23 D.

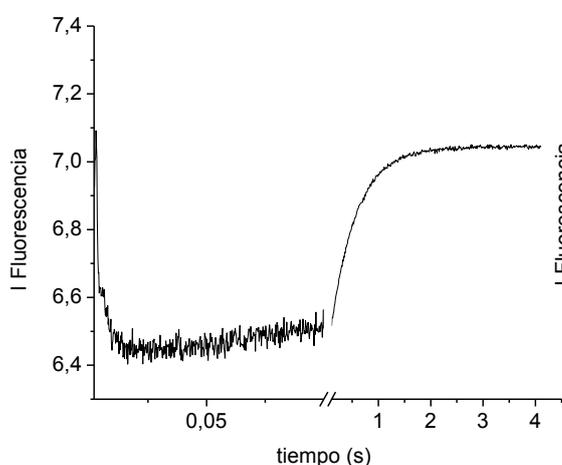


Figura 23.A: Seguimiento del cambio de intensidad de fluorescencia intrínseca de Prx3 (0.2 µM) incubada con H₂O₂ (0.2 µM) en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.8 a 14 °C

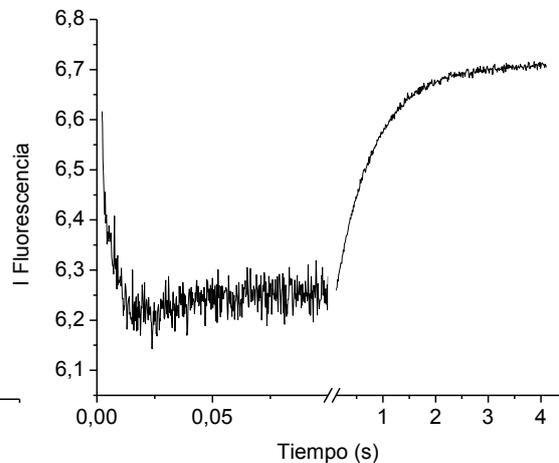


Figura 23.B: Seguimiento del cambio de intensidad de fluorescencia intrínseca de Prx3 (0.2 µM) incubada con H₂O₂ (0.2 µM) en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.8 a 7.5 °C.

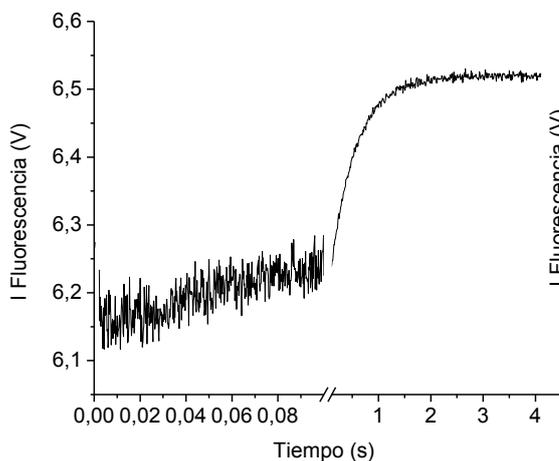


Figura 23.C: Seguimiento del cambio de intensidad de fluorescencia intrínseca de Prx3 (0.2 μM) incubada con H_2O_2 (1.16 μM) en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.8 a 14 $^\circ\text{C}$.

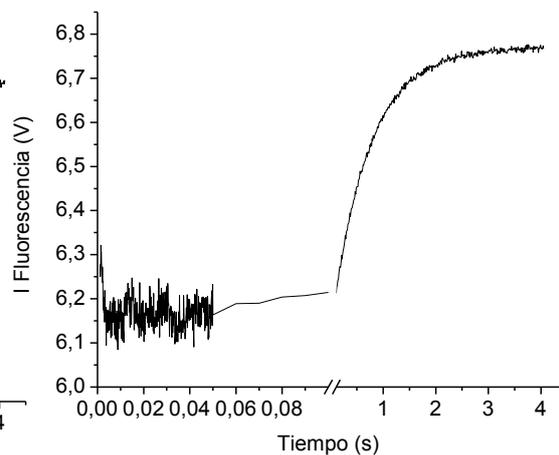


Figura 23.D: Seguimiento del cambio de intensidad de fluorescencia intrínseca de Prx3 (0.2 μM) incubada con H_2O_2 (1.16 μM) en buffer fosfato de sodio 100 mM, 0.1 mM dtpa, pH 7.8 a 7.5 $^\circ\text{C}$.

Para determinar la constante de velocidad de la segunda fase observada, estudiamos el cambio de fluorescencia intrínseca de Prx3 reducida al incubarla con concentraciones crecientes de H_2O_2 a pH 7.8, observando tanto a 14 $^\circ\text{C}$ como 7.5 $^\circ\text{C}$ que la constante de velocidad observada parece ser prácticamente independiente para las menores concentraciones de H_2O_2 (0.2 μM , 1.16 μM , 2.32 μM , 4.64 μM y 50 μM). Sin embargo, para concentraciones mayores de H_2O_2 (50 μM , 1000 μM y 1500 μM) se observa un aumento de la constante de velocidad observada (s^{-1}) en función de la concentración de H_2O_2 a pH 7.8, trabajando tanto a 14 $^\circ\text{C}$

como a 7.5°C (Figura 24 A y B, respectivamente). Estos gráficos muestran un valor de corte en la ordenada en el origen de $2.04 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ a 14°C y de $1.38 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ a 7.5°C. Por su parte, la pendiente se corresponde con un valor de $1010 \pm 30.8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 14°C y $616 \pm 24 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a 7.5°C.

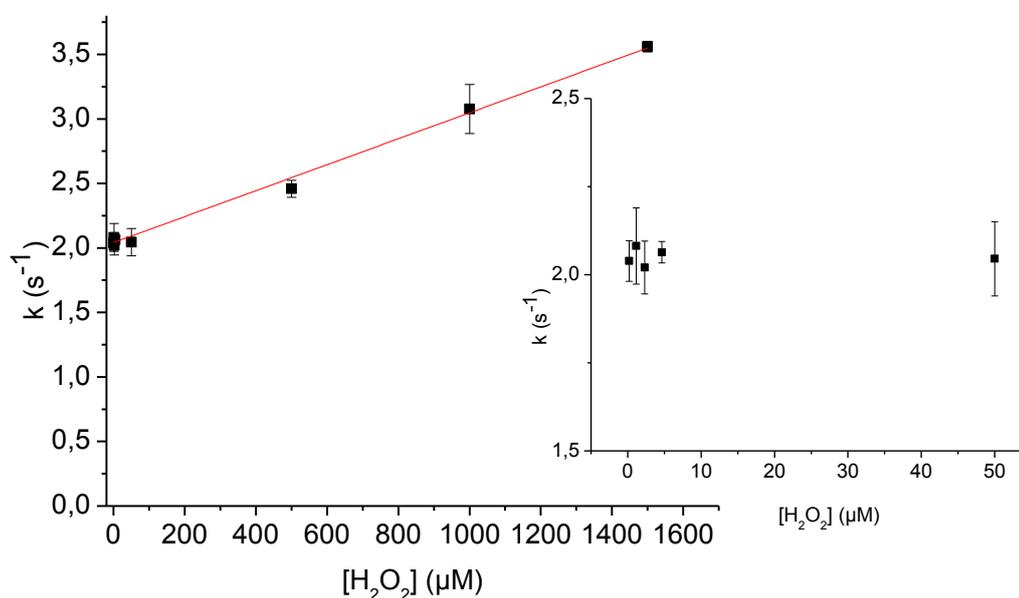


Figura 24 A: Ajuste lineal de las constantes de velocidad observadas (s^{-1}) para la segunda fase del cambio de fluorescencia intrínseco de Prx3 a pH 7.8 y 14°C, en función de la concentración de H_2O_2 (μM) con la cual fue incubada. El inserto muestra la ampliación de los datos obtenidos para las concentraciones menores de H_2O_2 .

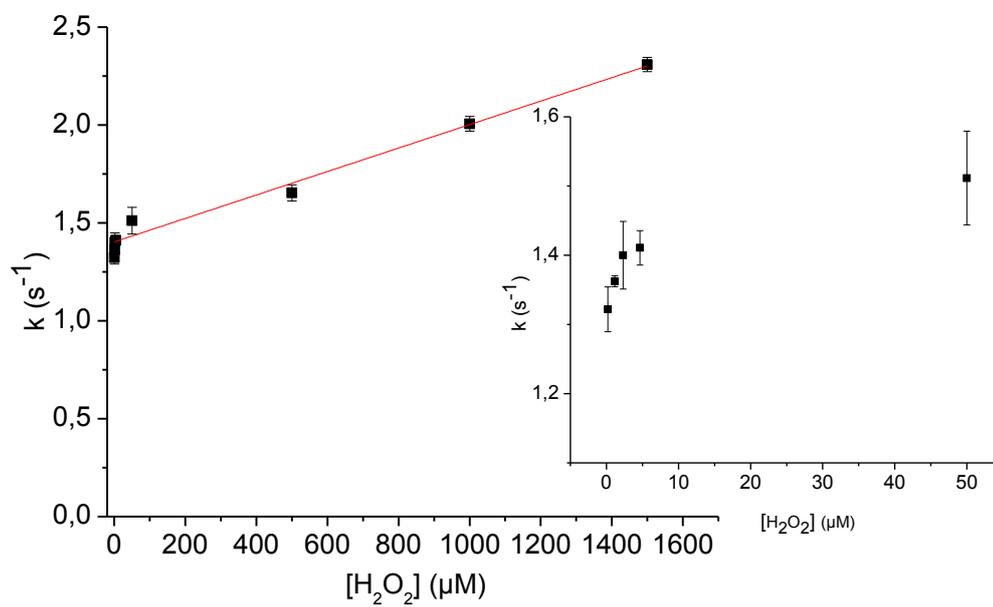


Figura 24 B: Ajuste lineal de las constantes de velocidad observadas (s^{-1}) para la segunda fase del cambio de fluorescencia intrínseco de Prx3 a pH 7.8 y 7.5°C, en función de la concentración de H_2O_2 (μM) con la cual fue incubada. El inserto muestra la ampliación de los datos obtenidos para las concentraciones menores de H_2O_2 .

5 DISCUSIÓN:

Caracterización de la actividad peroxinitrito reductasa de Prx3:

La Prx3 es capaz de descomponer el peroxinitrito de forma muy rápida como se observa en la Figura 13, evidenciando la existencia de una actividad enzimática peroxinitrito reductasa. Mediante ensayos de cinética de competencia entre Prx3-HRP determinamos que la Prx3 reacciona con el peroxinitrito con una constante de velocidad de $(8.7 \pm 5.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.8, 25°C, mientras que a partir de la competencia entre Prx3 y CBA determinamos una constante de velocidad de reacción entre Prx y peroxinitrito de $(7.3 \pm 3.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, a pH 7.8, 25°C. Estas últimas son similares a los valores de constante de velocidad de reducción de peroxinitrito reportada para algunas peroxirredoxinas de la misma subfamilia que Prx3. Por ejemplo se conoce que la AhpC bacteriana reacciona con el peroxinitrito con una constante de velocidad de $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.0 y 25°C, mientras que Prx2 humana reacciona con una constante de $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4, 25°C, un orden de magnitud mayor (145, 154). Con respecto a otras peroxirredoxinas eucariotas, Prx5 humana reacciona con el peroxinitrito con una constante de velocidad de $7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.8, 25°C (140), un orden de magnitud más rápido que Prx3, mientras que Prx6 reacciona con el peroxinitrito con una constante de velocidad de 3.7×10^5 a pH 7.4, 25°C, un orden de magnitud más lenta que Prx3 (152).

Realizamos una comparación de la cinética de reacción de diversas peroxirredoxinas (pertenecientes a diferentes subfamilias) con peroxinitrito, que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Cinética comparativa de la reacción de diferentes peroxirredoxinas (pertenecientes a diferentes subfamilias) con peroxinitrito.

Peroxirredoxina	Subfamilia	k ONOOH (M ⁻¹ s ⁻¹)	Condiciones		Referencias
			pH	T (°C)	
Prx 2 (<i>Homo sapiens</i>)	Prx1-AhpC	1.4 x 10 ⁷	7.4	25	(145)
mTXNPx (<i>T. cruzi</i>)	Prx1-AhpC	1.8 x 10 ⁷	7.4	25	(155)
cTXNPx (<i>T. cruzi</i>)	Prx1-AhpC	1 x 10 ⁶	7.4	25	(155)
Tsa1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Prx1-AhpC	7.4 x 10 ⁵	7.4	25	(156)
Tsa2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Prx1-AhpC	5.1 x 10 ⁵	7.4	25	(156)
AhpC (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Prx1-AhpC	1.51 x 10 ⁶	7.0	25	(154)
Prx 3 (<i>Homo sapiens</i>)	Prx1-AhpC	8.7 x 10 ⁶	7.8	25	Este trabajo
Prx5 (<i>Homo sapiens</i>)	Prx5	7.7 x 10 ⁷	7.8	25	(140)
AhpE (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	AhpE	1.9 x 10 ⁷	7.4	25	(157)
Prx6 (<i>A.marina</i>)	Prx6	2 x 10 ⁶	7.4	25	(152)
Prx6 (<i>Homo sapiens</i>)	Prx6	3.7 x 10 ⁵	7.4	25	(158)
Bcp/PrxQ (<i>M. tuberculosis</i>)	Bcp/PrxQ	1 x 10 ⁶	7.4	25	Reyes. A No publicado
PrxQ (<i>X. fastidiosa</i>)	Bcp/PrxQ	1 x 10 ⁶	7.4	25	(159)
Tpx (<i>M. tuberculosis</i>)	Tpx	1.5 x 10 ⁷	7.4	25	(160)

Como fue mencionado antes, la mitocondria cuenta con una batería de agentes (enzimáticos y no enzimáticos) reductores de peroxinitrito y otros peróxidos, que se encargan de regular los niveles de estos últimos dependiendo de la condición celular. A continuación se muestra una tabla de cinética comparativa (Tabla 4), realizada para diferentes blancos mitocondriales del peroxinitrito, donde se incluye reportes de la concentración intracelular de cada blanco, la constante de velocidad de reacción con el peroxinitrito: (k') ($M^{-1}.s^{-1}$), así como el producto de la constante de velocidad ($M^{-1}.s^{-1}$) por la concentración del blanco: $k.[\text{Blanco}]$ (s^{-1}). Los valores de las concentraciones intracelulares tomados a partir de la literatura referenciada pueden sufrir variaciones dependiendo del tipo celular y de las condiciones.

Tabla 4: Cinética comparativa entre diferentes blancos mitocondriales de peroxinitrito.

Blanco	Condición		k (M ⁻¹ .s ⁻¹)	[Conc. intracelular]	k. [Blanco] (s ⁻¹)	Ref.
	pH	T (°C)				
Prx 3	7.8	25	8.7 x 10 ⁶	60 μM	522	Este trabajo
Prx 5	7.8	25	7.0 x 10 ⁷	20 μM	1400	(140)
GSH	7.4	25	850	5 mM	4.3	(161)
CO₂	7.4	25	4.6 x 10 ⁴	1.3 mM	60	(37, 39)
Aconit-tasa	7.4	37	1.4 x 10 ⁵	20 μM	2.8	(162, 163)
Mn-SOD	7.47	37	2.5 x 10 ⁴	80 μM	2	(164)
Gpx 1	7.4	25	2 x 10 ⁶	2 μM	4	(165, 166)
PTP-1B	7.4	37	2.2 x 10 ⁷	0.1 μM	2.2	(167, 168)

Nota: Respecto a los blancos enzimáticos citados en la Tabla 3, los valores de constantes de velocidad y concentración son dados por monómero de enzima.

Para ver como se repartiría el peroxinitrito entre los diferentes blancos mitocondriales considerados en la Tabla 4, realizamos dos gráficos de barras mostrados a continuación. En uno de ellos comparamos las

diferentes constantes de velocidad de reacción con el peroxinitrito (Figura 25). Dado que la reactividad con los diferentes blancos está dictada por el producto de constante por concentración de los mismos y no únicamente por la constante de reacción, mostramos dicho producto en un segundo gráfico de barras (Figura 26).

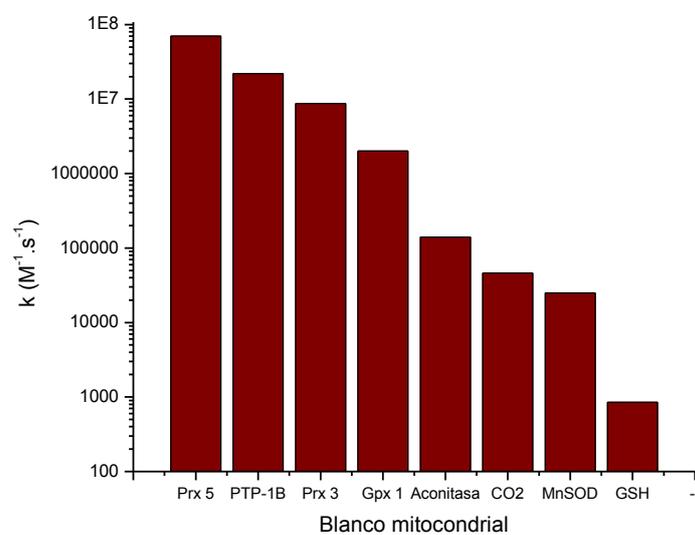


Figura 25: Constantes de velocidad de reacción (M⁻¹.s⁻¹) entre peroxinitrito y algunos sus blancos mitocondriales, datos mostrados en la Tabla 4.

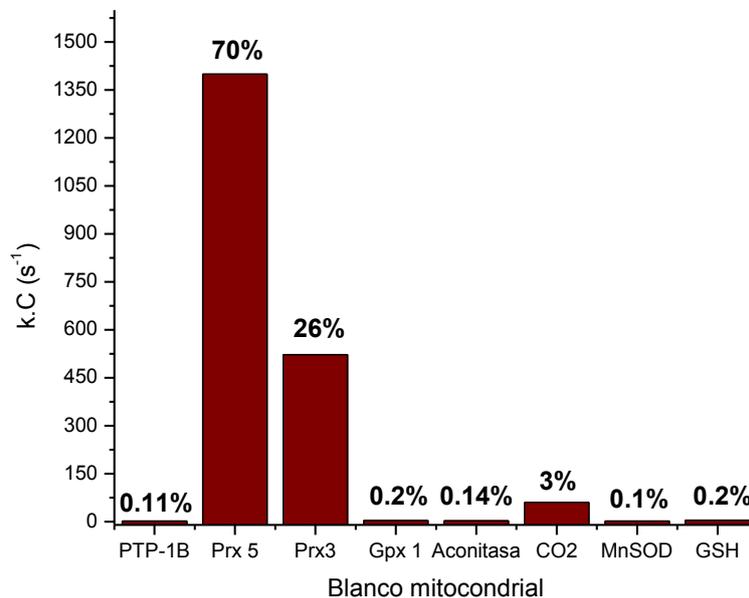


Figura 26: Distribución del peroxinitrito entre diferentes blancos mitocondriales, considerando el producto entre constante de velocidad de reacción (k) ($M^{-1}.s^{-1}$) y la concentración del blanco, de acuerdo a los datos citados en la Tabla 4.

La alta concentración intracelular de Prx3 ($60 \mu M$) y Prx5 ($20 \mu M$), conjuntamente con la alta constante de velocidad de reacción con el peroxinitrito que presentan (Tabla 4), permite predecir que la mayor parte de peroxinitrito mitocondrial sería consumido por estas dos peroxidases ($\sim 90\%$), como se representa en la Figura 26. Estos cálculos son considerados suponiendo que toda la enzima se encuentra en estado reducido. Sin embargo, hay que considerar que en condiciones de estrés oxidativo, las Prxs pueden ser inactivadas por hiperoxidación o la velocidad de oxidación de las mismas puede superar la capacidad de reducción por los sistemas reductores, de modo que se comience a acumular Prx3/Prx5 inactiva u oxidada, con lo que la fracción de peroxinitrito reducido por estas enzimas puede disminuir.

Por su parte si bien Gpx1 muestra una constante de reacción con peroxinitrito muy rápida (en el mismo orden que la determinada para Prx3) (Tabla 4 y Figura 25), la baja concentración intracelular de la misma (2 μM) hace que ésta peroxidasa no sea uno de los principales blancos del peroxinitrito en la mitocondria, consumiendo tan solo una pequeña fracción del mismo ($\sim 0.2\%$) (Figura 26).

También debemos considerar que una fracción no despreciable de peroxinitrito ($\sim 3\%$) reacciona con CO_2 , que si bien posee una reactividad moderada se encuentra en alta concentración en la célula (1.3 mM) (Figura 26). Como se había mencionado anteriormente, la reacción entre estas dos especies rinde los oxidantes secundarios $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}_2$, capaces de oxidar por mecanismos de un electrón, así como de causar la nitración de biomoléculas.

Modificaciones postraduccionales de Prx3:

Hiperoxidación de C_P :

Existen pocos reportes acerca de la tendencia de Prx3 a la hiperoxidación mediada por peroxinitrito, si bien se conoce que el peroxinitrito en exceso puede hiperoxidar a la Prx2 humana y a la Prx6 bovina (Prx 1-Cys) (145, 169). De nuestros resultados podemos inferir que Prx3 parece ser bastante susceptible a tal modificación postraducciona, porque no se necesitó mucho exceso de este agente oxidante con respecto a la misma para empezar a detectar fracción de enzima hiperoxidada, si bien no pudo ser totalmente hiperoxidada en ambos tioles peroxidáticos al ser incubada con un exceso de hasta 50 veces de peroxinitrito respecto a Prx 3 (Figura 21 B).

Como ya se mencionó anteriormente se conoce que Prx3 muestra menor susceptibilidad a hiperoxidarse que Prx2 (citosólica) por H_2O_2 , lo que ha sido atribuido a la presencia de ciertos residuos particulares que rodean

su C_R-229 (120). Si comparamos nuestros resultados de hiperoxidación de Prx3 por peroxinitrito, con los resultados obtenidos por B. Manta en la evaluación de la hiperoxidación de Prx2 por peroxinitrito (145), podemos notar que para empezar a detectar Prx3 donde sus dos tioles peroxidáticos resulten hiperoxidados, tan solo se necesita tratar la enzima con peroxinitrito 10 veces en exceso (Figura 21 B), mientras que para Prx2 este comportamiento no se observa al utilizar esa condición, sino que se comienza a detectar cuando se trata la enzima con un exceso de 100 veces más peroxinitrito. Esto sugeriría que la Prx2 muestra menor susceptibilidad que Prx3 a hiperoxidarse por peroxinitrito, si bien se requiere de estudios más profundos, incluyendo la determinación de las constantes de cierre de disulfuro y de hiperoxidación de cada una de las enzimas por peroxinitrito, para definir este tema.

Por su parte si comparamos la susceptibilidad de Prx3 a hiperoxidarse por H₂O₂ y por peroxinitrito, respectivamente, podemos ver en el trabajo C. Winterbourn y sus colaboradores que se requiere un exceso de 40 veces H₂O₂ con respecto a Prx3 para comenzar a detectar fracción de enzima hiperoxidada, mientras que en nuestro trabajo, tan solo con un exceso de dos veces más peroxinitrito con respecto a la enzima, ya detectamos señal correspondiente a hiperoxidación de una de las C_P de Prx3 (Figura 21 B). Si bien estas diferencias podrían ser atribuibles a los diferentes anticuerpos utilizados estos resultados podrían indicar que la Prx3 podría ser más susceptible a hiperoxidarse por peroxinitrito que por H₂O₂ *in vitro*, pero se requieren de estudios cinéticos más exhaustivos para conclusiones definitivas.

Cabe destacar que estudios computacionales llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que los valores de estado estacionario de peroxinitrito generados por un flujo equimolar de •NO y O₂•⁻ (10 μM/min, valor que podría alcanzarse en la matriz mitocondrial *in vivo*) en presencia de concentraciones fisiológicas de MnSOD, alcanzarían ~ 100 nM (56),

siendo inferiores a la concentración de enzima reducida, lo que dificultaría la hiperoxidación en condiciones normales, ya que únicamente detectamos proteína hiperoxidada en condiciones experimentales de exceso de oxidante.

Nitración de residuos de tirosina:

Demostramos que la Prx3 es susceptible a la nitración en residuos de tirosina cuando se somete a condiciones de peroxinitrito en exceso (Figura 22). Como fuera mencionado anteriormente la Prx3 nitrada ha sido detectada en corazones de ratones diabéticos, donde el peroxinitrito parece estar implicado. En esta patología hay un incremento de la formación de peroxinitrito intracelular como consecuencia del desacople de la NOS, que favorece la fuga de electrones hacia el oxígeno, conduciendo a la formación de más $O_2^{\bullet-}$ y tras su reacción con $\bullet NO$, peroxinitrito (146). Si bien no conocemos hasta el momento qué residuos de tirosina son nitrados, ni que consecuencias estructurales y/o funcionales provoca tal modificación postraducciona en la Prx3, estudios previos en Prx2 (perteneciente a la misma subfamilia que Prx3), muestran que la nitración del residuo de tirosina Y193 conduce a un aumento de su actividad peroxidasa y a una disminución de la susceptibilidad a la hiperoxidación de la enzima, postulándose un aceleramiento del cierre del enlace disulfuro (87). Este residuo de tirosina está conservado en la Prx3 por lo que podría esperarse que este mecanismo regulatorio por nitración sea similar que para Prx2.

Cambios de fluorescencia intrínseca de Prx3 asociada a su estado redox:

Observamos que Prx3 sufre un cambio de fluorescencia intrínseca bifásico cuando reacciona con H_2O_2 . En las figuras 23 A-D se observó

una primer fase que transcurre de forma muy rápida (~10 ms) con un decaimiento de la intensidad de fluorescencia que se acelera al incrementar la concentración de H₂O₂ y una segunda fase que ocurre de forma más lenta que la primera, con incremento en la intensidad de fluorescencia. Nosotros postulamos que la constante de velocidad de esta primera fase se corresponde con la oxidación del tiol peroxidático de la enzima por su rapidez ($> 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y por su dependencia con la concentración de H₂O₂. El valor de la constante de velocidad de oxidación de C_P en Prx3 por H₂O₂ fue previamente reportado por Nagy como $(1.9 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 25 °C por ensayos de competencia con catalasa y con HRP (170).

Incubando la Prx3 con concentraciones de H₂O₂ en exceso, pudimos observar que la constante de velocidad observada de la segunda fase del cambio de fluorescencia parece ser prácticamente independiente de la concentración de H₂O₂ a bajas concentraciones del mismo, como fue reportado recientemente por L. Poole y su grupo de investigadores para la AhpC, peroxirredoxina de la misma subfamilia que Prx3 (171). Sin embargo para las concentraciones mayores de H₂O₂ sí se observa un aumento de la constante de velocidad observada del proceso con la concentración de H₂O₂ (Figura 24 A-B). Nosotros postulamos que el valor de corte en la ordenada Y de estos gráficos corresponden a la constante de velocidad del paso limitante en la serie de reacciones que llevan al cierre del enlace disulfuro, que incluyen el desplegamiento local y la posterior reacción con la cisteína resolutive, que posee valores de $2.04 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ a 14°C y de $1.38 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ a 7.5°C. Por su parte, la pendiente de los gráficos se correspondería con la constante de segundo orden de velocidad de hiperoxidación de la enzima, con valores de $1010 \pm 31 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ y $616 \pm 24 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ trabajando a pH 7.8, 14°C y 7.5°C, respectivamente. Los valores de constantes de velocidad de formación de disulfuro y de hiperoxidación de Prx3 por H₂O₂ fueron previamente reportados por Peskin como 22 s^{-1} y $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente, a pH 7.4 y 20°C,

utilizando una metodología diferente (separación de formas reducida, oxidada y hiperoxidada de la enzima por electroforesis combinado con competencia con catalasa) (172). Los valores obtenidos en este trabajo son entonces diferentes (más lentos) que los reportados previamente, lo que puede ser explicado en parte por las diferentes condiciones experimentales empleadas en este trabajo (pH 7.8 y 14°C o 7.5°C).

Creemos que para comprender mejor las diferentes fases en el cambio de fluorescencia obtenido sería de utilidad disponer de formas mutantes de Prx3 carentes de cisteína resolutive, que impediría la formación del disulfuro.

6 CONCLUSIONES:

- Pudimos expresar y purificar Prx3 humana con alto grado de pureza y sin cola de histidina.
- Comprobamos que Prx3 presenta actividad peroxinitrito reductasa.
- Determinamos por dos ensayos de cinética competitiva diferentes que Prx3 reacciona con peroxinitrito con una constante de velocidad alta, en el orden de $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que nos permite inferir que esta peroxidasa es un buen blanco para el peroxinitrito en la mitocondria.
- El peroxinitrito conduce a modificaciones postraduccionales de Prx3, hiperoxida sus C_P y nitra residuo(s) de tirosina.
- La Prx3 sufre cambios complejos en su fluorescencia intrínseca de Trp durante su reacción con H_2O_2 , que fueron interpretados en forma preliminar como debidos a la oxidación de C_P , formación de disulfuro e hiperoxidación.

7 PERSPECTIVAS:

- Determinar qué residuos de tirosina son nitrados cuando se incubaba Prx3 con peroxinitrito en exceso y qué consecuencias estructurales y funcionales provoca tal modificación postraducciona en la enzima, como fue estudiado para Prx2. En esta última fue reportado que la nitración de residuos específicos de tirosina conduce a un aumento de su actividad peroxidasa y a una disminución de la susceptibilidad a hiperoxidarse (87). Por tanto se procedería a medir la actividad enzimática de cada parte del ciclo catalítico de la enzima nitrada y sin nitrar (oxidación, formación del enlace disulfuro y reducción por TR2) y comparar si alguna etapa cambia su cinética en presencia de residuos de tirosina nitrados. Por su parte para evaluar si la nitración de Prx3 conduce a cambios en la susceptibilidad a la hiperoxidación, se podría optar por realizar un western blot anti-sulfínico/sulfónico para la enzima nitrada y sin nitrar, en las mismas condiciones y comparar el resultado revelado para ambas enzimas.

Se podría evaluar si la nitración afecta el estado de oligomerización de Prx3 bovina, para la cual si está reportada su estructura cristalográfica y se sugiere que es muy similar a la Prx3 humana.

Por otra parte, nuestras predicciones cinéticas indican que aproximadamente un 3% del peroxinitrito mitocondrial reaccionaría con CO_2 rindiendo radicales secundarios capaces de nitrar residuos de tirosina. Sería interesante estudiar si se produce nitración de Prx3 a concentraciones menores de peroxinitrito en presencia de CO_2 , y si el sitio de nitración se mantiene en este caso.

- Intentaremos confirmar utilizando mutantes de Prx3 en la C_P y C_R , que el cambio de fluorescencia bifásico observado al incubar Prx3 con H_2O_2 en exceso, corresponden realmente a la oxidación de la enzima y al cierre de disulfuro, respectivamente. Tal confirmación sería de gran

contribución para plantearnos determinar la constante de hiperoxidación de Prx3 por peroxinitrito, de la misma manera que lo realizamos para H_2O_2 .

- Sería de gran interés detectar si las modificaciones postraduccionales estudiadas en Prx3 ocurren *in vivo* y para ello utilizaríamos mitocondrias aisladas generadoras de peroxinitrito (173).
- Por su parte, utilizando células 'Knock Out' para Prx3 se podría estudiar su susceptibilidad al peroxinitrito, en comparación con células salvajes.

8 BIBLIOGRAFÍA:

1. Bolisetty, S., and Jaimes, E. A. (2013) Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology, *Int J Mol Sci* 14, 6306-6344.
2. Huang, J., Lin, S. C., Nadershahi, A., Watts, S. W., and Sarkar, R. (2008) Role of redox signaling and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase activation in vascular smooth muscle cell growth inhibition by nitric oxide and peroxynitrite, *J Vasc Surg* 47, 599-607.
3. Allen, R. G., and Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation, *Free Radic Biol Med* 28, 463-499.
4. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., and Floyd, R. A. (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury, *Free Radic Biol Med* 28, 1456-1462.
5. Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A. C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R., and Cayota, A. M. (1999) Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death, *J Immunol* 162, 3356-3366.
6. Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J., and Carreras, M. C. (2012) Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation, *Antioxid Redox Signal* 16, 1150-1180.
7. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., and Pelicci, P. G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?, *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 722-728.
8. Frey, R. S., Ushio-Fukai, M., and Malik, A. B. (2009) NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology, *Antioxid Redox Signal* 11, 791-810.
9. Jones, D. P. (2006) Redefining oxidative stress, *Antioxid Redox Signal* 8, 1865-1879.
10. Souza, J. M., Peluffo, G., and Radi, R. (2008) Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker?, *Free Radic Biol Med* 45, 357-366.
11. Zhang, Y. J., Xu, Y. F., Chen, X. Q., Wang, X. C., and Wang, J. Z. (2005) Nitration and oligomerization of tau induced by peroxynitrite inhibit its microtubule-binding activity, *FEBS Lett* 579, 2421-2427.
12. Souza, J. M., Giasson, B. I., Chen, Q., Lee, V. M., and Ischiropoulos, H. (2000) Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha -synuclein polymers. Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies, *J Biol Chem* 275, 18344-18349.
13. Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J., and Ischiropoulos, H. (2000) Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Arch Biochem Biophys* 380, 360-366.
14. Grune, T., Klotz, L. O., Gieche, J., Rudeck, M., and Sies, H. (2001) Protein oxidation and proteolysis by the nonradical oxidants singlet oxygen or peroxynitrite, *Free Radic Biol Med* 30, 1243-1253.
15. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for

- endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1620-1624.
16. Huie, R. E., and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide, *Free Radic Res Commun* 18, 195-199.
 17. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis, *Chem Res Toxicol* 10, 1285-1292.
 18. Goldstein, S., and Czapski, G. (1995) The reaction of NO with O₂⁻ and HO₂[·]: a pulse radiolysis study, *Free Radic Biol Med* 19, 505-510.
 19. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* 87, 315-424.
 20. Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant, *J Biol Chem* 288, 26464-26472.
 21. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly, *Am J Physiol* 271, C1424-1437.
 22. Douglas D. Thomas, W. F.-S., Christopher H, Switzer, David A. Wink and Lisa A. Ridnour. (2010) Determinants of Nitric Oxide Chemistry: Impact of Cell Signaling Processes, In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.).
 23. Brett, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., and Snyder, S. H. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase, *Nature* 351, 714-718.
 24. Denicola, A., Souza, J. M., Radi, R., and Lissi, E. (1996) Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching, *Arch Biochem Biophys* 328, 208-212.
 25. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L., and Radi, R. (2007) Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite, *Subcell Biochem* 44, 83-113.
 26. Cadenas, E., and Davies, K. J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic Biol Med* 29, 222-230.
 27. Williams, D. M., Lee, G. R., and Cartwright, G. E. (1974) The role of superoxide anion radical in the reduction of ferritin iron by xanthine oxidase, *J Clin Invest* 53, 665-667.
 28. Katsuyama, M., Matsuno, K., and Yabe-Nishimura, C. (2012) Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme, *J Clin Biochem Nutr* 50, 9-22.
 29. Pryor, W. A., and Squadrito, G. L. (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide, *Am J Physiol* 268, L699-722.
 30. Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3566-3571.
 31. Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols, *Arch Biochem Biophys* 397, 91-98.
 32. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J Biol Chem* 266, 4244-4250.

33. Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxyxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide, *J Biol Chem* 269, 29409-29415.
34. Alvarez, B., and Radi, R. (2003) Peroxyxynitrite reactivity with amino acids and proteins, *Amino Acids* 25, 295-311.
35. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J., Romero, N., Thomson, L., Radi, R. (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxyxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration, In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.), pp 73-74.
36. Crow, J. P., Beckman, J. S., and McCord, J. M. (1995) Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxyxynitrite, *Biochemistry* 34, 3544-3552.
37. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations, *Arch Biochem Biophys* 333, 49-58.
38. Gerasimov, O. V., Lymar, S.V. . (1999) The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxyxynitrous acid., *Inorg. Chem*, 38, 34 317-4321.
39. Lymar, S. V., Hurst, J.K. (1995) Rapid reaction between peroxyxynitrite anion and carbon dioxide: implication for biological activity *J. Am. Chem*, 117, 8867-8868
40. Bonini, M. G., and Augusto, O. (2001) Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxyxynitrite, *J Biol Chem* 276, 9749-9754.
41. Pryor, W. A., Lemerrier, J. N., Zhang, H., Uppu, R. M., and Squadrito, G. L. (1997) The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxyxynitrite, *Free Radic Biol Med* 23, 331-338.
42. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J., Romero, N., Thomson, L., Radi, R. . (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxyxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration, In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.), p 77.
43. Rhee, S. G., Jeong, W., Chang, T. S., and Woo, H. A. (2007) Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance, *Kidney Int Suppl*, S3-8.
44. Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) Pathways of peroxyxynitrite oxidation of thiol groups, *Biochem J* 322 (Pt 1), 167-173.
45. Wardman, P. v. S., C. (1995) Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells, *Methods Enzymol.*, 251, 231-245.
46. Wardman, P. (1998) Evaluation of the " radical sink " hypothesis from a chemical-kinetic viewpoint *J. Radiat. Nucl. Chem.* , 232, 223-227
47. Madej, E., Folkes, L. K., Wardman, P., Czapski, G., and Goldstein, S. (2008) Thiyl radicals react with nitric oxide to form S-nitrosothiols with rate constants near the diffusion-controlled limit, *Free Radic Biol Med* 44, 2013-2018.
48. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J., Romero, N., Thomson, L., Radi, R. (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxyxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration., In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.), p 164.
49. Buchczyk, D. P., Grune, T., Sies, H., and Klotz, L. O. (2003) Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing

- concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome, *Biol Chem* 384, 237-241.
50. Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., and Telleri, R. (1994) Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys* 308, 89-95.
 51. Rork, T. H., Hadzimichalis, N. M., Kappil, M. A., and Merrill, G. F. (2006) Acetaminophen attenuates peroxynitrite-activated matrix metalloproteinase-2-mediated troponin I cleavage in the isolated guinea pig myocardium, *J Mol Cell Cardiol* 40, 553-561.
 52. Wang, W., Sawicki, G., and Schulz, R. (2002) Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2, *Cardiovasc Res* 53, 165-174.
 53. Boccini, F., and Herold, S. (2004) Mechanistic studies of the oxidation of oxyhemoglobin by peroxynitrite, *Biochemistry* 43, 16393-16404.
 54. Herold, S., Exner, M., and Boccini, F. (2003) The mechanism of the peroxynitrite-mediated oxidation of myoglobin in the absence and presence of carbon dioxide, *Chem Res Toxicol* 16, 390-402.
 55. Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., and Radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems, *Arch Biochem Biophys* 319, 491-497.
 56. Demicheli, V., Quijano, C., Alvarez, B., and Radi, R. (2007) Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide, *Free Radic Biol Med* 42, 1359-1368.
 57. Floris, R., Piersma, S. R., Yang, G., Jones, P., and Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase, *Eur J Biochem* 215, 767-775.
 58. Trujillo, M. A., B; Souza J.Jose; Romero,N; Castro,L; Thomson,L; Radi, R. (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration, 72.
 59. Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration, *Chem Res Toxicol* 9, 390-396.
 60. van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B., and Cross, C. E. (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity, *J Biol Chem* 272, 7617-7625.
 61. Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I., and Bartsch, H. (1990) Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins, *Food Chem Toxicol* 28, 647-652.
 62. Beckman, J. S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite, *Chem Res Toxicol* 9, 836-844.
 63. Ischiropoulos, H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration, *Biochem Biophys Res Commun* 305, 776-783.
 64. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4003-4008.
 65. Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R. A., Santos, C. X., Yamada, A. T., and Augusto, O. (2001) Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo

- revealed by protein nitration and hydroxylation, *Free Radic Biol Med* 30, 1234-1242.
66. Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B., and Radi, R. (2007) Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments, *Amino Acids* 32, 501-515.
 67. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J., Romero, N., Thomson, L., Radi, R. . (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration., In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.).
 68. Furtmuller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Schwanninger, M., Jakopitsch, C., Herold, S., Koppenol, W. H., and Obinger, C. (2005) Peroxynitrite efficiently mediates the interconversion of redox intermediates of myeloperoxidase, *Biochem Biophys Res Commun* 337, 944-954.
 69. Gunther, M. R., Hsi, L. C., Curtis, J. F., Gierse, J. K., Marnett, L. J., Eling, T. E., and Mason, R. P. (1997) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation, *J Biol Chem* 272, 17086-17090.
 70. Trujillo, M., Alvarez, B., Souza, J., Romero, N., Thomson, L., Radi, R. . (2009) Mechanisms and Biological Consequences of Peroxynitrite-Dependent Protein Oxidation and Nitration, In *Nitric Oxide Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., Ed.), p 78.
 71. Chen, H. J., and Chiu, W. L. (2008) Simultaneous detection and quantification of 3-nitrotyrosine and 3-bromotyrosine in human urine by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Toxicol Lett* 181, 31-39.
 72. Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S., and Ischiropoulos, H. (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration, *Arch Biochem Biophys* 371, 169-178.
 73. Gorg, B., Qvartskhava, N., Voss, P., Grune, T., Haussinger, D., and Schliess, F. (2007) Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration, *FEBS Lett* 581, 84-90.
 74. Zou, M. H., Cohen, R., and Ullrich, V. (2004) Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Endothelium* 11, 89-97.
 75. Chabrier, P. E., Demerle-Pallardy, C., and Auguet, M. (1999) Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases, *Cell Mol Life Sci* 55, 1029-1035.
 76. Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (2003) Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?, *J Clin Invest* 111, 163-169.
 77. Torreilles, F., Salman-Tabcheh, S., Guerin, M., and Torreilles, J. (1999) Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite, *Brain Res Brain Res Rev* 30, 153-163.
 78. Shah, A. M., and MacCarthy, P. A. (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function, *Pharmacol Ther* 86, 49-86.
 79. Uppu, R. M., Nossaman, B. D., Greco, A. J., Fokin, A., Murthy, S. N., Fonseca, V. A., and Kadowitz, P. J. (2007) Cardiovascular effects of peroxynitrite, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 933-937.

80. Cross, A. H., Manning, P. T., Stern, M. K., and Misko, T. P. (1997) Evidence for the production of peroxynitrite in inflammatory CNS demyelination, *J Neuroimmunol* *80*, 121-130.
81. Sandhu, J. K., Robertson, S., Birnboim, H. C., and Goldstein, R. (2003) Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *J Rheumatol* *30*, 1173-1181.
82. Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* *87*, 329-331.
83. MacMillan-Crow, L. A., and Thompson, J. A. (1999) Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys* *366*, 82-88.
84. Aoyama, K., Matsubara, K., Fujikawa, Y., Nagahiro, Y., Shimizu, K., Umegae, N., Hayase, N., Shiono, H., and Kobayashi, S. (2000) Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Ann Neurol* *47*, 524-527.
85. MacMillan-Crow, L. A., Cruthirds, D. L., Ahki, K. M., Sanders, P. W., and Thompson, J. A. (2001) Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy, *Free Radic Biol Med* *31*, 1603-1608.
86. Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A., and Radi, R. (2000) Cytochrome c nitration by peroxynitrite, *J Biol Chem* *275*, 21409-21415.
87. Randall, L. M., Manta, B., Hugo, M., Gil, M., Batthyany, C., Trujillo, M., Poole, L. B., and Denicola, A. (2014) Nitration transforms a sensitive peroxiredoxin 2 into a more active and robust peroxidase, *J Biol Chem* *289*, 15536-15543.
88. Nelson, K. J., Knutson, S. T., Soito, L., Klomsiri, C., Poole, L. B., and Fetrow, J. S. (2011) Analysis of the peroxiredoxin family: using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis, *Proteins* *79*, 947-964.
89. Rhee, S. G., Woo, H. A., Kil, I. S., and Bae, S. H. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides, *J Biol Chem* *287*, 4403-4410.
90. Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem Sci* *28*, 32-40.
91. Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins, *Antioxid Redox Signal* *15*, 795-815.
92. Nelson, K. J., Parsonage, D., Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Cysteine pK(a) values for the bacterial peroxiredoxin AhpC, *Biochemistry* *47*, 12860-12868.
93. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction, *Chem Res Toxicol* *24*, 434-450.
94. Flohe, L., Budde, H., Bruns, K., Castro, H., Clos, J., Hofmann, B., Kansal-Kalavar, S., Krumme, D., Menge, U., Plank-Schumacher, K., Sztajer, H., Wissing, J., Wylegalla, C., and Hecht, H. J. (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania*

- donovani: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism, *Arch Biochem Biophys* 397, 324-335.
95. Poole, L. B. (2007) The catalytic mechanism of peroxiredoxins, *Subcell Biochem* 44, 61-81.
 96. Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization, *J Mol Biol* 402, 194-209.
 97. Zeida, A., Reyes, A. M., Lebrero, M. C., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. (2014) The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step, *Chem Commun (Camb)* 50, 10070-10073.
 98. Perkins, A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2014) Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles, *Biochemistry* 53, 7693-7705.
 99. Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., and Netto, L. E. (2007) Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4886-4891.
 100. Jonsson, T. J., Ellis, H. R., and Poole, L. B. (2007) Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system, *Biochemistry* 46, 5709-5721.
 101. Arner, E. S. (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions, *Biochim Biophys Acta* 1790, 495-526.
 102. Poole, L. B., Hall, A., and Nelson, K. J. (2011) Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation, *Curr Protoc Toxicol Chapter 7*, Unit7 9.
 103. Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science* 300, 650-653.
 104. Pascual, M. B., Mata-Cabana, A., Florencio, F. J., Lindahl, M., and Cejudo, F. J. (2010) Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress, *J Biol Chem* 285, 34485-34492.
 105. Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K. S., Kang, S. W., Kim, K., and Rhee, S. G. (2003) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation, *Science* 300, 653-656.
 106. Chang, T. S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine, *J Biol Chem* 279, 50994-51001.
 107. Jeong, W., Park, S. J., Chang, T. S., Lee, D. Y., and Rhee, S. G. (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin, *J Biol Chem* 281, 14400-14407.
 108. Jonsson, T. J., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2009) Protein engineering of the quaternary sulfiredoxin.peroxiredoxin enzyme.substrate complex reveals the molecular basis for cysteine sulfinic acid phosphorylation, *J Biol Chem* 284, 33305-33310.
 109. Jonsson, T. J., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) Structure of the sulphiredoxin-peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace, *Nature* 451, 98-101.

110. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., Park, J. H., Lee, J. R., Lee, S. S., Moon, J. C., Yun, J. W., Choi, Y. O., Kim, W. Y., Kang, J. S., Cheong, G. W., Yun, D. J., Rhee, S. G., Cho, M. J., and Lee, S. Y. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function, *Cell* **117**, 625-635.
111. Castro, H., Teixeira, F., Romao, S., Santos, M., Cruz, T., Florido, M., Appelberg, R., Oliveira, P., Ferreira-da-Silva, F., and Tomas, A. M. (2011) Leishmania mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity, *PLoS Pathog* **7**, e1002325.
112. Murphy, M. P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J* **417**, 1-13.
113. Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell* **120**, 483-495.
114. Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., and Freeman, B. A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria, *J Biol Chem* **266**, 22028-22034.
115. Cox, A. G., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling, *Biochem J* **425**, 313-325.
116. Hanschmann, E. M., Lonn, M. E., Schutte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2010) Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3, *J Biol Chem* **285**, 40699-40705.
117. Cox, A. G., Peskin, A. V., Paton, L. N., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3, *Biochemistry* **48**, 6495-6501.
118. Halvey, P. J., Watson, W. H., Hansen, J. M., Go, Y. M., Samali, A., and Jones, D. P. (2005) Compartmental oxidation of thiol-disulphide redox couples during epidermal growth factor signalling, *Biochem J* **386**, 215-219.
119. Cox, A. G., Pearson, A. G., Pullar, J. M., Jonsson, T. J., Lowther, W. T., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2009) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins, *Biochem J* **421**, 51-58.
120. Haynes, A. C., Qian, J., Reisz, J. A., Furdui, C. M., and Lowther, W. T. (2013) Molecular basis for the resistance of human mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin 3 to hyperoxidation, *J Biol Chem* **288**, 29714-29723.
121. Kil, I. S., Ryu, K. W., Lee, S. K., Kim, J. Y., Chu, S. Y., Kim, J. H., Park, S., and Rhee, S. G. (2015) Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria, *Mol Cell* **59**, 651-663.
122. Noh, Y. H., Baek, J. Y., Jeong, W., Rhee, S. G., and Chang, T. S. (2009) Sulfiredoxin Translocation into Mitochondria Plays a Crucial Role in Reducing Hyperoxidized Peroxiredoxin III, *J Biol Chem* **284**, 8470-8477.
123. Schroder, E., Littlechild, J. A., Lebedev, A. A., Errington, N., Vagin, A. A., and Isupov, M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution, *Structure* **8**, 605-615.

124. Wood, Z. A., Poole, L. B., Hantgan, R. R., and Karplus, P. A. (2002) Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins, *Biochemistry* **41**, 5493-5504.
125. Cao, Z., Roszak, A. W., Gourlay, L. J., Lindsay, J. G., and Isaacs, N. W. (2005) Bovine mitochondrial peroxiredoxin III forms a two-ring catenane, *Structure* **13**, 1661-1664.
126. Gourlay, L. J., Bhella, D., Kelly, S. M., Price, N. C., and Lindsay, J. G. (2003) Structure-function analysis of recombinant substrate protein 22 kDa (SP-22). A mitochondrial 2-CYS peroxiredoxin organized as a decameric toroid, *J Biol Chem* **278**, 32631-32637.
127. Barranco-Medina, S., Kakorin, S., Lazaro, J. J., and Dietz, K. J. (2008) Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-cys peroxiredoxin, *Biochemistry* **47**, 7196-7204.
128. Cao, Z., Bhella, D., and Lindsay, J. G. (2007) Reconstitution of the mitochondrial PrxIII antioxidant defence pathway: general properties and factors affecting PrxIII activity and oligomeric state, *J Mol Biol* **372**, 1022-1033.
129. Chang, T. S., Cho, C. S., Park, S., Yu, S., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2004) Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria, *J Biol Chem* **279**, 41975-41984.
130. Nonn, L., Berggren, M., and Powis, G. (2003) Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis, *Mol Cancer Res* **1**, 682-689.
131. Li, L., Kaifu, T., Obinata, M., and Takai, T. (2009) Peroxiredoxin III-deficiency sensitizes macrophages to oxidative stress, *J Biochem* **145**, 425-427.
132. Hattori, F., Murayama, N., Noshita, T., and Oikawa, S. (2003) Mitochondrial peroxiredoxin-3 protects hippocampal neurons from excitotoxic injury in vivo, *J Neurochem* **86**, 860-868.
133. Chen, L., Na, R., Gu, M., Salmon, A. B., Liu, Y., Liang, H., Qi, W., Van Remmen, H., Richardson, A., and Ran, Q. (2008) Reduction of mitochondrial H₂O₂ by overexpressing peroxiredoxin 3 improves glucose tolerance in mice, *Aging Cell* **7**, 866-878.
134. Lehtonen, S. T., Svensk, A. M., Soini, Y., Paakko, P., Hirvikoski, P., Kang, S. W., Saily, M., and Kinnula, V. L. (2004) Peroxiredoxins, a novel protein family in lung cancer, *Int J Cancer* **111**, 514-521.
135. Roumes, H., Pires-Alves, A., Gonthier-Maurin, L., Dargelos, E., and Cottin, P. (2010) Investigation of peroxiredoxin IV as a calpain-regulated pathway in cancer, *Anticancer Res* **30**, 5085-5089.
136. Neumann, C. A., and Fang, Q. (2007) Are peroxiredoxins tumor suppressors?, *Curr Opin Pharmacol* **7**, 375-380.
137. Neumann, C. A., Krause, D. S., Carman, C. V., Das, S., Dubey, D. P., Abraham, J. L., Bronson, R. T., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., and Van Etten, R. A. (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression, *Nature* **424**, 561-565.
138. Flohe, L. (2010) Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation, *Methods Enzymol* **473**, 1-39.

139. Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., and Chang, T. S. (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification, *Antioxid Redox Signal* 7, 619-626.
140. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoop, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation, *Arch Biochem Biophys* 467, 95-106.
141. Watabe, S., Kohno, H., Kouyama, H., Hiroi, T., Yago, N., and Nakazawa, T. (1994) Purification and characterization of a substrate protein for mitochondrial ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex, *J Biochem* 115, 648-654.
142. Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin, *Diabetes Res Clin Pract* 45, 101-112.
143. Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., Hill, D. E., Vidal, M., Evans, J. G., Thorburn, D. R., Carr, S. A., and Mootha, V. K. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology, *Cell* 134, 112-123.
144. Cordray, P., Doyle, K., Edes, K., Moos, P. J., and Fitzpatrick, F. A. (2007) Oxidation of 2-Cys-peroxiredoxins by arachidonic acid peroxide metabolites of lipoxygenases and cyclooxygenase-2, *J Biol Chem* 282, 32623-32629.
145. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Arch Biochem Biophys* 484, 146-154.
146. Turko, I. V., Li, L., Aulak, K. S., Stuehr, D. J., Chang, J. Y., and Murad, F. (2003) Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes, *J Biol Chem* 278, 33972-33977.
147. Alvarez, B., Demicheli, V., Duran, R., Trujillo, M., Cervenansky, C., Freeman, B. A., and Radi, R. (2004) Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical, *Free Radic Biol Med* 37, 813-822.
148. Hildebraunt, A. G., and Roots, I. (1975) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent formation and breakdown of hydrogen peroxide during mixed function oxidation reactions in liver microsomes, *Arch Biochem Biophys* 171, 385-397.
149. Naviliat, M., Gualco, G., Cayota, A., and Radi, R. (2005) Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice, *Braz J Med Biol Res* 38, 1825-1834.
150. van den Berg, S., Lofdahl, P. A., Hard, T., and Berglund, H. (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution, *J Biotechnol* 121, 291-298.
151. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins, *Methods Enzymol* 441, 173-196.
152. Loumaye, E., Ferrer-Sueta, G., Alvarez, B., Rees, J. F., Clippe, A., Knoop, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Kinetic studies of peroxiredoxin 6 from *Arenicola marina*: rapid oxidation by hydrogen peroxide and peroxynitrite but lack of reduction by hydrogen sulfide, *Arch Biochem Biophys* 514, 1-7.

153. Sikora, A., Zielonka, J., Lopez, M., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2009) Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite, *Free Radic Biol Med* 47, 1401-1407.
154. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins, *Nature* 407, 211-215.
155. Pineyro, M. D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011) Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys* 507, 287-295.
156. Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics, *Free Radic Biol Med* 42, 326-334.
157. Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L. E., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009) Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics, *Biochemistry* 48, 9416-9426.
158. Toledo, J. C., Jr., Audi, R., Ogusucu, R., Monteiro, G., Netto, L. E., and Augusto, O. (2011) Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics, *Free Radic Biol Med* 50, 1032-1038.
159. Horta, B. B., de Oliveira, M. A., Discola, K. F., Cussiol, J. R., and Netto, L. E. (2010) Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity, *J Biol Chem* 285, 16051-16065.
160. Jaeger, T., Budde, H., Flohe, L., Menge, U., Singh, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*, *Arch Biochem Biophys* 423, 182-191.
161. Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chem Res Toxicol* 5, 834-842.
162. Tortora, V., Quijano, C., Freeman, B., Radi, R., and Castro, L. (2007) Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation, *Free Radic Biol Med* 42, 1075-1088.
163. Castro, L. A., Robalinho, R. L., Cayota, A., Meneghini, R., and Radi, R. (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts, *Arch Biochem Biophys* 359, 215-224.
164. Quijano, C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J. M., Freeman, B. A., and Radi, R. (2001) Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration, *J Biol Chem* 276, 11631-11638.
165. Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H., and Sies, H. (1998) Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite, *Chem Res Toxicol* 11, 1398-1401.

166. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2008) Peroxynitrite detoxification and its biologic implications, *Antioxid Redox Signal* 10, 1607-1620.
167. Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2008) Thiol chemistry and specificity in redox signaling, *Free Radic Biol Med* 45, 549-561.
168. Takakura, K., Beckman, J. S., MacMillan-Crow, L. A., and Crow, J. P. (1999) Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45, and LAR by peroxynitrite, *Arch Biochem Biophys* 369, 197-207.
169. Peshenko, I. V., and Shichi, H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite, *Free Radic Biol Med* 31, 292-303.
170. Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A. V., Pace, P., O'Reilly, R. J., Hampton, M. B., Radom, L., and Winterbourn, C. C. (2011) Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study, *J Biol Chem* 286, 18048-18055.
171. Parsonage, D., Nelson, K. J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P. A., Furdui, C. M., and Poole, L. B. (2015) Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC, *Biochemistry* 54, 1567-1575.
172. Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine, *J Biol Chem* 288, 14170-14177.
173. Valez, V., Cassina, A., Batinic-Haberle, I., Kalyanaraman, B., Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2013) Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins, *Arch Biochem Biophys* 529, 45-54.

