

Informe final publicable de proyecto

Reducción de peroxirredoxinas y su participación en la transducción de señales por peróxido de hidrógeno

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155969

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2023

FERRER SUETA, Gerardo (Responsable Técnico - Científico)

DENICOLA CRECI, Ana (Co-Responsable Técnico-Científico)

MÁRQUEZ DE LOS SANTOS, María Belén (Investigador)

BONILLA CHAO, Mariana Magdalena (Investigador)

CORRALES GONZÁLEZ, Laura Patricia (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \ \

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Las peroxiredoxinas (Prx) son peroxidases que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por reductores endógenos usando uno o dos residuos de cisteína. En esta propuesta usamos dos 2-Cys Prx humanas, cuyo ciclo catalítico consta de tres reacciones: oxidación, resolución y reducción. La oxidación por H₂O₂ es muy rápida, pero la resolución y reducción son suficientemente lentas como para permitir que los productos sean detectados y reaccionen con sustratos alternativos y que transmitan la información relativa a la presencia de H₂O₂. Propusimos investigar la cinética de reducción de dos 2Cys Prx humanas en dos aspectos diferentes. Primero, la reducción de Prx como disulfuro por tioredoxinas (el sustrato habitual) y usaremos tioredoxinas de diferentes especies para tratar de comprender la base de la especificidad de la reacción. El segundo aspecto se refiere a la reducción del ácido sulfénico de la Prx con sustratos alternativos descritos en la literatura como participantes en la señalización redox. Intentaremos la reducción con STAT3 (un factor de transcripción) y Anexina A2 (AnxA2, una proteína involucrada en la unión de complejos proteicos al citoesqueleto). Estudiaremos la reducción de forma individual y conjunta con la idea de formar un complejo ternario en el cual la AnxA2 actúa como soporte de la interacción. El conocimiento de la especificidad, la unión y la cinética de reacción puede brindar pistas para comprender cuantitativamente la participación de las Prx en la señalización redox mediada por H₂O₂.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Enzimología y bioquímica redox

Palabras clave: Transducción de señales / Peroxirredoxina / Oxidorreducción / Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Nuestro laboratorio ha estudiado el funcionamiento y mecanismos de catálisis de las peroxirredoxinas (Prx) durante las últimas décadas [1-15]. Durante ese tiempo, la percepción general de la comunidad científica ha ido cambiando desde la imagen original donde las Prx eran puramente enzimas antioxidantes dedicadas a la eliminación de hidroperóxidos, hasta una consideración más elaborada, según la cual la función antioxidante se solapa con la de detección de hidroperóxidos y transducción de señales mediante reacciones redox. Estas reacciones, adicionales al ciclo catalítico se presentan en la Figura 1, donde se ve que los potenciales oxidantes responsables de las reacciones que terminan en transducción de señales son las formas oxidadas de las Prx, es decir, ácido sulfénico (RSOH) y disulfuro (RS₂).

Ante estas propuestas que han aparecido en la literatura de los últimos años [16-21] cobra especial relevancia la reacción de reducción del ciclo catalítico (Reacción 3 en la Fig. 1) dado que estaría en competencia directa con las vías de señalización (reacciones 8 y 10) y porque puede dar indicios de cuáles son los aspectos de la interacción proteína-proteína que facilitan las reacciones redox involucradas.

Así fue que planteamos el estudio de la reacción 3 empleando tioredoxinas (Trx) de diverso origen para encontrar rasgos comunes que puedan identificar la selectividad en las reacciones. Además, propusimos estudiar las reacciones con dos blancos alternativos que son las proteínas STAT3 y AnxA2.

Figura 1 (en archivo adjunto). Ciclo catalítico de las Prx de dos cisteínas (reacciones 1 – 3) donde se agregan reacciones alternativas de reducción (4, 8, 10) que incluyen oxidorreducción de proteínas blanco empleadas en la transducción de señales

Como las proteínas que funcionan como reductores alternativos no son necesariamente abundantes, se ha propuesto en la literatura [22] que se forme un complejo entre las proteínas reducidas y las Prx también reducidas, de manera que la reacción con el blanco alternativo no tenga que competir con la reacción con Trx. Dado lo cual planteamos estudiar la formación de dichos complejos con STAT3 y AnxA2 y de ser posible determinar las constantes de afinidad asociadas.

Finalmente, estimábamos posible hacer uso de una sonda fluorescente reportada en la literatura consistente en una proteína de fusión que incorpora una Prx (Prx2 humana) con una proteína fluorescente verde que responde a reacciones de oxidorreducción (roGFP2) [23]. La sonda mediante la oxidación de Prx, ya sea a la forma sulfénico o a disulfuro, y la posterior transferencia de la oxidación a la roGFP2 a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro como se muestra en el esquema 1 (en archivo adjunto).

Las formas reducidas de la roGFP2 tienen un espectro de excitación de fluorescencia con máximo en el visible (488 nm) mientras que la forma disulfuro tiene un máximo de excitación en el ultravioleta (405 nm), esta diferencia en la fluorescencia permite seguir las reacciones de oxidorreducción de la sonda.

Es bastante evidente que la sonda roGFP2 -. Prx2 no son la misma proteína, en particular en lo referente a la posible asociación con otros ligandos grandes como STAT3 o Anexina A3, pero con un esquema de competencia simple como el

que se describe en el Esquema 1 podríamos obtener información valiosa acerca de la cinética de los sistemas que nos ocupan.

Esquema 2 (en archivo adjunto). Uso de la sonda roGFP2-Prx2 como sistema de competencia en la reducción de Prx2. El funcionamiento normal de la sonda consiste en la oxidación de la cisteína (círculos amarillos) peroxidática de la Prx2 (dímero azul) a ácido sulfénico (SOH). Dicho ácido sulfénico reacciona con las cisteínas de la roGFP2 (rectángulo verde) y causa un cambio detectable en la fluorescencia de la GFP (reacción 1). Alternativamente, un blanco adicional del sulfénico (rectángulo naranja) podría actuar como reductor (reacción 2) y disminuir el cambio de fluorescencia observado con la sonda aislada.

Metodología/Diseño del estudio

Reducción de Prx1 y Prx2 por tiorredoxinas diversas

La reacción se estudió en el stopped flow, siguiendo la fluorescencia de triptófanos con excitación a 280 nm y emisión con filtro de paso de banda de 360 nm (U360). Las concentraciones y forma de mezcla elegidas obedecen a una metodología diseñada específicamente para este sistema consistente en aprovechar las velocidades relativas de las reacciones que componen el ciclo catalítico. El equipo mezcla el contenido de una jeringa que con Prx como disulfuro (0 – 6 micromolar después de mezclar) y H₂O₂ (1 micromolar después de mezclar) con otra que tiene la Trx reducida (0.2 micromolar después de mezclar). Bajo estas condiciones la Prx tiene la siguiente serie de reacciones:

- PrxS₂ reacciona con Trx(SH)₂ para producir Prx(SH)₂. (Reacción 3 en la Fig. 1)
- Prx(SH)₂ reacciona con H₂O₂ para producir Prx(SOH)(SH). (Reacción 1 en la Fig. 1)
- Prx(SOH)(SH) reacciona internamente para formar PrxS₂. (Reacción 2 en la Fig. 1)

Este método aprovecha varias condiciones favorables de la cinética y la fluorescencia de las Prx:

1. La reacción 1 es extremadamente rápida, con una constante de velocidad aparente > 100 s⁻¹ con 1 micromolar H₂O₂;
2. La reacción 2 es relativamente lenta, con constantes de velocidad aparentes de 12 s⁻¹ para Prx1 y 0.2 s⁻¹ para Prx2 [11]
3. La mayor parte del cambio de emisión de fluorescencia sucede en las reacciones 1 (disminución) o 2 (aumento), dado que tanto para Prx1 como para Prx2, PrxS₂ y Prx(SH)₂ tienen espectros y rendimientos cuánticos muy similares como se muestra en la Figura 2 (en archivo adjunto).
4. En las condiciones del experimento la contribución de la Trx al cambio de fluorescencia es mínima y en todo caso va en la misma dirección que el cambio de fluorescencia de la Prx.

Figura 2. Espectros de excitación de Prx1 y Prx2 como ditiol, ácido sulfénico y disulfuro reconstruidos de los cursos temporales de oxidación de 0.5 micromolar Prx(SH)₂ con 1 micromolar H₂O₂.

Los cambios de fluorescencia observados en los cursos temporales tienen el patrón bifásico habitual observado en la oxidación de Prx [9-12, 24]. Sin embargo, dado que la reacción 1 es mucho más rápida que la reacción 3, lo que se observa como disminución en la fluorescencia asociada a la oxidación a ácido sulfénico es en realidad la formación de Prx(SH)₂ (que es el paso limitante de la velocidad) con una caída exponencial que es mucho más lenta que la constante de velocidad esperada para la oxidación.

Asociación de las Prx reducidas con STAT3 y AnxA2

El estudio de la asociación de estas proteínas con Prx reducidas se hizo hasta el momento mediante técnicas de fluorescencia resuelta en el tiempo empleando el análisis de fasores [25] que permite simplificar el análisis de tiempos de vida de los fluoróforos intrínsecos de las proteínas (principalmente triptófano) y reducir cada proteína a un punto dentro del llamado círculo universal determinado por la modulación empleada para el análisis y el desplazamiento de fase observado. A grandes rasgos, cada proteína está representada por un punto experimental dentro de dicho círculo y una mezcla de proteínas deberá dar un punto intermedio y alineado con los extremos que representan a cada proteína por separado. Si para mezcla se obtiene un punto que no está alineado, esto indica que hay una interacción y la formación de complejos proteína-proteína que alteran la fluorescencia que resulta diferente a la suma de las partes.

También se emplearon métodos de electroforesis diagonal en geles de poli(acrilamida) [26] con una dimensión sin reductor de disulfuros y la segunda dimensión con reducción. Esta técnica permite encontrar heterodisulfuros que al reducirse dan bandas de electroforesis con la movilidad característica de cada uno de sus componentes. Las muestras para estos geles se prepararon con y sin oxidante (H₂O₂) y variando las concentraciones y el orden en que se agregan los reactivos.

Reducción de Prx1 y Prx2 por los reductores alternativos STAT3 y AnxA2

Los experimentos se realizaron mediante técnicas de cinética rápida en el Stopped Flow, siguiendo la fluorescencia de los triptófanos y en busca de modificaciones en los patrones habituales de oxidación de las Prx [11]. Sabemos que al formarse el ácido sulfénico en las Prx se produce un rápido y marcado descenso en la fluorescencia seguido por una recuperación

más lenta y dependiente de cuál Prx se está estudiando. En nuestra hipótesis si AnxA2 o STAT3 son capaces de interceptar el ácido sulfénico se debería observar una variación notable en la velocidad de cambio y la intensidad de fluorescencia.

Uso de la sonda roGFP2hPrx2-Delta-CR para estimar las constantes de velocidad entre el ácido sulfénico de la Prx, STAT3 y AnxA2

Inicialmente intentamos durante muchos meses la expresión y purificación de la sonda roGFP2hPrx2-Delta-CR con escasísimo éxito. La proteína se producía con muy bajo rendimiento, era difícil de obtener pura y, cuando finalmente lo logramos en alguna cantidad útil, la proteína resultó inactiva, muy probablemente por hiperoxidación de la cisteína peroxidática (CP) de la Prx2 [27].

En primera instancia determinamos las constantes de velocidad de la oxidación de la CP de la sonda mediante la fluorescencia del triptófano, como lo hemos hecho previamente para Prx2. En segundo término, determinaremos las constantes de velocidad del intercambio redox entre el ácido sulfénico de la CP y las cisteínas de la roGFP2 siguiendo los cambios de fluorescencia y empleando el perfil diferencial en el espectro de excitación de la roGFP2 en las formas ditiol y disulfuro [23].

Al comprobar que el intercambio redox entre los dos centros redox (Prx y roGFP2) es muy lento se perdió el interés de hacer una competencia con STAT3 y AnxA2 ya que no permitiría determinar constantes de velocidad.

Resultados, análisis y discusión

Reducción de Prx1 y Prx2 por tiorredoxinas diversas

Cinética de la reacción

Gracias a la metodología desarrollada en el laboratorio aprovechando las condiciones cinéticas y espectroscópicas del ciclo catalítico de las Prx (descrito en detalle en la sección de metodología) se pudieron determinar constantes de velocidad de reducción con tres Trx, dos humanas (Hs Trx1 y Hs Trx2) y una bacteriana (Ec Trx) con las dos peroxirredoxinas estudiadas. Los resultados numéricos se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 3 (en archivo adjunto) se ilustra la metodología y algunos de los resultados obtenidos para Prx2.

Se hicieron experimentos similares con Prx1 humana con las mismas tres Trx y también se estudió el efecto del pH sobre las reacciones de Prx2 a fin de comprender mejor los mecanismos de activación de la cisteína nucleofílica de las Trx, dichos resultados se encuentran con mayor detalle en el manuscrito depositado como parte de este informe (<https://hdl.handle.net/20.500.12381/3291>).

Figure 3. A. Esquema del método que aprovecha el paso limitante de la velocidad. B. Cursos temporales de la reducción de 4 micromolar Prx2S2 con 0.2 micromolar Trx(SH)2 en presencia de 1 micromolar H2O2. Las líneas son los promedios de diez reacciones con HsTrx1 (naranja), HsTrx2 (violeta), o EcTrx (rojo), y la línea gris es el experimento de control sin. Los mejores parámetros de ajuste a una ecuación de dos exponenciales producen dos constantes de velocidad: una para la parte descendente de los cursos temporales (kdn, C) y una para la parte ascendente (kup, D). Las pendientes de regresión lineal del panel C y las ordenadas al origen del panel D se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Constantes de velocidad de segundo orden para la reducción de PrxS2 por Trx(SH)2 y tris carboxietil fosfina (TCEP).

Reductor Prx1 Prx2

k (M⁻¹ s⁻¹)

TCEP 3.66 6.25

HsTrx1 $2.2 \pm 0.1 \times 10^6$ $6.1 \pm 0.2 \times 10^5$

HsTrx2 $1.9 \pm 0.02 \times 10^6$ $5.2 \pm 0.1 \times 10^5$

EcTrx $2.5 \pm 0.6 \times 10^6$ $4.2 \pm 0.2 \times 10^5$

La parte cinética fue la más exitosa del proyecto, se lograron determinar constantes de velocidad que resultaron cuatro a cinco órdenes de magnitud mayores que lo esperado para intercambios tiol disulfuro en ausencia de catálisis. Además, se observó que la reactividad de las cisteínas nucleofílicas de las tiorredoxinas de modificaba notablemente por la interacción con la peroxirredoxina.

Correlación entre parámetros cinéticos y estructurales de las tiorredoxinas que permitan entender la interacción específica con Prx

Para este objetivo se realizaron estudios de química computacional con herramientas de docking y simulaciones de

dinámica molecular. Para las tres tiorredoxinas estudiadas los resultados muestran que la superficie de interacción está compuesta por residuos principalmente no polares y no cargados (Región 1, Fig. 4, en archivo adjunto) y que dichos residuos son los que más contribuyen a la energía de unión (DeltaG Binding). No se ven diferencias importantes entre las tres Trx lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos.

Figura 4. Caracterización de la interacción entre Prx2 y Trx. A. Representación de cintas del complejo entre Prx2S2 (azul) y HsTrx1 (naranja). El área de la interacción se muestra como una superficie que contiene a las regiones 1 (gris) y 2 (verde). B. Cálculo estimado por MM-GBSA de la Delta G Binding (kcal/mol) para cada complejo C. Descomposición de la Delta G Binding por residuo para HsTrx1. Los residuos más relevantes para la superficie de interacción se muestran para HsTrx1 (D), HsTrx2 (E) y EcTrx (F). Las superficies representan las regiones 1 y 2, y los residuos aparecen en azul (Prx2S2), naranja (HsTrx1), violeta (HsTrx2) y rojo (EcTrx).

Además de verse una interacción marcadamente hidrofóbica entre Trx y Prx, los cálculos de dinámica molecular permitieron observar que la ionización de la cisteína nucleofílica de la Trx causa una importante desestabilización en el complejo Trx-Prx. Esto último también puede interpretarse como que la cisteína nucleofílica en forma de tiolato se ve obligada a la interacción debido a la unión ejercida por sus residuos vecinos.

Asociación de las Prx reducidas con reductores alternativos

La asociación entre proteínas reducidas se estudió en solución mediante el análisis de fasores de los tiempos de vida de fluorescencia. Algunos de los resultados pueden verse en la Figura 5 (en archivo adjunto). La Prx2 mostrada en ese ejemplo tiene el comportamiento esperado para una proteína que tiene un equilibrio entre dímeros y decámeros, tal como se observó para Prx1 [14] la posición del fador depende de la concentración de la proteína. Algo similar se aprecia para AnxA2 cuyo fador tiene un desplazamiento notable entre 2.1 y 2.8 micromolar. Las mezclas 1 a 1, por el contrario, tienen una posición bastante constante y esto provoca que en las menores concentraciones la posición del fador de la mezcla no esté alineado con los de las proteínas puras (Fig. 5 derecha). Esto indica una interacción entre las proteínas que aparentemente es más marcada cuando están en forma de oligómeros menores. Hasta el momento no ha sido posible hacer una determinación cuantitativa de las constantes de unión para estas interacciones.

Figura 5. Análisis de fasores de la interacción entre Prx2 y AnxA2. El panel izquierdo muestra los ensayos realizados para AnxA2 sola (cuadrados), Prx2 sola (triángulos hacia abajo) y mezclas equimolares de ambas proteínas (triángulos hacia arriba). Las concentraciones (micromolares) son las que se indican en la leyenda. El panel izquierdo muestra el detalle del experimento realizado con 2.1 micromolar de cada proteína por separado (círculos rojos) o una mezcla con 2.1 micromolar de cada una (cuadrados negros).

La otra metodología empleada para estudiar la interacción entre Prx y reductores alternativos son los llamados geles diagonales, una técnica de electroforesis bidimensional que se emplea para detectar disulfuros formados entre proteínas diferentes e identificar los residuos involucrados en dicha interacción. En el ejemplo de la Figura 6 (en archivo adjunto) se muestra un gel no reductor con muestras de Prx2 y AnxA2 en presencia y ausencia de H₂O₂. Se pueden observar las bandas características de Prx2 reducida (22 kDa) y AnxA2 reducida (38 kDa) en el carril 1. Cuando Prx se oxida con un ligero exceso de H₂O₂ migra en el gel como un dímero de 44 kDa (carril 2). A su vez, cuando se trata la AnxA2 con H₂O₂ en leve exceso (carril 4) o gran exceso (carril 5) se intensifica la banda de 75 kDa y mayores. Lo más interesante sucede cuando están presentes las dos proteínas y H₂O₂. En el carril 3 la Prx2 se oxidó primero con H₂O₂ y después se agregó la AnxA2. En el carril 7 el H₂O₂ se agregó a una mezcla de las dos proteínas reducidas. Tanto en 3 como en 7 aparece una banda nueva (marcada en un recuadro punteado) cuya movilidad corresponde a la de un heterodisulfuro de 60 kDa, pero su intensidad es mayor en el carril 7. Además, en el carril 7 se observa otra banda previamente no detectada con movilidad entre 110 y 160 kDa que podría corresponder a un heterodisulfuro tetramérico con dos subunidades de Prx y dos de AnxA2. Estas muestras se encuentran actualmente en cola para analizarse mediante espectrometría de masa en el IP Montevideo. Cabe mencionar que un gel equivalente realizado con Prx1 en lugar de Prx2 no muestra las bandas señaladas en recuadros punteados y eso es congruente con los resultados mostrados por el laboratorio de Tobias Dansen que encuentra interacción entre AnxA2 y Prx2 pero no Prx1 [20]. El gel diagonal (Fig. 6, derecha) se hizo con una muestra equivalente al carril 7 del gel anterior colocado horizontalmente con la parte de mayor masa molecular del lado izquierdo. Se observa claramente cómo los dímeros de Prx2 se reducen y aparecen como una mancha intensa por debajo de la diagonal con una movilidad de 22 kDa, pero la parte más interesante está marcada con un recuadro rojo y contiene

bandas debajo de la diagonal que contienen proteínas de 22 y 38 kDa después de la reducción que apoyaría la presencia de heterodímeros unidos por disulfuros.

Figura 6. Electroforesis de los productos de reacción entre Prx2, AnxA2 y H2O2. Izquierda: Gel 12% sin reductor. Carriles: MPM (Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard). 1. AnxA2 + Prx2 reducidas. 2. Prx2 + H2O2. 3. Prx2 + H2O2 + AnxA2. 4. AnxA2 + H2O2. 5. AnxA2 + H2O2. 6. Libre. 7. AnxA2 + H2O2 + Prx2. Condiciones: Prx2 17 micromolar, AnxA2 14.5 micromolar, H2O2 27 micromolar, excepto en carril 5 donde H2O2 543 micromolar. Derecha: gel reductor, se siembra MPM y el carril 8 del gel anterior (misma muestra que el carril 7) tratado con 4 mM DTT a pH 6.8 durante 2 h. Los recuadros rojos indican las bandas de interés.

Uso de sondas fluorescentes para estimar las constantes de velocidad entre el ácido sulfénico de la Prx, STAT3 y AnxA2. Este fue el objetivo que rindió menos resultados, a pesar de muchos meses y muchos intentos, la producción de la sonda que originalmente propuesta (roGFP2hPrx2 Delta CR) resultó francamente insuficiente. Los rendimientos siempre fueron bajos y la proteína obtenida resultó inactiva, no pudimos observar que consumiera H2O2 en ninguno de nuestros experimentos ni pudimos medir actividad Prx con el sistema tradicional que involucra Trx, Tiorredoxina reductasa y NADPH. En algún momento del proceso de producción la Prx2 Delta CR perdió actividad, probablemente hiperoxidación de la CP. Tras muchos intentos con la sonda original modificamos el abordaje usando sondas que contienen la proteína sin mutación de la cisteína resolutive y compramos las construcciones para Prx2 y Prx1 WT. Las dos se pudieron expresar, aunque nuevamente con bajos rendimientos y dificultades en la purificación. No obstante, la cinética de la oxidación de la parte Prx resulta prácticamente indistinguible de la oxidación de Prx aislada como puede verse en la Figura 7A (en archivo adjunto) comparada con el trazo negro de la Fig. 7B. Esto fue una sorpresa, ya que indica que nuestra hipótesis de que la oxidación de la roGFP2 mediada por el ácido sulfénico estaba equivocada. La oxidación de la roGFP2 sucede a tiempos mucho más largos (> 30 min) y probablemente está mediada por el disulfuro que, como se vio en la Fig. 2, tiene una emisión de fluorescencia muy similar a la forma reducida de la Prx. Es decir, las sondas que pudimos obtener no resultaron útiles ya que no participaban en la reacción redox de la manera que habíamos propuesto.

Figura 7. A. Oxidación de la sonda roGFP2-Prx2WT (0.5 micromolar) con H2O2 5 micromolar observada mediante la fluorescencia de triptófano con excitación a 280 nm y el filtro de paso de banda U360. La línea punteada roja es el mejor ajuste a una función con tres exponenciales. B. Cinética de oxidación de Prx2 0.5 micromolar con H2O2 5 micromolar en presencia de diferentes concentraciones de AnxA2 según se indica. La señal de emisión fluorescente se obtiene con excitación a 280 nm y un filtro U360. El eje y está normalizado para poder comparar mejor los trazos. Condiciones Prx2, H2O2, pH = 7, 25 °C.

Reducción de Prx1 y Prx2 por los reductores alternativos

Intentamos estudiar la reducción de Prx por los reductores alternativos siguiendo el ya familiar curso temporal de fluorescencia. Nuestra expectativa era ver un cambio significativo en el curso temporal, porque el ácido sulfénico se vería interceptado por el reductor alternativo. De esta manera, su acumulación implicaría una bajada menos profunda de la fluorescencia junto con una recuperación más rápida del nivel original. Recordemos que la Prx en disulfuro y la Prx reducida tienen espectros de emisión muy similares (Fig. 2). No fue eso lo que vimos, en la Fig. 7B se puede apreciar que los cursos temporales de Prx oxidada con H2O2 en ausencia y en presencia de AnxA2, en concentraciones sub estequiométricas o en exceso son prácticamente indistinguibles.

Nuevamente, igual que se vio en los experimentos de electroforesis (Fig. 6), la forma de la Prx que aparece como mejor candidato a funcionar como oxidante es el disulfuro

Conclusiones y recomendaciones

Al concluir este periodo del proyecto las sensaciones son encontradas. Por una parte, tuvimos muy buen éxito en la caracterización de la reacción con tiorredoxinas, obtuvimos resultados sólidos tras haber desarrollado nueva metodología cinética y contamos con resultados cuantitativos importantes. Además, el estudio estructural y de química computacional permitió encontrar mecanismos que explican el funcionamiento y la activación de la nucleofilia de la cisteína de las Trx. A pesar de que esperábamos encontrar una mayor diversidad entre las diferentes Trx estudiadas, los resultados apuntan a que los sitios de reconocimiento entre los sitios activos de Trx y Prx están sumamente conservados a lo largo de la evolución.

Además de buenos resultados con la reducción con Trx también tuvimos un importante desarrollo metodológico para abordar las interacciones proteína-proteína cuando ajustamos el método de análisis de fasores a nuestro problema específico de las interacciones de Prx. Paralelo a este proyecto pudimos estudiar los equilibrios entre dímeros y decámeros para Prx1 [14] y dos de los integrantes del equipo fueron invitados a escribir un artículo de revisión sobre

métodos para estudiar la dinámica de la estructura cuaternaria en Prx [28]. Todo ese desarrollo metodológico nos ha servido y nos servirá para estudiar la interacción de Prx con otras proteínas.

Los resultados obtenidos en los capítulos referentes al uso de sondas fluorescentes como indicadores y competidores de las reacciones de oxidorreducción entre Prx y reductores alternativos resultaron bastante menos alentadores. Aparte de los inconvenientes encontrados en el camino de obtención de las sondas en sí, una de nuestras hipótesis demostró ser errónea, a saber, el oxidante de la Prx no parece ser el ácido sulfénico como habíamos propuesto. En este momento todo apunta a que el disulfuro es responsable de oxidar tanto a roGFP2 como a los reductores alternativos. Esto nos obliga a replantear los abordajes experimentales a emplear y nos ha impedido obtener los resultados cuantitativos que esperábamos en la determinación de constantes de velocidad de reacción.

Durante el desarrollo del proyecto y en parte debido a que no todo salió como lo habíamos pronosticado, el rediseño de estrategias experimentales condujo al abordaje de nuevas proteínas a estudiar en su función como reductores alternativos de Prx. Entre ellas se encuentran la enzima cistationina beta-sintasa y la proteína nuclear HMGB1, ambas identificadas en experimentos celulares como interactores de Prx. Esto nos llevó a escribir un nuevo proyecto de Investigación que Ana Denicola presentó ante CSIC con buen éxito el año pasado y también a que Sebastián Villar realizara una pasantía de investigación con experimentos en células para estudiar la interacción entre Prx y cistationina beta-sintasa. Dicha pasantía se desarrolló en la Universidad de Heidelberg en el laboratorio del Profesor Tobias Dick en el segundo semestre de 2022.

El proyecto continúa y continuará por años por venir, tenemos más de quince años estudiando reacciones de Prx y continuaremos acompañando la evolución del campo.

Referencias bibliográficas

1. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J. P., Knoops, B. & Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation, *Archives of biochemistry and biophysics*. 467, 95-106.
2. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohe, L. & Radi, R. (2007) Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite, *Sub-cellular biochemistry*. 44, 83-113.
3. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G. & Radi, R. (2008) Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins, *Methods in enzymology*. 441, 173-96.
4. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M. & Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Archives of biochemistry and biophysics*. 484, 146-54.
5. Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M. & Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction, *Chemical research in toxicology*. 24, 434-50.
6. Loumaye, E., Ferrer-Sueta, G., Alvarez, B., Rees, J. F., Clippe, A., Knoops, B., Radi, R. & 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, *Archives of biochemistry and biophysics*. 514, 1-7.
7. Randall, L. M., Ferrer-Sueta, G. & Denicola, A. (2013) Peroxiredoxins as preferential targets in H₂O₂-induced signaling, *Methods in enzymology*. 527, 41-63.
8. Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitino, E. L. & Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine, *Biochemistry*. 53, 6113-25.
9. Parsonage, D., Nelson, K. J., Ferrer-Sueta, G., Alley, S., Karplus, P. A., Furdui, C. M. & Poole, L. B. (2015) Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC, *Biochemistry*. 54, 1567-75.
10. Tairum, C. A., Santos, M. C., Breyer, C. A., Geyer, R. R., Nieves, C. J., Portillo-Ledesma, S., Ferrer-Sueta, G., Toledo, J. C., Jr., Toyama, M. H., Augusto, O., Netto, L. E. & de Oliveira, M. A. (2016) Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms, *Scientific reports*. 6, 33133.
11. Portillo-Ledesma, S., Randall, L. M., Parsonage, D., Dalla Rizza, J., Karplus, P. A., Poole, L. B., Denicola, A. & Ferrer-Sueta, G. (2018) Differential Kinetics of Two-Cysteine Peroxiredoxin Disulfide Formation Reveal a Novel Model for Peroxide Sensing, *Biochemistry*. 57, 3416-3424.
12. Dalla Rizza, J., Randall, L. M., Santos, J., Ferrer-Sueta, G. & Denicola, A. (2019) Differential parameters between cytosolic 2-Cys peroxiredoxins, PRDX1 and PRDX2, *Protein science : a publication of the Protein Society*. 28, 191-201.
13. Zeida, A., Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Denicola, A., Estrin, D. A. & Radi, R. (2019) Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols, *Chemical reviews*. 119, 10829-10855.
14. Villar, S. F., Dalla-Rizza, J., Moller, M. N., Ferrer-Sueta, G., Malacrida, L., Jameson, D. M. & Denicola, A. (2022) Fluorescence Lifetime Phasor Analysis of the Decamer-Dimer Equilibrium of Human Peroxiredoxin 1, *International journal of molecular sciences*. 23.
15. Villar, S. F., Ferrer-Sueta, G. & Denicola, A. (2023) The multifaceted nature of peroxiredoxins in chemical biology, *Curr Opin Chem Biol*. 76, 102355.
16. Sobotta, M. C., Liou, W., Stocker, S., Talwar, D., Oehler, M., Ruppert, T., Scharf, A. N. & Dick, T. P. (2015) Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling, *Nat Chem Biol*. 11, 64-70.
17. Stocker, S., Maurer, M., Ruppert, T. & Dick, T. P. (2018) A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation, *Nat Chem Biol*. 14, 148-155.
18. Talwar, D., Messens, J. & Dick, T. P. (2020) A role for annexin A2 in scaffolding the peroxiredoxin 2-STAT3 redox relay complex, *Nature communications*. 11, 4512.
19. Talwar, D. & Dick, T. P. (2022) Chapter 14 - Thiol peroxidase-based redox relays in Redox Chemistry and Biology of Thiols (Alvarez, B., Comini, M. A., Salinas, G. & Trujillo, M., eds) pp. 307-320, Academic Press.
20. van Dam, L., Pages-Gallego, M., Polderman, P. E., van Es, R. M., Burgering, B. M. T., Vos, H. R. & Dansen, T. B. (2021) The Human 2-Cys Peroxiredoxins form Widespread, Cysteine-Dependent- and Isoform-Specific Protein-Protein Interactions, *Antioxidants*. 10, 627.
21. Stocker, S., Van Laer, K., Mijuskovic, A. & Dick, T. P. (2018) The Conundrum of Hydrogen Peroxide Signaling and the Emerging Role of Peroxiredoxins as Redox Relay Hubs, *Antioxid Redox Signal*. 28, 558-573.
22. Langford, T. F., Deen, W. M. & Sikes, H. D. (2018) A mathematical analysis of Prx2-STAT3 disulfide exchange rate constants for a bimolecular reaction mechanism, *Free Radic Biol Med*. 120, 239-245.
23. Morgan, B., Van Laer, K., Owusu, T. N., Ezerina, D., Pastor-Flores, D., Amponsah, P. S., Tursch, A. & Dick, T. P. (2016)

Real-time monitoring of basal H₂O₂ levels with peroxiredoxin-based probes, *Nat Chem Biol.* 12, 437-43.

24. Carvalho, L. A. C., Truzzi, D. R., Fallani, T. S., Alves, S. V., Toledo, J. C., Jr., Augusto, O., Netto, L. E. S. & Meotti, F. C. (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2, *J Biol Chem.* 292, 8705-8715.

25. Malacrida, L., Ranjit, S., Jameson, D. M. & Gratton, E. (2021) The Phasor Plot: A Universal Circle to Advance Fluorescence Lifetime Analysis and Interpretation, *Annu Rev Biophys.* 50, 575-593.

26. Sommer, A. & Traut, R. R. (1974) Diagonal polyacrylamide-dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins crosslinked with methyl-4-mercaptobutyrimidate, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71, 3946-50.

27. Gutscher, M., Sobotta, M. C., Wabnitz, G. H., Ballikaya, S., Meyer, A. J., Samstag, Y. & Dick, T. P. (2009) Proximity-based protein thiol oxidation by H₂O₂-scavenging peroxidases, *J Biol Chem.* 284, 31532-40.

28. Villar, S. F., Moller, M. N. & Denicola, A. (2023) Biophysical tools to study the oligomerization dynamics of Prx1-class peroxiredoxins, *Biophys Rev.* 15, 601-609.

(Dadas las limitaciones de formato y la imposibilidad de incluir imágenes recomiendo leer el informe completo anexo en formato pdf)

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)