

Un vistazo biofísico-funcional a los sistemas redox tiorredoxina y glutaredoxina

A biophysical-functional glance to the thioredoxin and glutaredoxin redox systems

Diego S. Vazquez^{†a}

Recibido 17 Septiembre 2018,
 Aceptado 1 Noviembre 2018

www.unipaz.edu.co

Resumen: En este artículo de revisión discutimos aspectos centrales sobre las proteínas que componen al sistema tiorredoxina (TRX). En primera instancia se contextualiza al sistema TRX en el marco del balance redox celular y su relación con el estrés oxidativo. Posteriormente ahondamos en aspectos biofísicos y funcionales de las proteínas componentes del sistema utilizando las proteínas de *Escherichia coli* como sistema modelo, que son la tiorredoxina reductasa, la tiorredoxina y las peroxirredoxinas, una de las proteínas *target* del sistema TRX. Además introducimos brevemente a las glutaredoxinas como el otro sistema proteico implicado en la mantención del balance redox celular. **Palabras claves:** balance redox, estrés oxidativo, dinámica proteica e interacción proteína-proteína.

Abstract: In this review, we discuss central aspects of the thioredoxin system (TRX). First, the TRX system is contextualized within the framework of the cellular redox balance and its relationship with oxidative stress. Later we delve into the biophysical and functional aspects of the components of the TRX system using the *Escherichia coli* proteins as a model, such as thioredoxin reductase, thioredoxin and peroxiredoxin as one of the target proteins. We also briefly introduce the glutaredoxin system as the other protein system involved in the maintenance of cellular redox balance. **Keywords:** redox balance, oxidative stress, protein dynamics, and protein-protein interaction.

EL DESTINO CELULAR: BALANCE REDOX Y ESTRÉS OXIDATIVO

En un trabajo pionero en el campo de la bioquímica de proteínas realizado a fines de los años '60s, McCord y Fridovich relacionaron por primera vez la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) de eritrocitos bovinos – enzima que cataliza en presencia de Cu^{2+} , la dismutación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) – con diversos procesos de detoxificación celular de especies reactivas¹. Este hecho fue el puntapié inicial para el surgimiento de numerosas investigaciones sobre los denominados *radicales libres* y *metabolitos reactivos no-radicalarios* derivados del oxígeno (ROS, de *reactive oxygen species*) como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, y del nitrógeno² (RNS, de *reactive nitrogen species*) como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el

peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), este último considerado uno de los más potentes oxidantes biológicos³.

Estudios realizados a comienzos del 1900 por Moses Gomberg en reacciones químicas sobre compuestos inorgánicos de halogenuros de trifenilmetano sobre iones metálicos⁴ y posteriormente por Paneth y Hofeditz en la producción del radical metilo⁵, demostraron fehacientemente la existencia de los radicales libres y, más importante aún, que otras reacciones químicas de origen orgánico podrían involucrar un intermediario radicalar. Los radicales libres suelen generarse en pasos intermedios de ciertas reacciones químicas y se caracterizan por tener un electrón desapareado, otorgándole una alta inestabilidad y reactividad química^{6,7}. Además poseen un tiempo de vida media muy corto que oscila en el orden de los pocos milisegundos.

El radical superóxido, como muchos otros radicales libres, es un producto de la respiración aeróbica celular y, en eucariotas, la mitocondria es la principal fuente de ROS⁸. Tanto ROS como RNS son fisiológicamente necesarios y a la vez

^aLaboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 352 (1876), Buenos Aires, Argentina.

†dsvazquez86@gmail.com

potencialmente destructivos⁹. Niveles bajos o moderados de estas especies químicas desempeñan roles específicos en la modulación de diversos procesos celulares como transducción de señales, proliferación celular y expresión de genes. Por el contrario, altos niveles de ROS/RNS pueden causar daños irreversibles a diversas biomoléculas esenciales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos¹⁰, lo que posiblemente lleve a la muerte celular¹¹. El desbalance óxido-reductor celular producto de concentraciones anormales de especies reactivas es lo que se conoce como **estrés oxidativo** y está vinculado con diversas patologías humanas como cáncer^{12,13}, enfermedades neurodegenerativas¹⁴ y diabetes^{15,16}.

Durante muchos años, el H₂O₂ fue vinculado de manera casi exclusiva al daño oxidativo en células¹⁷. Sin embargo, hoy en día existen numerosas evidencias que indican que el H₂O₂ producido es parte esencial de los complejos sistemas de señalización celular y media importantes procesos como la proliferación, diferenciación y migración celular. Para contribuir con la homeostasis celular y evitar el estrés oxidativo, diversas maquinarias celulares han evolucionado para contrarrestar los efectos nocivos de especies reactivas, tanto de origen proteico como la SOD, las hidroxidasas, la tiorredoxina reductasa, la tiorredoxina, las glutaredoxinas, la catalasa, y las peroxirredoxinas; y no proteico, como el ácido ascórbico, flavonoides, α -tocoferol, y el glutatión (GSH, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), este último un tripéptido no proteico con un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo del glutamato que lo protege de la degradación por aminopeptidasas^{18,19}.

ROL DEL SISTEMA TIORREDOXINA EN EL BALANCE REDOX CELULAR

El sistema tiorredoxina (TRX) es el principal sistema molecular en la célula con actividad disulfuro reductasa²⁰. Su rol es proveer equivalentes de electrones para un número importante de enzimas *target*, y está involucrado de manera directa o indirecta en la síntesis de

ADN, defensa contra el daño oxidativo, el correcto plegado de proteínas *in vivo*, el proceso carcinogénico y manifestación del fenotipo invasivo de diferentes tipos de cánceres, entre otros importantes roles fisiológicos.

En la mayoría de los organismos, el sistema TRX está compuesto por la tiorredoxina reductasa (TR), una flavoproteína dependiente de NADPH y la propiamente tiorredoxina (TRX), una óxido-reductasa dependiente de cisteína la cual es reducida por TR (Figura 1). La TRX en su estado reducido biológicamente activo funciona como agente reductor de numerosas proteínas *target*, entre ellas una muy importante son las peroxirredoxinas (PRDXs) las cuales describiremos en detalle en las siguientes secciones.

En el interior celular el ambiente redox es principalmente reductor gracias a la presencia del GSH el cual está presente en una concentración aproximada de 5 mM, tanto en células bacterianas como de mamíferos, donde más del 99% se encuentra en su forma reducida gracias a la acción de una proteína constitutiva denominada glutatión-disulfuro reductasa²¹. De todas maneras, las células necesitan de sistemas reductores específicos y altamente eficientes y uno de ellos involucra a las TRX. El nombre *tiorredoxina* fue introducido en 1964 por Peter Reichard por ser el sustrato reductor de la ribonucleótido reductasa, enzima esencial en la síntesis *de novo* de 2'-desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos. Las TRX son proteínas ubicuas y se expresan en todas las formas de vida conocidas, desde arqueas hasta mamíferos y plantas y cumplen un enorme repertorio de roles fisiológicos intracelulares tales como el ya mencionado control del estrés oxidativo, protección de la agregación oxidativa y regulación de la muerte celular programada (apoptosis) mediante mecanismos de desnitrosilación. Además, poseen actividad chaperona al promover el correcto plegado de proteínas mediante el intercambio tiol/disulfuro y juegan un rol importante en el ciclo infectivo de algunos virus y fagos. Las TRX tienen además actividades extracelulares, una muy importante es la activación de canales transientes de potencial

químico dependientes de cationes los cuales actúan putativamente como sensores químicos celulares. En las siguientes secciones describiremos más en detalle cada una de las proteínas de la vía TRX.

Además introduciremos a otro miembro importante en el balance redox celular como son las glutaredoxinas.

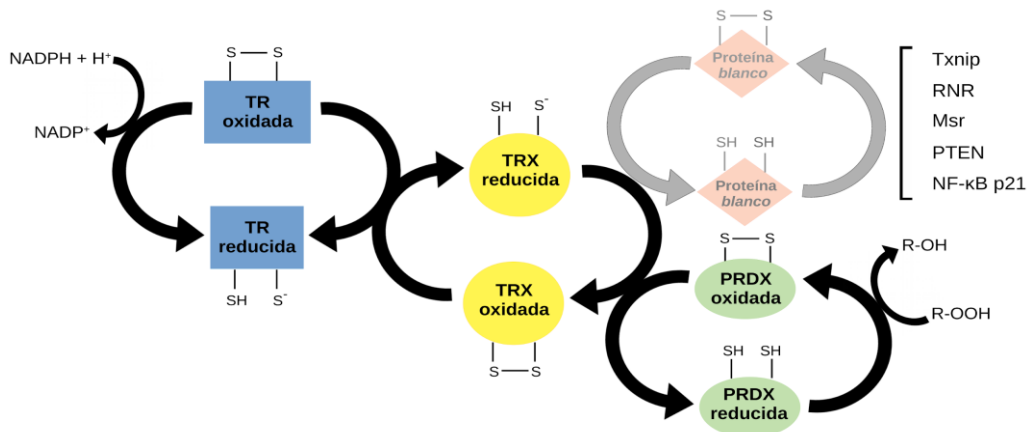


Fig. 1: Esquema del flujo de electrones de la vía tiorredoxina. La tiorredoxina (TRX) reduce proteínas oxidadas (e.g. PRDXs) utilizando equivalentes de electrones provenientes del NADPH a través de la tiorredoxina reductasa (TR). Algunos otros ejemplos de proteínas *target* de la TRX son las proteínas interactuantes con TRX (Txnip), la ribonucleótido reductasa (RNR), la metionina sulfóxido reductasa (Msr), ciertas fosfatasas (PTEN) y el factor de transcripción NF-κB, entre otras.

EL EXTREMO REDUCTOR DE LA VÍA TRX: LA TIORREDOXINA REDUCTASA

Las TRs son flavoproteínas homodiméricas dependientes de flavin adenín dinucleótido (FAD) las cuales utilizan además nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador de electrones y pertenecen a la familia de las piridina nucleótido-disulfuro óxido-reductasas²².

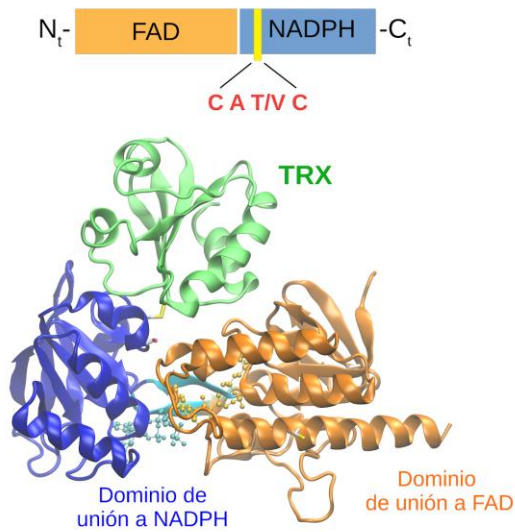
Estructuralmente, las TRs se clasifican en dos grupos: de bajo peso molecular (*low-Mr*, ~35 kDa por subunidad) y de alto peso molecular (*high-Mr*, >55 kDa por subunidad). Si bien la principal función de ambos grupos es reducir a la tiorredoxina, tanto la estructura, el sitio activo como el mecanismo de reducción son bien distintos. Las TR de bajo peso molecular se encuentran en arqueas, bacterias, hongos y plantas y contienen dos dominios globulares conocidos como dominio de unión al cofactor FAD y dominio de unión a la coenzima NADPH²². Estos dominios globulares se encuentran conectados por dos hebras beta antiparalelas (Figura 2). El sitio

activo, contenido en el dominio de unión a NADPH, incluye al motivo CxxC, ampliamente distribuido y presente en numerosas enzimas con actividad redox, incluyendo las tiorredoxinas²². Por otro lado, las TR de alto peso molecular se encuentran principalmente en mamíferos²³ y son dependientes de selenocisteína de forma obligada²⁴ ya que mutaciones de selenocisteína (U o Sec) por cisteína dan como resultado una proteína disfuncional²⁵.

LA TIORREDOXINA COMO CENTRO DE DISTRIBUCIÓN DE EQUIVALENTES REDOX

Recientemente, el grupo del Dr. J. M. Sánchez-Ruiz de la Universidad de Granada y colaboradores lograron reconstruir mediante la construcción de árboles filogenéticos de secuencias actuales de más de 200 tiorredoxinas, secuencias de nodos precámbricos de los linajes *bacteria*, *arquea* y *eucariota* que datan de entre 1 y 4 mil millones de años atrás²⁶.

TR de bajo peso molecular



TR de alto peso molecular

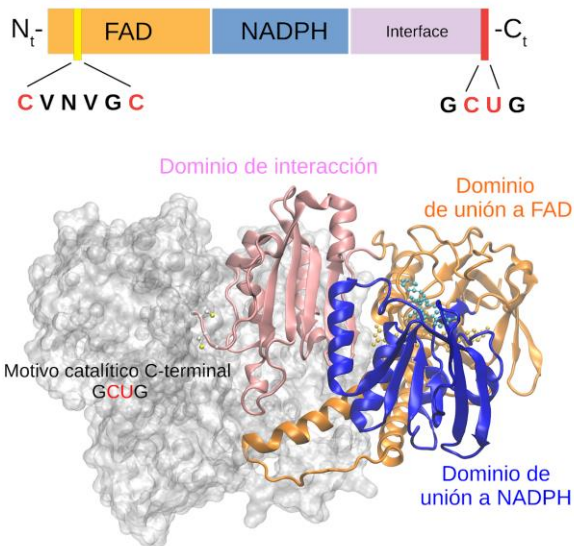


Fig. 2: Estructura de TR de bajo y alto peso molecular. Estructura de una TR de bajo peso molecular bacteriana (*E. coli*, PDB ID 1F6M, arriba) y una alto peso molecular de mamífero (Rata parda, PDB ID 1H6V, abajo) donde los dominios de unión a FAD y NADPH están marcados en naranja y azul, respectivamente. Adicionalmente se muestra el dominio denominado interfase (rosa) en las TR de alto peso molecular involucrado en el proceso de dimerización. Además, se muestra la localización secuencial de los residuos del sitio activo en ambos tipos de TR.

Sorprendentemente las proteínas ancestrales “resucitadas” en el laboratorio mostraron una

mayor temperatura media de desplegamiento (T_m) con un incremento cercano a los 32 °C en relación a la TRX silvestre moderna de *E. coli*. Más aún, las TRXs más antiguas en el árbol filogenético mostraron una actividad marcadamente superior con respecto a las actuales a pH 5 y similares a los obtenidos para las TRXs actuales a pH neutro. Estos resultados son compatibles con las condiciones geológicas tempranas (altas temperaturas y océanos ácidos) de la historia de la Tierra²⁷. Las estructuras tridimensionales de las TRXs con secuencias precámbricas comparten el plegado prototípico TRX lo cual sugiere fuertemente que tanto el plegado como la actividad óxido-reductasa surgieron tempranamente y con éxito en la historia evolutiva y fue adaptándose progresivamente a las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas (fuerza iónica, temperatura, presión, etc.) que se conocen de los organismos actuales^{26,28}.

Las TRXs son óxido-reductasas pequeñas de alrededor de 100-110 residuos de aminoácidos con una topología α/β característica que consiste en un núcleo β rodeado de hélices α (Figura 3 panel A). En particular, *E. coli* posee dos tiorredoxinas denominadas TRX1, la cual denominaremos *EcTRX* a lo largo de este trabajo, y TRX2 que están codificadas por los genes *trxA* y *trxC*, respectivamente²⁹. *EcTRX* es la isoforma más utilizada históricamente en estudios biofísicos y enzimáticos. Experimentos realizados por diversos grupos indican que, tanto en experimentos de desplegamiento inducido por agentes caotrópicos o por temperatura, *EcTRX* es una proteína altamente estable³⁰ con una energía libre de desplegamiento (ΔG_{NU}^0) de $\sim 8 \text{ kcal mol}^{-1}$ en su estado oxidado y una T_m de $\sim 88 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual la convierte en una proteína mesófila con cierto carácter termófilo a nivel de estabilidad termodinámica. En su estado reducido, las TRXs suelen mostrar en general una menor estabilidad termodinámica³¹ respecto al estado oxidado, que en el caso particular de la *EcTRX* es de $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Además, la constante cinética de desplegamiento de la *EcTRX* silvestre en su estado oxidado extrapolada a cero concentración de desnaturante es de 9.5×10^{-8} lo cual da

tiempo de vida medio de aproximadamente cuatro meses, indicando que *EcTRX* es también una proteína cinéticamente estable.

EcTRX parece ser un proceso complejo, incluyendo fases correspondientes a isomerizaciones *cis/trans* de prolinas y particularmente una fase muy rápida que podría deberse al colapso hidrofóbico del núcleo β de la proteína. Si bien diversos trabajos han caracterizado al desplegamiento cinético mediante una única fase correspondiente al desplegamiento global de la proteína^{32,33}, existe un intermediario de alta energía en experimentos cinéticos solo identificable a altas concentraciones de cloruro de guanidinio³⁰, un agente caotrópico fuerte comúnmente utilizado en protocolos biofísicos. En este sentido, Hamid Wani y Udgaonkar detectaron mediante experimentos en equilibrio y cinéticos, la presencia de un intermediario estable y parcialmente desestructurado en la ruta de desplegamiento a pH ácido³⁴. Sin embargo, este intermediario es indetectable en condiciones neutras de pH, por lo que los autores sugieren que el intermediario es lo suficientemente inestable para poblarse significativamente y ser detectable, y por ello, el proceso de desplegamiento puede caracterizarse mediante un modelo de dos estados en equilibrio y cinético a pH neutro³⁴.

Importantes estudios han sido realizados en la comprensión del rol que juega la hélice C-terminal (CTH, ver Figura 3) en el correcto plegado y funcionalidad de las TRXs. Santos y colaboradores^{35,36} desarrollaron un sistema de complementación entre la CTH y el módulo comprendido por los residuos 1-93 (TRX1-93) de la *EcTRX*. Estos sistemas han arrojado evidencias claras sobre la importancia de la CTH en la consolidación del ensamblaje nativo y la funcionalidad enzimática de la *EcTRX*. Además se demostró que la construcción carente de la región 94-108 (módulo TRX1-93) posee alteraciones estructurales significativas las cuales anulan su actividad catalítica³⁵. Un efecto similar fue observado en TraF, una proteína esencial para el correcto ensamblado del pilus-F bacteriano, donde la delección de la hélice C-terminal en la variante TraF Δ_4 podría conducir a la desestabilización global de la proteína incluso en la interacción con otras proteínas como TraH³⁷.

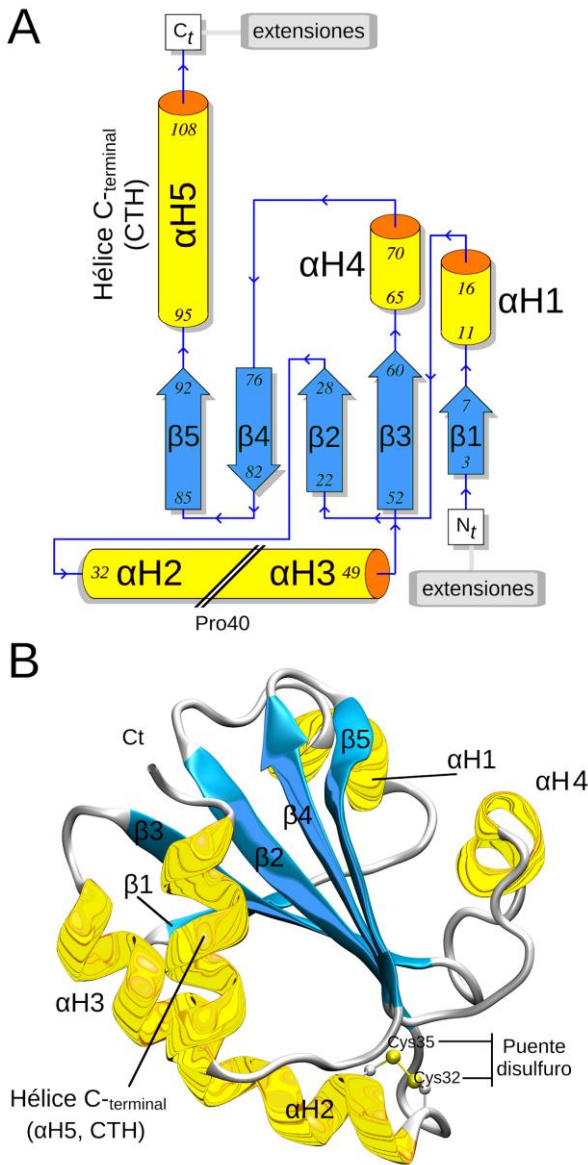


Fig. 3: Topología de la *EcTRX*. Diagrama de la topología 2D (panel A) y estructura tridimensional (panel B) de la *EcTRX* basada en el PDB ID 2TRX. Además se muestran las cisteínas Cys32 y Cys35 responsables de la actividad oxidoreductasa en CPK.

En el equilibrio, *EcTRX* se comporta como una proteína de dos estados N-U donde únicamente coexisten los estados nativo y desplegado. Desde el punto de vista cinético, el replegado *in vitro* de

Hace ya 50 años, Arne Holmgren determinó por primera vez la secuencia primaria completa de la *EcTRX*³⁸ y desde entonces se convirtió en una proteína modelo de estudios biofísicos como mecanismos de plegado, actividad enzimática, estabilidad termodinámica y cinética, interacción proteína-proteína y dinámica proteica. A mediados de los '70s, la primer estructura tridimensional de la variante silvestre de *EcTRX* fue resuelta por cristalografía de rayos X en su estado oxidado a 2.8 Å de resolución³⁹, hecho que permitió establecer las primeras relaciones funcionales con la estructura tridimensional. Casi veinte años más tarde, Katti y colaboradores⁴⁰ resolvieron la estructura de la *EcTRX* a 1.68 Å de resolución. En ese mismo tiempo, la estructura fue elucidada también por resonancia magnética nuclear (RMN) en los estados reducido y oxidado⁴¹ lo que permitió por primera vez el análisis de los cambios conformacionales y dinámicos que acompañan al estado de oxidación de la proteína⁴².

Si bien en términos generales, *EcTRX* presenta una estructura considerablemente rígida, existen diferencias en su dinámica interna en diferentes escalas temporales. En los pico- y nanosegundos se observan movimientos significativos de (I) ambos extremos N- y C-terminales, (II) los residuos 20-22 que conectan la hélice α H1 con la segunda hebra β

y (III) los residuos 73-75/93-94 que se localizan cerca del sitio activo en la estructura tridimensional. Por el contrario, sólo en el estado reducido, la región 73-75 muestra una dinámica mayor en los micro- y milisegundos en experimentos de relajación de ¹³C-RMN, lo cual puede ser asociado con un rol funcional⁴³.

Mecanísticamente, la actividad catalítica óxido-reductasa de las TRXs (Figura 4) implica en primera instancia el acercamiento y unión a una proteína *target* estableciendo una red de interacciones entre ambas cadenas principales que alteran el microambiente y la energética del puente disulfuro de la proteína *target*²⁰. Los mecanismos de la catálisis de *EcTRX* y otras TRXs representativas de los diferentes reinos de la vida han sido estudiados recientemente en detalle a nivel de molécula única utilizando espectroscopía de tipo *force-clamp*⁴⁴. Las TRXs procariontas utilizan un par redox ditiol/disulfuro involucrado en reacciones de 2-electrones con los *targets* oxidante (e.g. PRDXs) y reductor (TR, ver Figura 1). Este proceso es llevado a cabo por dos mecanismos diferentes: por medio de una sustitución nucleofílica bimolecular de tipo SN₂ o mediante una reacción de transferencia de 1-electrón tal como ocurre en las TRX eucariotas⁴⁴.

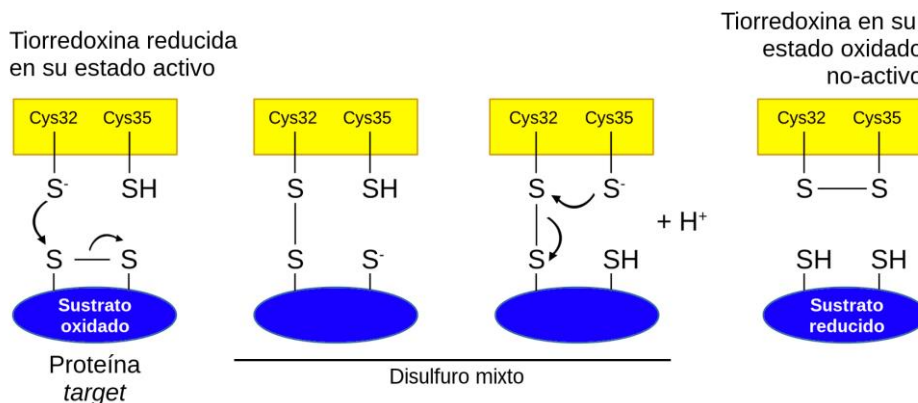


Fig. 4: Mecanismo de reducción de sustratos por TRX. La reacción involucra la reducción de un enlace R-S-S-R de una proteína *target* de TRX, llevando en última instancia a la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas catalíticas Cys32 y Cys35. *Adaptado de Vazquez et al. 2015.*

En *EcTRX*, la secuencia –Cys₃₂GPCys₃₅– responsable de la actividad óxido-reductasa se localiza en la base de la hélice α H2 con Cys32 expuesta al solvente y con un carácter altamente reactivo. Por

su parte, Cys35, actuando como cisteína resolutive, se encuentra ocluida del solvente y rodeada de una serie de residuos altamente conservados en secuencia de los cuales se

presume participan de la actividad catalítica. La reacción entre TRX y su sustrato comienza cuando Cys32, que exhibe un bajo pK_a que oscila entre 6.7–7.4 unidades, desencadena un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de azufre del enlace disulfuro de la proteína *target*. La forma reactiva desprotonada de Cys32 (tiolato, $R-S^-$) da lugar a la formación de un enlace disulfuro mixto (donde uno de los azufres pertenece a la TRX y el otro a la proteína *target*) que es atacado posteriormente por la Cys35 que actúa como cisteína resolutive, cuyo valor de pK_a es estimado entre 8.0-9.0 unidades, la cual se cree contribuye a la estabilización de la forma desprotonada de Cys32. Es interesante destacar que como Cys35 debe encontrarse en forma desprotonada para resolver el disulfuro mixto, es necesario que se produzca una alteración transitoria clave en su entorno químico que disminuya su pK_a y de lugar a los pasos finales de la reacción. Para ello se ha especulado que el residuo Asp26, completamente conservado en secuencia⁴⁵ y ocluido del solvente tanto en TRXs procariotas^{40,46} como eucariotas⁴⁷, juega un rol clave en la desprotonación de Cys35, hecho que es soportado por el alto valor de pK_a del aspartato de 7.3-7.5 obtenido independientemente mediante espectroscopía Raman⁴⁸, RMN⁴⁹ y cálculos computacionales⁵⁰, que dan cuenta que el grupo carboxilato está correctamente posicionado para la desprotonación de la Cys35. En este sentido, se han analizado las mutaciones puntuales de *EcTRX* D26N y D26L, las cuales muestran similitudes estructurales con la variante silvestre.

La estabilidad termodinámica de *EcTRX* se encuentra vinculada al cambio en el estado de protonación del Asp26^{51,52} y su sustitución por alanina aumenta significativamente la estabilidad de la variante con respecto a la proteína silvestre⁵¹. Es importante destacar que la estructura, la carga superficial y la hidrofobicidad del sitio activo no se ve alterada en las mutantes, ya que la actividad de la ADN polimerasa del fago T7 en el complejo – donde la TRX funciona como proteína conectora sin involucrar la actividad redox y es esencial para la procesividad de la

polimerasa⁵³ – con las mutantes de *EcTRX* muestran valores de afinidad similares entre ellos y con la proteína silvestre⁵⁴. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la presencia de un aspartato ocluido del solvente en la vecindad del sitio activo de la TRX es necesaria principalmente para la función biológica implicada en reacciones redox más que para el correcto plegado o la estabilidad termodinámica. Sin embargo, Vohník y colaboradores⁵⁵ determinaron mediante espectroscopía Raman que tanto la variante silvestre como la mutante D26A muestran patrones similares en la conformación de las cadenas laterales de Cys32 y Cys35 y en las interacciones que estas establecen por lo que quedaría descartado que el bajo valor de pK_a de ambas cisteínas se deba a una interacción tipo puente de hidrógeno. Más aún, las bandas Raman de los triptófanos Trp28 y Trp31 localizados muy cerca del sitio activo, responden a cambios en el pH en experimentos de titulación ácido-base, lo que implicaría que existen sutiles cambios conformacionales en el sitio activo que harían que Asp26 juegue un rol preponderantemente conformacional⁵⁵. Además, se investigó el rol de otro aminoácido conservado y ocluido de la TRX y cercano espacialmente a Asp26: la lisina 57. Para ello se estudió la variante K57M la cual posee un residuo de metionina cuyo tamaño de cadena lateral es similar a la lisina pero sin la carga del grupo $N\epsilon$. Al contrario que el Asp26, Lys57 se encuentra conservada únicamente en secuencias procariotas y en algunas proteínas de mamíferos con plegado tipo TRX como la disulfuro isomerasa⁵⁶. En principio, es esperable un valor modificado del pK_a , respecto a los valores estándar de los aminoácidos aislados en solución, tanto para el Asp26 como para la Lys57 por el hecho de hallarse ocluidos del solvente acuoso^{57,58}. La presencia de Lys57 disminuye significativamente el pK_a del Asp26 en la proteína silvestre como pudo observarse en la mutante K57M donde el valor de pK_a disminuye de 9 a 7.5 unidades, lo cual refuerza la idea que ambos residuos en el núcleo de la *EcTRX* actúan en conjunto mejorando las velocidades de intercambio tiol/disulfuro a pH

neutro, hecho que se ve reflejado en la casi nula actividad redox de la doble mutante D26A/K57M⁵⁴.

Otro aspecto interesante de las TRXs es su promiscuidad funcional, es decir su capacidad de ejercer una función secundaria⁵⁹. Las tres actividades redox básicas asociadas en general con el plegado TRX son: I) la reducción (actividad primaria), II) la oxidación y III) la isomerización (reorganización) de puentes disulfuro de proteínas *target*. Las actividades II) y III) están relacionadas con los procesos de plegado oxidativo proteico *in vivo* y recuperación de proteínas con puentes disulfuro formados incorrectamente los cuales, en el periplasma de las bacterias, son llevadas a cabo por la DsbA y DsbC, respectivamente. En el retículo endoplásmico de células eucariotas, estos procesos son catalizados por la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las PDIs son proteínas multidominio que contienen por lo menos un subdominios TRX, aunque pueden variar en longitud respecto a las típicas TRXs bacterianas⁶⁰ y las reacciones de reducción de disulfuros *in vivo* son comúnmente catalizados por un monodominio, que también suelen mostrar niveles basales de actividades promiscuas. En este escenario, es tentador especular que los bajos niveles de estas actividades secundarias o promiscuas ya se encontraban presentes en las primeras TRXs ancestrales y que, en algún punto de la historia evolutiva, divergieron para el surgimiento de nuevas funciones implicadas en la actividad óxido-reductasa reversible y también otras funciones que no implican la actividad redox.

Mediante un análisis bioinformático de optimización multi-objeto de Pareto⁶¹, se postuló una nueva posible actividad promiscua de las TRXs. Utilizando la actividad catalítica y la “*plegabilidad*” (medida como la estabilidad termodinámica en equilibrio en experimentos clásicos de desplegamiento inducido por caótrofos) se determinó que una triple mutante (W28K/A39H/K57E) de residuos cercanos espacialmente al sitio activo le otorga actividad hidrolasa de enlaces éster⁶². Sorprendentemente, esta mutante no solo mostró

actividad esterasa sino que además no mermó su actividad primaria⁶². Estos aspectos hacen de la TRX de *E. coli* un excelente modelo en ingeniería proteica y optimización y montaje de nuevas actividades catalíticas con potencial uso biotecnológico.

EL EXTREMO OXIDANTE DE LA VÍA TRX: LAS PEROXIRREDOXINAS COMO EJEMPLO DE PROTEÍNAS TARGET

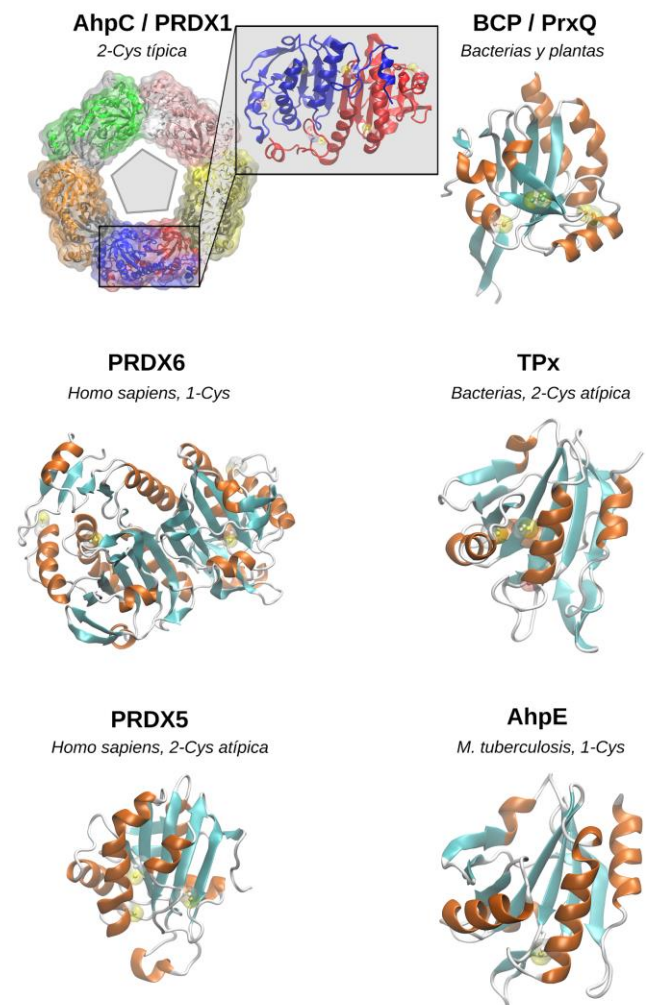


Fig. 5: Topología de proteínas representativas de las subfamilias de las peroxirredoxinas según la base de datos PREX (<http://csb.wfu.edu/prex/>).

Como se mencionó anteriormente, las células están dotadas de numerosos sistemas proteicos y no proteicos para controlar las ROS, entre las que se encuentra una importante familia de proteínas

denominadas peroxirredoxinas (PRDXs). Las PRDXs pertenecen a la superfamilia TRX y está compuesta por seis subfamilias⁶³: AhpC, BCP/PRXQ, PRXD6, TPx, PRDX5 y AhpE (Figura 5).

Las PRDXs son responsables de la reducción de más del 90% del H₂O₂ producido por las células durante la respiración celular^{64,65}. Las PRDXs son enzimas dependientes de cisteína y reducen tanto H₂O₂ como alquil hidropéroxidos a través de una cisteína reactiva y completamente conservada en secuencia denominada cisteína peroxidática (C_P), la cual se encuentra además en un contexto espacial (estructura terciaria) altamente conservado en todas las subfamilias de las PRDXs y definido por los residuos Pro, Thr y Arg⁶⁶. Las PRDXs se clasifican en 1-Cys o 2-Cys basado en la ausencia o presencia de una segunda cisteína catalítica denominada cisteína resolutive (C_R) la cual forma un puente disulfuro con C_P. La posición de C_R en la secuencia primaria de las 2-Cys las divide además en PRDXs típicas y atípicas dependiendo si esta se encuentra en una cadena polipeptídica adyacente o en la misma cadena, respectivamente.

El mecanismo catalítico de reducción de peróxidos de las 1-Cys y PRDX 2-Cys es común en el primer paso de la reacción (Figura 6) el cual implica el ataque nucleofílico de la cisteína C_P al sustrato para formar un intermediario reactivo ácido sulfénico, (Cys-SOH) liberando una molécula de agua en el caso que el sustrato sea H₂O₂ o el correspondiente alcohol derivado si el sustrato es un hidropéroxido orgánico. La resolución del intermediario Cys-SOH distingue a las 1-Cys de las 2-Cys típicas y atípicas.

En las PRDXs 1-Cys, la resolución depende de otra proteína o de una molécula de bajo peso molecular como el GSH y el ácido ascórbico⁶⁷ - los cuales están presentes en altas concentraciones en el interior celular - para reducir a C_P de ácido sulfénico a tiol. Por su parte, en las PRDXs 2-Cys, la resolución de la Cys-SOH es llevada a cabo por el ataque de la cisteína resolutive C_R localizada en la misma subunidad polipeptídica que C_P. En el caso

de las 2-Cys atípicas, C_R reacciona con C_P-SOH para condensar un enlace disulfuro estable (R-C_P-S-S-C_R-R). Esta reacción depende de un evento de desplegamiento local de las hélices αH2 y αH3 denominado comúnmente como completamente plegado a localmente desplegado (FF→LU, de *fully folded to locally unfolded transition*) clave para la restitución de la enzima funcional (Figuras 6 y 7). Dado que en las 2-Cys típicas, C_R se encuentra localizada en la hélice C-terminal de la subunidad adyacente a C_P y no en la misma cadena polipeptídica, la formación del puente disulfuro R-C_P-S-S-C_R-R es intermolecular y estabiliza el homodímero. Finalmente, el puente disulfuro es reducido usualmente por una TRX a través de una reacción típica de intercambio tiol-disulfuro (ver Figura 4). El evento FF→LU, si bien varía entre las diferentes subfamilias implicando diferentes segmentos de estructura secundaria, es universal en la familia PRDX. A modo de ejemplo profundizaremos en el análisis estructural y funcional de la subfamilia TPx de *E. coli*, una PRDX 2-Cys atípica.

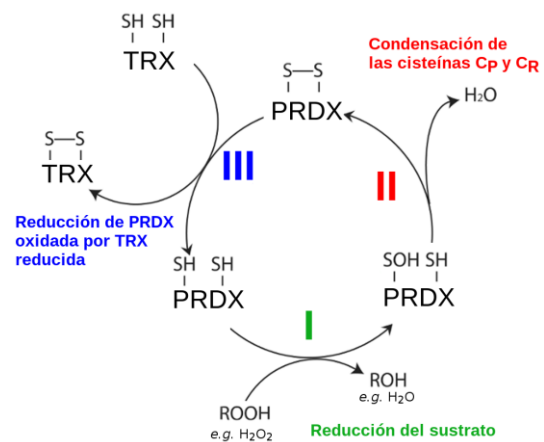


Fig. 6: Esquema de ciclo catalítico de reducción de grupos peróxidos (ROOH) de una PRDX 2-Cys la cual consta de tres pasos: I) oxidación de C_P a ácido sulfénico (Cys-SOH), II) cambio conformacional y condensación del puente disulfuro entre C_P y C_R y III) reducción del puente disulfuro por una TRX para devolverla a su estado reducido funcional.

Los miembros de esta subfamilia, originalmente denominadas p20^{68,69}, pertenecen casi exclusivamente a las 2-Cys atípicas bacterianas y son una de las subfamilias filogenéticamente menos diversas. Desde el punto de vista

estructural, la TPx de *E. coli* (*EcTPx*) es una proteína relativamente pequeña de 167 residuos (~17 kDa), que comparte el prototipo plegado TRX caracterizada por un núcleo central β de siete hebras rodeadas por cuatro hélices α (Figuras 5 y 7), con la cisteína C_P situada en la base de la hélice $\alpha H2$ mientras que la cisteína C_R en el centro de la hélice $\alpha H3$. La larga cadena N-terminal se pliega en una hebra β haciendo que la estructura general sea compacta y globular. En su estado reducido biológicamente activo, las cisteínas C_P y C_R se encuentran a una distancia de 12 Å entre los átomos de azufre S^γ . En este escenario, la reacción de condensación del puente disulfuro implica una transición conformacional obligada, donde el estado plegado reactivo debe sufrir un desplegamiento local para acercar ambas cisteínas y permitir la formación del puente disulfuro. En la *EcTPx*, el evento FF→LU, implica un desplegamiento local de la región C-terminal de la hélice $\alpha H3$, un cambio en la accesibilidad al solvente y de rotámeros φ/ψ de C_P acompañado por un desplegamiento local en la región N-terminal de la $\alpha H2$ y del *loop* precedente que la conecta con la hebra $\beta 5$.

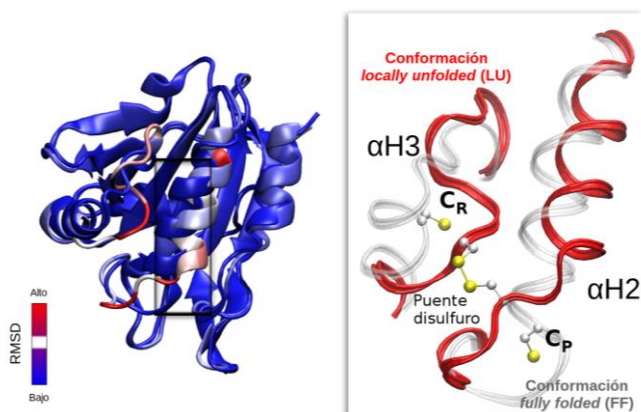


Fig. 7: Cambios conformacionales acoplados a la transición FF→LU en la *EcTPx*. A la izquierda se muestra la superposición de los subestados reducido (FF) y oxidado (LU) coloreado por el RMSD. Obsérvese que para la mayoría de los residuos el desplazamiento de la cadena principal es bajo (RMSD bajo, azul) mientras la zona de mayor movilidad (RMSD alto, rojo) se localiza entre las hélices $\alpha H2$ y $\alpha H3$. A la derecha se muestra más en detalle la región implicada en la transición conformacional. El cálculo del RMSD fue realizado en VMD 1.9.2⁷⁰.

Algunas PRDXs 2-Cys atípicas poseen además una tercer cisteína totalmente ocluida del solvente localizada en la lámina β del núcleo de la proteína. Se ha demostrado experimentalmente que la variante C81S es ligeramente menos activa⁷¹ por lo que no se la considera una cisteína redox esencial para la actividad peroxidasa⁷². Los parámetros cinéticos para la reducción de H_2O_2 y varios alquil hidroperóxidos han sido bien establecidos experimentalmente⁷¹. La K_M varía casi tres órdenes de magnitud entre el hidroperóxido de cumeno y el H_2O_2 . Sin embargo la eficiencia catalítica k_{cat} , dentro del error experimental, se mantiene inalterada, sugiriendo que la eficiencia global de reducción depende de diversos factores, entre ellos:

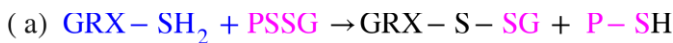
- I) La afinidad y la reacción química de C_P a sustratos de diferente topología y naturaleza química.
- II) El reordenamientos conformacionales para alcanzar la transición FF→LU.
- III) La formación del puente disulfuro intrahelicoidal y
- IV) La reducción de la forma oxidada de *EcTPx* retornar a su forma reducida funcionalmente activa.

LAS GLUTAREDOXINAS: MUCHO MÁS QUE UN SISTEMA *BACKUP* DE LAS TIORREDOXINAS

Las glutaredoxinas (GRXs), el otro miembro de suma importancia en la familia de las TRXs, son proteínas con actividad redox y dependientes de GSH como agente reductor para ejercer su actividad reductora^{73,74}. Las GRXs fueron descubiertas a mediados de los años '70s en variantes modificadas de *E. coli* carentes de TRXs que, de todas maneras, eran capaces de donar electrones a la ribonucleótido reductasa⁷⁵. A la fecha, con más de 1770 artículos en *PubMed* – de los cuales más de 580 fueron publicados en los últimos cinco años – con la palabra clave “*glutaredoxin*”, las GRXs son hoy en día un sistema de intensos estudios dada su implicancia en numerosas vías de señalización y regulación celular^{76–79} y procesos fisiológicos^{80–82}.

Originalmente, las GRXs fueron clasificadas según el orden cronológico en su descubrimiento (Grx1, Grx2, etc.). Dado que esta clasificación no refleja ninguna propiedad biofísicoquímica, hoy en día se las clasifica en base a la secuencia aminoacídica de su sitio activo como: mono- (Cys-Gly-Phe-Ser) y ditiolicas (Cys-Gly-Phe-Cys). De manera similar al mecanismo de reducción de las TRXs, las GRXs ditiolicas requieren de ambas cisteínas para reducir un puente disulfuro de la proteína *target*. Pero a diferencia de las TRXs, el puente disulfuro intramolecular de las GRXs es reducido por una molécula de GSH para dar un intermediario GRX-S-SG el cual es posteriormente reducida por la acción de la glutatión reductasa (GR) con electrones provenientes del NADPH⁸³. Una de las características más sobresalientes de las GRXs es su capacidad de unir y utilizar GSH como sustrato. A diferencia de las TRXs, las GRXs tienen una alta afinidad por los disulfuros mixtos.

Mecanismo de las GRXs monotolicas



Mecanismo de las GRXs ditiolicas

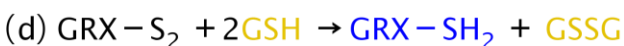
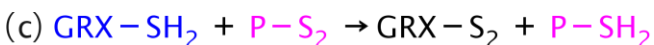


Fig. 8: Mecanismo catalítico de las GRXs mono- y ditiolicas. PSSG es un disulfuro mixto entre una proteína P y el GSH y GSSG son dos GSH unidos por un puente disulfuro.

El sistema GRX ditiolico es capaz de reducir de manera eficiente algunos disulfuros de proteínas como el de la RNR de *E. coli* con un mecanismo catalítico similar al descrito anteriormente para las TRXs (ver Figuras 4 y 8-cd). Sin embargo, la principal acción de las GRXs parecería ser la de reducir disulfuros mixtos entre una proteína *target* y el GSH – en un proceso de desglutathionilación^{84,85} – utilizando un mecanismo de una cisteína⁸⁶ (Figura 8-ab). Con más de 120 estructuras depositadas en la RCSB *Protein Data Bank*⁸⁷, las GRXs han sido intensamente estudiadas a nivel estructural tanto por cristalografía de rayos X como por RMN y comparten el prototípico plegado

TRX⁸⁸. Tanto en las GRXs monotolicas como ditiolicas, el motivo CxxC/S se localiza en la base de la hélice αH2 (en referencia a la estructura prototípica de las TRXs, Figura 9) con la cisteína N-terminal expuesta al solvente y exhibiendo un bajo valor de pK_a y la cisteína resolutive (en las ditiolicas) ocluida y con un alto valor de pK_a.

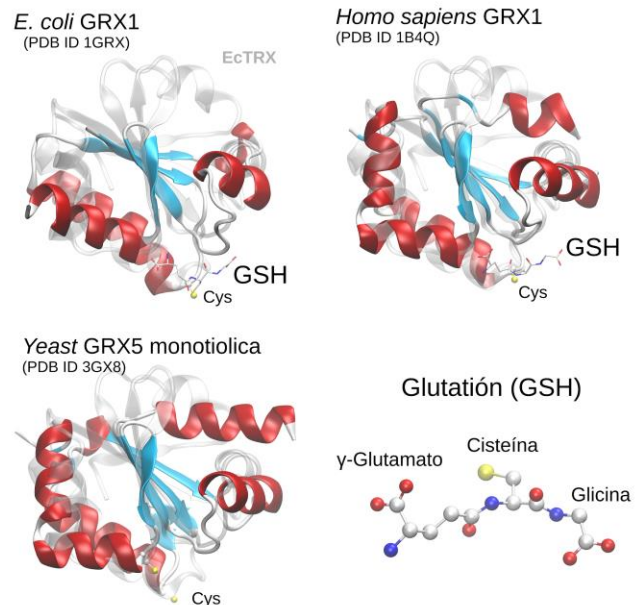


Fig. 9: Topología estructural de diferentes GRXs. Estructuras tridimensionales de la GRX1 de *E. coli* (PDB ID 1GRX) y humana (PDB ID 1B4Q) en complejo con GSH (representado en licorice) y la GRX5 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID 3GX8) como ejemplo de una GRX monotolica. En todos los casos en gris se muestra superpuesta la estructura de la TRX de *E. coli* (PDB ID 2TRX cadena A) como ejemplo del plegado TRX. Además se muestra la composición aminoacídica del glutatión (abajo) con su inusual enlace y entre el grupo carboxilo del glutamato y el grupo amino de la cisteína.

CONCLUSIONES

Desde finales de los ‘60s, la investigación en biofísica de proteínas, basada principalmente en la TRX de *E. coli*, ha sentado los cimientos fundamentales en la comprensión de la relación estructura-función proteica. Desde entonces y hasta el día de hoy, la vasta cantidad de conocimiento estructural y funcional recabado sobre las proteínas constituyentes de los sistemas TRX/GRX, no es suficiente para comprender cabalmente cómo los módulos interaccionan entre sí, cuán plástico es el sistema desde el punto de vista de la variedad de sustratos proteicos

admisibles en cada una de las reacciones (ver Figura 1) o qué propiedades asociadas a la interacción entre componentes – cambios estructurales y/o estabilización de subestados conformacionales, e.g. PRDXs – modulan la reactividad y el flujo de electrones de la vía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero. DSV es becario postdoctoral de la ANPCyT.

REFERENCIAS

- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136–147
- Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M.C., Alvarez, B., Radi, R., Boveris, A., Cadenas, E. & Poderoso, J.J. (2000). Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage. *Biochem. J* **349**, 35–42
- Gomberg, M. (1900). An Instance of Trivalent Carbon: Triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.* **22**, 757–771
- Paneth, F.A., Hofeditz, W. & Wunsch, A. (1935). 82. Free organic radicals in the gaseous state. Part V. The reaction products of free methyl in hydrogen and helium. *J. Chem. Soc.* 372
- Rozantsev, E.G. & Loshadkin, D.V. (2001). The history and modern problems of free radical chemistry. 100 years of free radical chemistry. *Des. Monomers Polym.* **4**, 281–300
- Karogodina, T.Y., Sergeeva, S.V. & Stass, D.V. (2011). Stability and reactivity of free radicals: a physicochemical perspective with biological implications. *Hemoglobin* **35**, 262–275
- Valdez, L.B., Lores Arnaiz, S., Bustamante, J., Alvarez, S., Costa, L.E. & Boveris, A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biol. Res.* **33**, 65–70
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P. & Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1245049
- Dickinson, B.C. & Chang, C.J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504–511
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X. & Choi, A.M.K. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 49–89
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. & Lleonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376–390
- Prasad, S., Gupta, S.C., Pandey, M.K., Tyagi, A.K. & Deb, L. (2016). Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 5010423
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. & Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74
- Giacco, F. & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**, 1058–1070
- Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* **24**, 547–553
- Forman, H.J. (2008). Hydrogen Peroxide: The Good, The Bad, and The Ugly. *Oxidants in Biology: A Question of Balance* 1–17
- Bachhawat, A.K. & Kaur, A. (2017). Glutathione Degradation. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 1200–1216
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3143–3153
- Vazquez, D.S., Delfino, J.M. & Santos, J. (2015). Thioredoxin from *Escherichia coli* as a Role Model of Molecular Recognition, Folding, Dynamics and Function. *Protein Pept. Lett.* **22**, 801–815
- Couto, N., Wood, J. & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 27–42
- Arnér, E.S. & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K. & Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110–6117
- Arnér, E.S.J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 495–526
- Zhong, L. & Holmgren, A. (2000). Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations. *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128
- Perez-Jimenez, R., Inglés-Prieto, A., Zhao, Z.-M.,

- Sanchez-Romero, I., Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Garcia-Manyes, S., Kappock, T.J., Tanokura, M., Holmgren, A., Sanchez-Ruiz, J.M., Gaucher, E.A. & Fernandez, J.M. (2011). Single-molecule paleoenzymology probes the chemistry of resurrected enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 592–596
27. Nisbet, E.G. & Sleep, N.H. (2001). The habitat and nature of early life. *Nature* **409**, 1083–1091
28. Ingles-Prieto, A., Ibarra-Molero, B., Delgado-Delgado, A., Perez-Jimenez, R., Fernandez, J.M., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M. & Gavira, J.A. (2013). Conservation of protein structure over four billion years. *Structure* **21**, 1690–1697
29. Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J. & Spyrou, G. (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 30841–30847
30. Vazquez, D.S., Sánchez, I.E., Garrote, A., Sica, M.P. & Santos, J. (2015). The *E. coli* thioredoxin folding mechanism: the key role of the C-terminal helix. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 127–137
31. Collet, J.-F. & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1205–1216
32. Georgescu, R.E., Li, J.H., Goldberg, M.E., Tasayco, M.L. & Chaffotte, A.F. (1998). Proline isomerization-independent accumulation of an early intermediate and heterogeneity of the folding pathways of a mixed alpha/beta protein, *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **37**, 10286–10297
33. Godoy-Ruiz, R., Ariza, F., Rodriguez-Larrea, D., Perez-Jimenez, R., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J.M. (2006). Natural Selection for Kinetic Stability Is a Likely Origin of Correlations between Mutational Effects on Protein Energetics and Frequencies of Amino Acid Occurrences in Sequence Alignments. *J. Mol. Biol.* **362**, 966–978
34. Hamid Wani, A. & Udgaonkar, J.B. (2006). HX-ESI-MS and Optical Studies of the Unfolding of Thioredoxin Indicate Stabilization of a Partially Unfolded, Aggregation-Competent Intermediate at Low pH. *Biochemistry* **45**, 11226–11238
35. Santos, J., Marino-Buslje, C., Kleinman, C., Ermácora, M.R. & Delfino, J.M. (2007). Consolidation of the Thioredoxin Fold by Peptide Recognition: Interaction between *E. coli* Thioredoxin Fragments 1–93 and 94–108. *Biochemistry* **46**, 5148–5159
36. Santos, J., Sica, M.P., Buslje, C.M., Garrote, A.M., Ermácora, M.R. & Delfino, J.M. (2009). Structural Selection of a Native Fold by Peptide Recognition. Insights into the Thioredoxin Folding Mechanism. *Biochemistry* **48**, 595–607
37. Lento, C., Ferraro, M., Wilson, D. & Audette, G.F. (2016). HDX-MS and deletion analysis of the type 4 secretion system protein TraF from the *Escherichia coli* F plasmid. *FEBS Lett.* **590**, 376–386
38. Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* **6**, 475–484
39. Holmgren, A., Söderberg, B.O., Eklund, H. & Brändén, C.I. (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2305–2309
40. Katti, S.K., LeMaster, D.M. & Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 167–184
41. Dyson, H.J., Jane Dyson, H., Gippert, G.P., Case, D.A., Holmgren, A. & Wright, P.E. (1990). Three-dimensional solution structure of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 4129–4136
42. Dyson, H.J., Holmgren, A. & Wright, P.E. (1989). Assignment of the proton NMR spectrum of reduced and oxidized thioredoxin: sequence-specific assignments, secondary structure, and global fold. *Biochemistry* **28**, 7074–7087
43. Kemple, M.D., Yuan, P., Nollet, K.E., Fuchs, J.A., Silva, N. & Prendergast, F.G. (1994). ¹³C NMR and fluorescence analysis of tryptophan dynamics in wild-type and two single-Trp variants of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biophys. J.* **66**, 2111–2126
44. Perez-Jimenez, R., Li, J., Kosuri, P., Sanchez-Romero, I., Wiita, A.P., Rodriguez-Larrea, D., Chueca, A., Holmgren, A., Miranda-Vizuete, A., Becker, K., Cho, S.-H., Beckwith, J., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M., Berne, B.J. & Fernandez, J.M. (2009). Diversity of chemical mechanisms in thioredoxin catalysis revealed by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 890–896
45. Eklund, H., Gleason, F.K. & Holmgren, A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**, 13–28
46. Jeng, M.-F., Patricia Campbell, A., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E. & Jane Dyson, H. (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* **2**, 853–868
47. Qin, J., Marius Clore, G. & Gronenborn, A.M. (1994). The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure* **2**, 503–522
48. Li, H., Hanson, C., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Thomas, G.J., Jr (1993). Determination of the pKa values of active-center cysteines, cysteines-32 and -35, in *Escherichia coli* thioredoxin by Raman spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 5800–5808
49. Jeng, M.F. & Dyson, H.J. (1996). Direct measurement of the aspartic acid 26 pKa for reduced *Escherichia*

- coli thioredoxin by ^{13}C NMR. *Biochemistry* **35**, 1–6
50. Dillet, V., Dyson, H.J. & Bashford, D. (1998). Calculations of electrostatic interactions and pKas in the active site of Escherichia coli thioredoxin. *Biochemistry* **37**, 10298–10306
51. Langsetmo, K., Fuchs, J.A. & Woodward, C. (1991). The conserved, buried aspartic acid in oxidized Escherichia coli thioredoxin has a pKa of 7.5. Its titration produces a related shift in global stability. *Biochemistry* **30**, 7603–7609
52. Langsetmo, K., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Sharp, K.A. (1991). Linkage of thioredoxin stability to titration of ionizable groups with perturbed pKa. *Biochemistry* **30**, 7609–7614
53. Lee, S.-J., Tran, N.Q., Lee, J. & Richardson, C.C. (2018). Hydrophobic Residue in Escherichia coli Thioredoxin Critical for the Processivity of T7 DNA Polymerase. *Biochemistry* **57**, 5807–5817
54. Dyson, H.J., Jeng, M.F., Tennant, L.L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D.S., Kuprin, S. & Holmgren, A. (1997). Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in Escherichia coli thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry* **36**, 2622–2636
55. Vohnik, S., Hanson, C., Tuma, R., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Thomas, G.J., Jr (1998). Conformation, stability, and active-site cysteine titrations of Escherichia coli D26A thioredoxin probed by Raman spectroscopy. *Protein Sci.* **7**, 193–200
56. Kemmink, J., Darby, N.J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T.E. (1996). Structure Determination of the N-Terminal Thioredoxin-like Domain of Protein Disulfide Isomerase Using Multidimensional Heteronuclear $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **35**, 7684–7691
57. Isom, D.G., Castañeda, C.A., Cannon, B.R. & García-Moreno, B. (2011). Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5260–5265
58. Harms, M.J., Castañeda, C.A., Schlessman, J.L., Sue, G.R., Isom, D.G., Cannon, B.R. & E., B.G.-M. (2009). The pKa Values of Acidic and Basic Residues Buried at the Same Internal Location in a Protein Are Governed by Different Factors. *J. Mol. Biol.* **389**, 34–47
59. Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., McQ Gould, S., Roodveldt, C. & Tawfik, D.S. (2005). The “evolvability” of promiscuous protein functions. *Nat. Genet.* **37**, 73–76
60. Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D.Y. & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J.* **277**, 3924–3936
61. Zitzler, E., Knowles, J. & Thiele, L. (2008). Multiobjective Optimization. 373–404
62. Suarez, M., Tortosa, P., Garcia-Mira, M.M., Rodríguez-Larrea, D., Godoy-Ruiz, R., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J.M. & Jaramillo, A. (2010). Using multi-objective computational design to extend protein promiscuity. *Biophys. Chem.* **147**, 13–19
63. Soito, L., Williamson, C., Knutson, S.T., Fetrow, J.S., Poole, L.B. & Nelson, K.J. (2011). PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* **39**, D332–7
64. Winterbourn, C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286
65. Cox, A.G., Winterbourn, C.C. & Hampton, M.B. (2009). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J* **425**, 313–325
66. Karplus, P.A. & Hall, A. (2007). Structural survey of the peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* **44**, 41–60
67. Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O. & Netto, L.E.S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4886–4891
68. Cha, M.K., Kim, H.K. & Kim, I.H. (1995). Thioredoxin-linked “thiol peroxidase” from periplasmic space of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **270**, 28635–28641
69. Zhou, Y., Wan, X.Y., Wang, H.L., Yan, Z.Y., Hou, Y.D. & Jin, D.Y. (1997). Bacterial scavengase p20 is structurally and functionally related to peroxiredoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 848–852
70. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38
71. Baker, L.M.S. & Poole, L.B. (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from Escherichia coli. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J. Biol. Chem.* **278**, 9203–9211
72. Cha, M.K., Kim, H.K. & Kim, I.H. (1996). Mutation and Mutagenesis of thiol peroxidase of Escherichia coli and a new type of thiol peroxidase family. *J. Bacteriol.* **178**, 5610–5614
73. Fernandes, A.P. & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 63–74
74. Lillig, C.H., Berndt, C. & Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1304–1317
75. Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2275–2279

76. Takashima, Y., Hirota, K., Nakamura, H., Nakamura, T., Akiyama, K., Cheng, F.S., Maeda, M. & Yodoi, J. (1999). Differential expression of glutaredoxin and thioredoxin during monocytic differentiation. *Immunol. Lett.* **68**, 397–401
77. Bandyopadhyay, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J. & Gronostajski, R.M. (1998). Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J. Biol. Chem.* **273**, 392–397
78. Nakamura, T., Ohno, T., Hirota, K., Nishiyama, A., Nakamura, H., Wada, H. & Yodoi, J. (1999). Mouse glutaredoxin - cDNA cloning, high level expression in *E. coli* and its possible implication in redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. *Free Radic. Res.* **31**, 357–365
79. Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F.S., Itoh, T., Fukuda, K. & Yodoi, J. (2000). Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 177–182
80. Lillig, C.H., Prior, A., Schwenn, J.D., Åslund, F., Ritz, D., Vlamis-Gardikas, A. & Holmgren, A. (1999). New Thioredoxins and Glutaredoxins as Electron Donors of 3'-Phosphoadenylylsulfate Reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 7695–7698
81. Berndt, C., Lillig, C.H., Wollenberg, M., Bill, E., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Seidler, A. & Schwenn, J.D. (2003). Characterization and Reconstitution of a 4Fe-4S Adenylyl Sulfate/Phosphoadenylyl Sulfate Reductase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 7850–7855
82. Wells, W.W., Xu, D.P., Yang, Y.F. & Rocque, P.A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 15361–15364.
83. Johansson, C., Holmgren, A., Berndt, C., Lönn, M.E., Hudemann, C. & Lillig, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375
84. Bushweller, J.H., Aaslund, F., Wuethrich, K. & Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14.fwdarw.S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**, 9288–9293
85. Holmgren, A. & Åslund, F. (1995). [29] Glutaredoxin. *Methods in Enzymology* 283–292
86. Berndt, C., Lillig, C.H. & Holmgren, A. (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1227–36
87. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242
88. Martin, J.L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250