



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE

INDIRIZZO: BIOCHIMICA E BIOFISICA

CICLO XXI

“Studio di una glutation perossidasi del reticolo endoplasmatico”

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d’indirizzo: Ch.ma Prof.ssa Maria Catia Sorgato

Supervisore :Ch.mo Prof. Fulvio Ursini

Dottorando : Silvia Quartesan

“A mio marito Andrea e ai miei figli Vittoria, Beatrice e Giovanni”

Riassunto

Le cellule vanno continuamente incontro a 'stress ossidativo' indotto da radicali liberi. Questi possono essere generati in diversi modi, ad esempio da elettroni che sfuggono alla catena respiratoria mitocondriale, dall'attività delle NADPH ossidasi o dalle ossido nitrico sintasi e dalla autossidazione di flavoenzimi. Tuttavia, i radicali superossido ($\cdot\text{O}_2^-$) e ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$) non appaiono così distruttivi per i tessuti. L'abbondanza di superossido dismutasi (SOD) assicura che l' $\cdot\text{O}_2^-$ sia immediatamente dismutato a O_2 e H_2O_2 , una sostanza apparentemente meno pericolosa. Ciò non toglie che, in condizioni patologiche, l' H_2O_2 possa essere usata per produrre acido ipocloroso (HOCl) e altri composti reattivi dalle eme perossidasi dei leucociti, oppure per produrre il radicale idrossile ($\text{OH}\cdot$) attraverso la reazione di Fenton. Allo stesso modo, in queste condizioni, il perossinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), prodotto di reazione tra $\text{NO}\cdot$ e $\cdot\text{O}_2^-$, si trasforma in specie più tossiche. È interessante notare il fatto che non sia stato mai trovato enzima capace di detossificare $\text{OH}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ossigeno singoletto, oppure HOCl . Evidentemente, la natura è stata saggia abbastanza da non impegnarsi in uno sforzo impossibile, per la difficoltà di competere con l'altissima reattività di queste specie su bersagli biologici, limitata solo dalla diffusione. Tuttavia le cellule devono costantemente affrontare 'stress ossidativo' e pertanto l'autoprotezione è obbligatoria. Questa è perseguita prevenendo la formazione di radicali dagli idroperossidi (R-OOH) e dal perossinitrito. Ciò è particolarmente rilevante alla luce del fatto che queste sostanze stanno emergendo come mediatori di diverse risposte fisiologiche quali la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare. Gli enzimi dei mammiferi implicati nella detossificazione degli R-OOH e $\text{ONOO}\cdot$ appartengono a due distinte famiglie di proteine, le glutatione perossidasi (GPxs) e le peroxiredossine (Prx). Entrambi agiscono sull' H_2O_2 o sul $\text{ONOO}\cdot$ - anche se, generalmente il $\text{ONOO}\cdot$ è ritenuto substrato migliore per le Prx rispetto alle GPxs - e, inoltre, su un ampio spettro di idroperossidi alchilici comprendenti i prodotti della lipossigenasi.

Le GPxs sono ampiamente distribuite in natura, dai batteri all'uomo. Utilizzano sia selenio che zolfo nel centro catalitico ossidoriduttivo, che viene ossidato dall' R-OOH , formando così un intermedio ossidato che viene rigenerato da un agente riducente. Questo non è sempre glutatione (GSH), come il nome di questa famiglia di enzimi potrebbe suggerire. Il centro redox delle GPxs è notevolmente conservato in tutta la famiglia ed è costituito da una tetraide catalitica composta da Sec o Cys, Gln, Trp e Asn. Quando contiene selenio, come tipicamente nelle GPx dei mammiferi - le 'SecGPxs'-, l'intermedio ossidato, formatosi dalla reazione del centro catalitico con l' R-OOH , probabilmente il selenolo ($\text{SeO}\cdot$), viene ridotto dal GSH, il quale forma un intermedio selenodisolfuro che viene poi ridotto da una seconda molecola di GSH, con produzione di GSSG ed enzima ridotto. Quando invece contiene zolfo, come tipicamente nelle GPxs dei non-vertebrati e nelle piante (CysGPxs), il substrato riducente è una preferenzialmente la tioredossina (Trx) o una 'redossina' della famiglia delle Trxs, e l'intermedio ossidato dell'enzima è un disolfuro intracatena. Per questo è necessario, oltre alla 'Cys perossidasi' (C_P), un secondo residuo di Cys la 'Cys resolving' (C_R). L'attuale, unica SecGPx monomerica nei vertebrati - la GPx4-

non presenta il residuo C_R, è ridotta dal GSH e ovviamente non forma un intermedio selenodisulfuro intracatena.

Il 'meccanismo canonico' delle GPxs, che implica quindi una C_R quando il centro redox è una C_P invece di una Sec perossidasi (U_P) e quindi l'uso di preferenziale di Trx o altre 'redossine' come substrato riducente, è stato rimesso in discussione dalla scoperta, nei mammiferi, di due nuove GPx, la GPx7 e la GPx8. Queste sono due GPx monomeriche del reticolo endoplasmatico (ER), contenenti una C_P, senza un residuo di Cys nello 'stretch' di aminoacidi dove si trova la C_R delle altre CysGPx dei non-vertebrati e delle piante.

In questa tesi, abbiamo caratterizzato la GPx7, come prototipo di queste insolite '1CysGPx'. Anche se a bassi livelli, la GPx7 è ampiamente distribuita nei tessuti. Il peptide segnale presente all'estremità NH₂-terminale e il motivo C-terminale KREDL sono funzionali per l'ingresso e la ritenzione nell'ER, rispettivamente. Gli studi cinetici sulla GPx7 sono stati effettuati su idroperossidi fosfolipidi (PL-OOH), il substrato più appropriato per le GPxs monomeriche, utilizzando enzima espresso in *E. coli*, fuso con sinucleina per ottenere alti livelli di espressione. Dalla cinetica in stato stazionario, la costante cinetica per l'ossidazione del sito attivo è risultata piuttosto elevata ($k_{+1}=9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), mentre costante cinetica per la rigenerazione del catalizzatore con GSH notevolmente bassa ($k'_{+2}=12.6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$). Sorprendentemente, il sito attivo ossidato è invece rapidamente ridotto da una 'redossina', la protein disulfide isomerase (PDI) ($k'_{+2}=3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) ma non dalla Trx. L'interazione PDI-GPx7 è stata confermata dalla misura della costante di affinità della GPx7 per la PDI mediante SPR ($K_D=5.2 \mu\text{M}$). Inoltre è stata esclusa, mediante mutagenesi, la eventuale presenza nella GPx7 di un residuo Cys che possa fare la funzione della C_R tipica delle GPxs dei non-vertebrati e delle piante. Quindi, il 'meccanismo canonico' mediante il quale nelle GPxs è richiesta una C_R per essere ridotte da una 'redossina' non si applica alla GPx7 (e probabilmente neanche alla GPx8, che è strutturalmente simile). Questo enzima infatti, accetta elettroni da un 'redossina' come la PDI attraverso un meccanismo che implica la sola C_P. La GPx7 (e la GPx8) si configurano quindi come insolite '1CysGPx' della famiglia delle glutathione perossidasi, poiché sono di fatto rare eccezioni. Infatti, la famiglia delle glutathione perossidasi è per la maggior parte composta da '2CysGPx' dei non-vertebrati e delle piante che sono funzionalmente Trx perossidasi.

Sebbene questi dati sembrerebbero inquadrare la funzione fisiologica della GPx7 nel 'protein folding' che avviene nell'ER, nessuna evidenza è stata da noi ottenuta in questo senso. In cerca di una risposta adattativa alternativa all'unfolded protein response (UPR), abbiamo osservato un aumento di fosforilazione della extracellular signal regulated kinase 1-2 (ERK 1-2) in seguito al silenziamento della GPx7 dopo uno stimolo proliferativo con il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF). Questi dati finalizzano la caratterizzazione enzimatica della GPx7 come un membro 'non-canonico' della famiglia delle GPxs, non suggeriscono un ruolo nello stress del ER, ma indicano invece un ruolo nel cross talk tra lo stato redox del ER e segnali provenienti da fattori di crescita.

Abstract

Cells are continuously facing an oxidative challenge induced by free radicals. These may be generated in different way, i. e. by electron escaping the mitochondrial transport chain, activity of the NADPH oxidase and nitric oxide synthase family of enzymes and autoxidation of favoenzymes. However, the radicals superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and nitric oxide (NO^{\cdot}) do not appear so destructive when produced in tissues. The abundance of superoxide dismutases (SODs) assures that $\text{O}_2^{\cdot-}$ is immediately dismutated to O_2 and the apparently less dangerous H_2O_2 . In pathologic conditions, however, H_2O_2 is used to produce hypochlorous acid (HOCl) and similarly reactive compounds by the heme peroxidases of leukocytes, or the hydroxyl radical (OH^{\cdot}) by Fenton-like chemistry. Similarly, under these conditions, peroxynitrite (ONOO^{\cdot}) -the reaction product between NO^{\cdot} and $\text{O}_2^{\cdot-}$ - is transformed into more toxic species. Interestingly, no enzyme has so far been discovered that could detoxify OH^{\cdot} , RO^{\cdot} , singlet oxygen, or HOCl. Evidently, nature was sage enough not to embark in this effort, due to the difficulty to compete with the diffusion-limited reaction of these species on biological targets. However living cells are continuously facing an oxidative challenge and self-protection appears mandatory. This is essentially achieved by preventing radical formation from hydroperoxides (R-OOH) and ONOO^{\cdot} . Interestingly, this appears particularly relevant on the light of the observation that these species may act as mediators of diverse physiological responses such as cell proliferation, differentiation and migration.

The enzymes involved in mammals to handle R-OOH and ONOO^{\cdot} , belong to two distinct protein families, the glutathione peroxidases (GPxs) and the peroxiredoxins (Prxs). Both act on H_2O_2 and on ONOO^{\cdot} -although ONOO^{\cdot} is generally believed to be a better substrate for Prx than GPxs- and, also, on a wide spectrum of alkyl hydroperoxides comprising the products of lipoxygenases.

GPxs are widely distributed in nature, from bacteria to humans. They use either selenium or sulfur in the redox center that is oxidized by the hydroperoxide, thus forming an oxidized enzyme intermediate, which is regenerated in its reduced form by a reductant. This is not always glutathione (GSH), as the name of the family should suggest. The redox center is remarkably conserved in the whole family and it is made of a catalytic tetrad containing Sec or Cys, Gln, Trp and Asn. When it contains selenium, as it typically occurs in mammalian GPx -the 'SecGPxs'- the oxidized intermediate formed upon reaction of the catalytic moiety with the R-OOH -believed to be a selenol ($\text{SeO}^{\cdot-}$)- is reduced by GSH. In this reaction a selenodisulfide intermediate is formed, that is displaced by a second GSH, yielding GSSG and reduced enzyme. When it contains sulphur, instead, as in the GPxs of non-vertebrates and plants (CysGPxs), the reducing substrate is a Trx or a 'redoxin' of the Trx family, and an intrachain disulphide is the oxidized intermediate of the enzyme. This mechanism requires, besides the 'peroxidatic Cys' (C_P), a second 'resolving Cys' (C_R). The sole monomeric SecGPx of vertebrates -GPx4- does not bear the C_R residue, is active on GSH and, obviously, does not form the intermediate intrachain selenodisulfide.

The 'canonic mechanism' of GPxs, involving a C_R when the redox center is a C_P instead of a 'peroxidatic Sec' (U_P) and the consequent use of Trx or 'redoxins' as the reducing substrate for the intermediate disulphide ($\text{C}_P - \text{C}_R$) has been challenged by the discovery of GPx7 and

GPx8 in mammals. These are two monomeric GPxs of the endoplasmic reticulum (ER), containing a C_P but missing a Cys residue –located within the aminoacid stretch of the alpha 4 helix of the GPx thioredoxin fold- where the C_R residue of non-vertebrate and plants GPxs is found.

Here, GPx7 has been characterized as the prototype of these unusual 1CysGPx.

Although at low levels, GPx7 is widely distributed in tissues. Both, its NH₂-terminal peptide and the C terminal KREDL motif proved to be functional to ER entrance and retention respectively. Kinetic studies on GPx7 have been carried out using phospholipid hydroperoxides, the most appropriate for monomeric GPxs, using the enzyme expressed in *E. coli*, fused with synuclein to overcome an otherwise very poor expression. From steady state kinetics the rate constant for the oxidation of the active site resulted rather high ($k_{+1}=9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), whilst the rate of the regeneration of the catalyst by GSH remarkably low ($k'_{+2}=12.6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$). Unexpectedly, the oxidized active site is instead rapidly reduced by a 'redoxin', protein disulfide isomerase (PDI) ($k'_{+2}=3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), but not by Trx. This evidence was corroborated by the affinity constant for PDI measured by SPR ($K_D= 5.2 \text{ }\mu\text{M}$). Furthermore the presence in GPx7 of a Cys residue replacing the resolving function of the C_R of non-vertebrates and plants GPxs, was ruled out by mutagenesis. Thus, the 'canonical mechanism' by which in GPx a C_R is required for being reduced by a 'redoxin' does not apply to GPx7. This enzyme indeed accepts electrons from a 'redoxin' such as PDI by a mechanism involving the C_P only. GPx7, and the structurally similar GPx8, therefore, represent rare exceptions within the family of glutathione peroxidases, for being 1CysGPx preferentially reduced by a 'redoxin'. In fact the GPxs family is mostly contributed by the non-vertebrates '2CysGPx' that are functionally Trx peroxidases.

Although these data frame the physiological function of GPx7 in the area of oxidative folding of proteins in ER, no evidence was obtained in this respect. Searching for adaptive response to ER stress alternative to the unfolded protein response (UPR), we observed increased phosphorylation of the extracellular signal regulated kinase 1-2 (ERK 1-2) by GPx7 silencing following a proliferative stimulus by the fibroblast growth factor (FGF). These data finalize the enzymatic characterization of GPx7 as a 'non-canonical' member of the GPxs family, do not support the role in ER stress but envisage a role in the cross talk between the redox status of ER and growth factor signaling.

Sommario

RIASSUNTO	I
ABSTRACT	III
INTRODUZIONE	2
1. I RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO	2
1.1. I ROS: STORIA E FISIOLOGIA	3
2. LE GLUTATION PEROSSIDASI	12
2.1. STORIA	12
2.2. CATALISI	15
2.4 STRUTTURA	21
2.5 FUNZIONI FISILOGICHE DELLE GPXS	25
2.6 LE 1 CYSGPX DEI MAMMIFERI	29
SCOPO DELLA TESI	32
BIBLIOGRAFIA	36
DRAFT DEL MANOSCRITTO DA SOTTOMETTERE A PUBBLICAZIONE	42

Introduzione

1. I radicali liberi dell'ossigeno

Durante la respirazione cellulare la molecola di ossigeno (O_2), che funziona da accettore finale degli elettroni estratti ai substrati ossidabili, garantisce una combustione sufficientemente lenta da permettere la conservazione dell'energia. Ciò è riconducibile alla sua particolare configurazione elettronica che impone una restrizione alle reazioni cui partecipa l' O_2 (Figura 1). Questa molecola, infatti, nel suo stato fondamentale ha una peculiare configurazione 'tripletto' in cui due elettroni non appaiati e con lo stesso numero quantico di spin (paralleli) sono situati in un diverso orbitale di anti-legame π^* . Ne deriva che l' O_2 , per ossidare un altro atomo, usualmente di carbonio, accettando una coppia di elettroni, richiede che questo possieda elettroni con spin paralleli opposti. Anche il carbonio quindi dovrebbe essere in forma di 'tripletto'. Il carbonio ha invece una configurazione 'singoletto' con gli spin entrambi paralleli. Per il principio di esclusione di Pauli, quindi, l'interazione diretta O_2 -C è estremamente sfavorita richiedendo energia per l'inversione di spin.

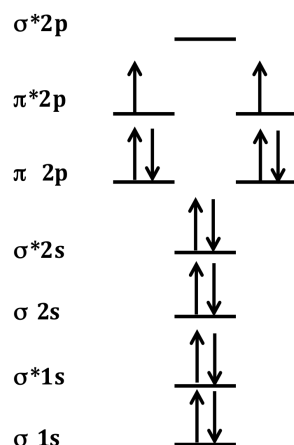


Figura 1 - Struttura elettronica della molecola di Ossigeno secondo la teoria degli orbitali molecolari: nel suo stato fondamentale l'ossigeno molecolare si trova in una configurazione 'tripletta' in cui i due elettroni esterni, siti ciascuno nell' orbitale $2^*\pi$ di antilegame, presentano lo stesso spin. La somministrazione di energia pari a 94.3 kJ/mol determina l'inversione dello spin di uno di questi elettroni ed il passaggio della molecola di O_2 ad uno stato 'singoletto'.

Ne deriva che la reattività dell'O₂ con le specie non radicaliche del carbonio sia lenta, e che la restrizione possa essere aggirata quando l'ossigeno accetta gli elettroni uno alla volta.

Il sito attivo di molti enzimi che usano ossigeno come substrato, come ossigenasi e ossidasi, contiene metalli di transizione proprio perchè la capacità di questi elementi ad accettare e donare singoli elettroni permette di superare la barriera imposta dalla restrizione di spin (Halliwell and Gutteridge, 1984). In tal modo si formano specie reattive dell'ossigeno (ROS), ovvero agenti ossidanti più o meno forti che tendono a raggiungere una configurazione elettronica stabile estraendo elettroni alle altre molecole biologiche (Figura 2). Tra questi troviamo radicali liberi e idroperossidi.

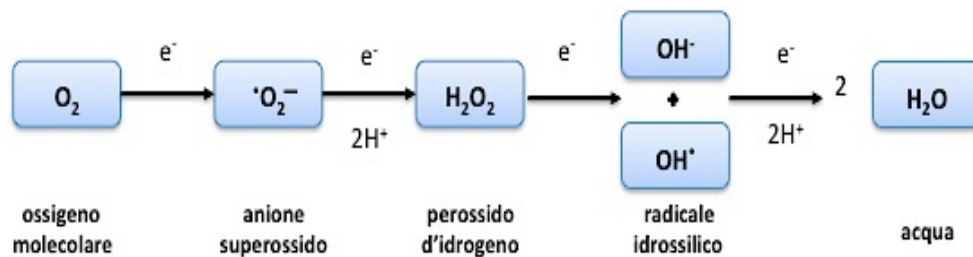


Figura 2 - Schema della riduzione dell'ossigeno molecolare e produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS): La completa riduzione dell'O₂ ad acqua (due molecole H₂O ogni quattro e⁻) avviene attraverso trasferimenti univalenti di elettroni con formazione di superossido ([•]O₂⁻), acqua ossigenata (H₂O₂), radicale idrossilico (OH[•]) e acqua. Questi intermedi sono particolarmente reattivi e per questo comunemente denominati ROS (Reactive Oxygen Species).

1.1. I ROS: storia e fisiologia

Lo studio dei danni da ROS e dei possibili meccanismi di regolazione e protezione si sviluppò dopo il disastro atomico di Hiroshima e Nagasaki, quando divenne ovvio che i danni da radiazioni dipendono in gran parte dai radicali dell'ossigeno generati dalla radiolisi dell'H₂O.

Durante la metà del 1950 l'interesse per il concetto di 'free radical scavenging' nei sistemi biologici venne notevolmente vivificato dagli studi di Rebecca Gershman e Daniel L. Gilbert -secondo cui molti degli effetti

dannosi dell'ossigeno in presenza di radiazioni potevano essere attribuiti a radicali dell'ossigeno (Gerschman et al., 1954)- e di Denham Harman –che sosteneva il ruolo chiave dei radicali nell'invecchiamento (Harman, 1956)-

Venne dimostrato che le radiazioni producono, tra gli altri, idrossil radicale (OH[•]), una specie che deriva anche dalla decomposizione dell'H₂O₂ ad opera del Fe²⁺ nella reazione di Haber e Weiss (Haber and Weiss, 1934). L'OH[•] è il forte ossidante generato dalla reazione di Fenton in cui l'H₂O₂ viene ridotta dal superossido ([•]O₂⁻) (Fenton, 1876) (Figura 3). L'idrossil radicale è una specie che attacca aspecificamente qualsiasi tipo di sostanza, sia essa un tiolo o un alchene, una sostanza aromatica o un composto poli-idrossilico alifatico .

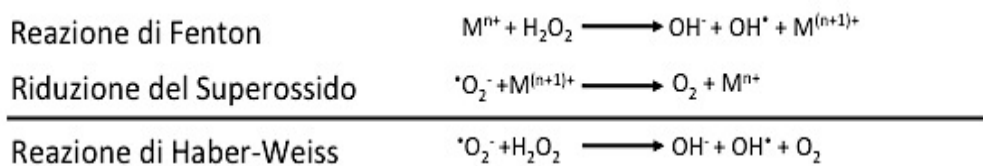


Figura 3 - Reazione di Haber – Weiss: questa reazione prevede la formazione del radicale idrossile (OH[•]) a partire dal perossido d'idrogeno e dall'anione superossido ([•]O₂⁻). Essa è la risultante netta delle reazioni di Fenton e di riduzione di uno ione metallico (ad es. Fe³⁺) ad opera del superossido ([•]O₂⁻). Si tratta di una reazione piuttosto lenta che, nelle cellule, potrebbe essere fonte di stress ossidativo.

Per alcuni decenni la ricerca sui radicali liberi è stata il dominio di patologi e tossicologi. L'interesse si focalizzò soprattutto sulla perossidazione lipidica associata al danno di membrana, sull'alterazione di proteine con relativa perdita di funzione oltre che sui danni al DNA con conseguenti mutazioni, e quindi sulla carcinogenesi.

Già nel 1966 , dopo l'iniziale osservazione che nei globuli rossi variazioni del rapporto GSH/GSSG si riflettevano in cambiamenti nello shunt degli esosi monofosfato (Jacob and Jandl, 1966), la reattività dei tioli con i perossidi era discussa come un possibile meccanismo molecolare di regolazione di eventi metabolici.

La pietra miliare che tracciò la strada verso la comprensione del ruolo radicali liberi in fisiologia fu la scoperta nel 1969 di McCord e Fridovich della superossido dismutasi (SOD). Questo enzima dismuta efficientemente due radicali $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 e O_2 . (McCord and Fridovich, 1969). Si scoprì che le SODs, enzimi che possono contenere Cu, Zn, Mn o Fe, sono distribuite in tutto il regno vivente, dai batteri ai mammiferi (Keele et al., 1970; Yost and Fridovich, 1973). Tuttavia all'epoca, non c'era evidenza della fonte fisiologica che producesse il substrato $\cdot\text{O}_2^-$. Si osservò che poteva essere prodotto dalla reazione della xantina ossidasi, una forma alterata della xantina deidrogenasi che in condizioni native non produce $\cdot\text{O}_2^-$ (McCord and Fridovich, 1968). Fu anche postulato che la reazione di Haber-Weiss, di fatto non fisiologica, potesse produrre questo radicale o come prodotto di processi di auto-ossidazione o nei microsomi durante il metabolismo di certi farmaci (Richter et al., 1977).

Nel 1973 Bernard Babior e collaboratori per primi identificarono un'importante fonte fisiologica di $\cdot\text{O}_2^-$, i granulociti polimorfonucleati (PMN) (Babior et al., 1973). Questi ricercatori ebbero per primi l'idea che la produzione di radicali da parte dei granulociti fosse funzionale alla distruzione dei batteri inglobati, ipotesi che, con minime correzioni, si dimostrò corretta (Babior, 1999). Così, per la prima volta, fu dimostrato che un radicale poteva fare anche qualcosa di utile e, in particolare, che il radicale $\cdot\text{O}_2^-$ era prodotto solo in caso di necessità, concetto che comportava una produzione strettamente regolata (Babior, 1999; Babior et al., 1973). La fonte di $\cdot\text{O}_2^-$ dei PMN risultò essere una NADPH ossidasi (oggi nota come Nox2), un flavoenzima contenente un gruppo eme usualmente dormiente che si attiva dopo aver 'arruolato' alcune proteine regolatorie, fenomeno che a sua volta dipende da una fosforilazione mediata da uno specifico recettore (Babior, 1999). La scoperta fornì le basi molecolari per un fenomeno conosciuto da molto tempo, il 'respiratory burst' che accompagna la fagocitosi (Baldrige and Gerard, 1933). Successivamente, divenne chiaro che la NADPH ossidasi, in azione concertata con SOD e mieloperossidasi (Klebanoff, 1967; Klebanoff, 1974)

produce il cocktail battericida indispensabile per la funzione appropriata dei PMN (Babior, 2004) (Figura 4).

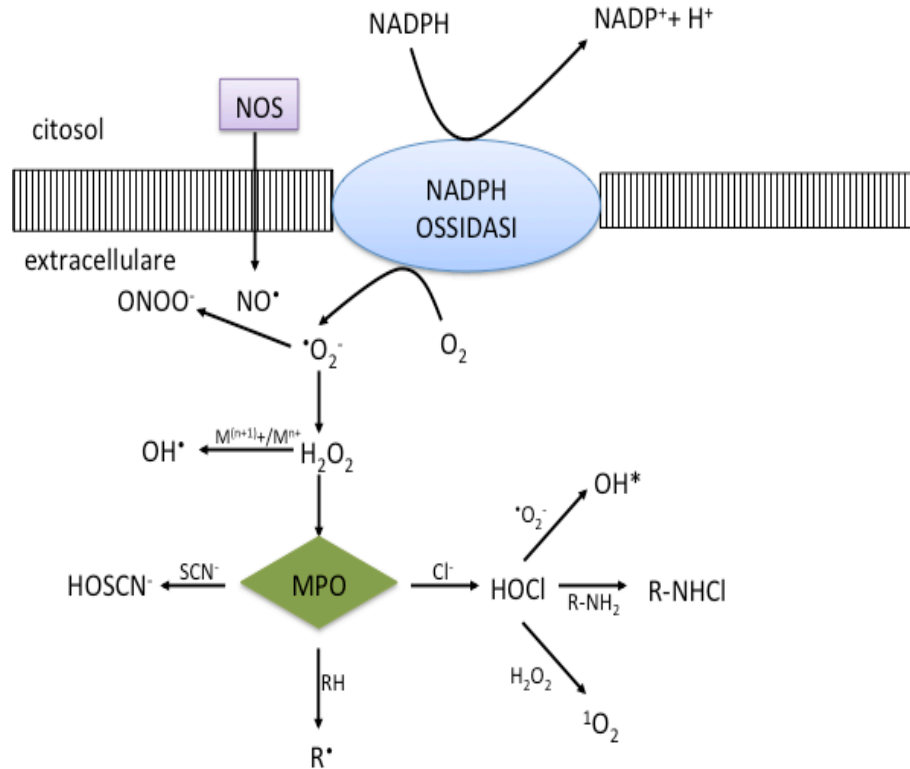


Figura 4 - Possibili reazioni di produzione di specie ossidanti nei neutrofili stimolati: La NADPH ossidasi 2 (Nox2) è un enzima presente nei neutrofili che coopera con altri enzimi nella produzione di specie ossidanti ad azione battericida. Essa forma superossido $O_2^{\cdot-}$ a partire dall' O_2 e NADPH. A questo punto il superossido può reagire con NO^{\cdot} generando perossinitrito, oppure, per azione della SOD (o per dismutazione spontanea), dare H_2O_2 . L' H_2O_2 , a sua volta, può trasformarsi in $^{\cdot}OH$ (in presenza di ioni metallici), o divenire substrato delle mieloperossidasi, enzimi in grado di produrre acido ipocloroso. (NOS, ossido nitrico sintasi; MPO, mieloperossidasi).

Attività NADPH ossidasiche furono presto scoperte nei macrofagi (Lowrie and Aber, 1977), nelle cellule mesangiali ed endoteliali (Radeke et al., 1990) (Jones et al., 1996), nelle cellule della tiroide (Dupuy et al., 1999) e in una pletera di altri tessuti dove sono risultate essere associate a membri della famiglia delle NADPH ossidasi distinti dalla Nox2 dei PMN (Droge, 2002).

Ovviamente l'ampia distribuzione delle Nox suggerì che il prodotto $\cdot\text{O}_2^-$ dovesse avere funzioni alternative oltre a essere materiale di partenza per produzione di tossici antimicrobici.

Un'altra importante fonte di $\cdot\text{O}_2^-$ risultò essere la catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri. Durante metabolismo ossidativo i complessi I, II e III della catena respiratoria possono prematuramente ridurre l'ossigeno (Hamanaka and Chandel, 2010) formando $\cdot\text{O}_2^-$ che viene convertito praticamente all'istante ad H_2O_2 dalle SOD mitocondriali o citosoliche. (Figura 5). Sebbene i complessi I e II producano $\cdot\text{O}_2^-$ nella matrice, il complesso III sembrerebbe produrre $\cdot\text{O}_2^-$ su entrambi i lati della membrana mitocondriale interna (Muller et al., 2004; Turrens, 2003).

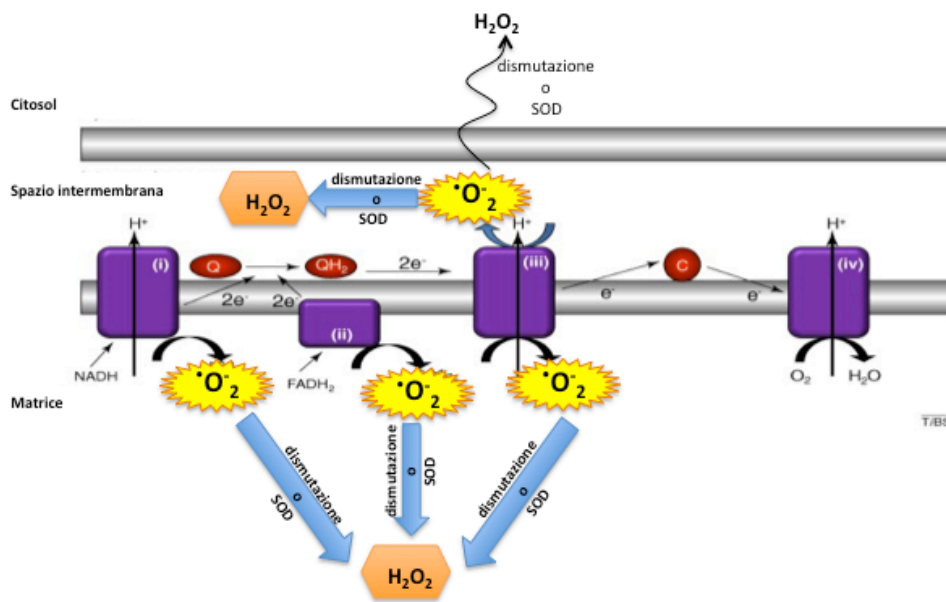


Figura 5 - Catena di trasporto degli elettroni e formazione di ROS : I complessi della catena respiratoria I, II e III producono $\cdot\text{O}_2^-$. L'anione superossido può poi essere convertito ad H_2O_2 sia per dismutazione spontanea che ad opera delle SOD mitocondriali e/o citosoliche. La produzione di ROS associata alla catena di trasporto degli elettroni è nota da molto tempo ed è stata sempre interpretata come un'inefficienza del sistema di trasporto degli elettroni. Recentemente è emerso che i ROS non sono solo 'distruuttori', ma potrebbero avere un ruolo nella propagazione di segnali cellulari. (Modificato da Hamanaka and Chandel, 2010).

L'importanza fisiologica della produzione mitocondriale di $\cdot\text{O}_2^-$ fu dibattuta per lungo tempo. Secondo una visione recente essa non rappresenterebbe un'inefficienza del sistema di trasporto degli elettroni,

ma avrebbe uno specifico ruolo nella propagazione dei segnali intracellulari. La questione di se e come la produzione di $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondriale sia specificamente regolata in modo da dettare la risposta fisiologica finale rimane tuttavia a tutt'oggi irrisolta (Hamanaka and Chandel, 2010).

Hennet e collaboratori dimostrarono per la prima volta che il Tumor Necrosis Factor α (TNF α) scatena una produzione di re $\cdot\text{O}_2^-$ mitocondriale che dipende dalla presenza di ioni Ca^{2+} , probabilmente responsabile dell'attività apoptotica di questa citochina (Hennet et al., 1993). Da allora la produzione mitocondriale di re $\cdot\text{O}_2^-$ è stata molte volte implicata nella regolazione di processi fisiopatologici rilevanti, come la risposta cellulare all'ipossia o alla trasformazione cellulare (Chandel et al., 1998) (Hamanaka and Chandel, 2010). Inoltre è stato dimostrato che il radicale $\text{NO}\cdot$ (vedi avanti) funziona da antimicina A endogena perché blocca il trasporto di elettroni attraverso il complesso III e aumenta la produzione mitocondriale di $\cdot\text{O}_2^-$ (Poderoso et al., 1996).

Una delle più grandi acquisizioni nel campo dei radicali liberi fu la scoperta, da parte del gruppo di Salvador Moncada, che l'endothelial-derived-relaxing factor' (EDRF), il fattore instabile fino ad allora noto come regolatore del tono vascolare, è in realtà un radicale di natura gassosa: il nitrossil radicale $\text{NO}\cdot$ (Palmer et al., 1987). Dopo questa identificazione divenne chiaro che questo radicale, che fino a quel momento aveva attratto solo l'interesse dei tossicologi come componente del fumo da combustione, esercitava anche una funzione fisiologica. Si dimostrò che si legava al ferro eme delle guanilato ciclasti solubili causando un aumento della produzione di cGMP e conseguente vasodilatazione e inibizione dell'aggregazione piastrinica (Moncada et al., 1988). Col senno di poi, il legame tra $\text{NO}\cdot$ e pressione arteriosa spiegava l'effetto farmacologico dei nitrati vasoattivi (Gruetter et al., 1979). La reale sorpresa, comunque, non è da considerarsi il meccanismo attraverso cui

l'NO funziona, ma il fatto che questo composto radicalico si forma in maniera endogena dall'arginina per azione di specifici enzimi, le NO sintasi (Calabrese et al., 2007; Forstermann et al., 1994; Forstermann et al., 1991; Moncada et al., 188) (Figura 6).

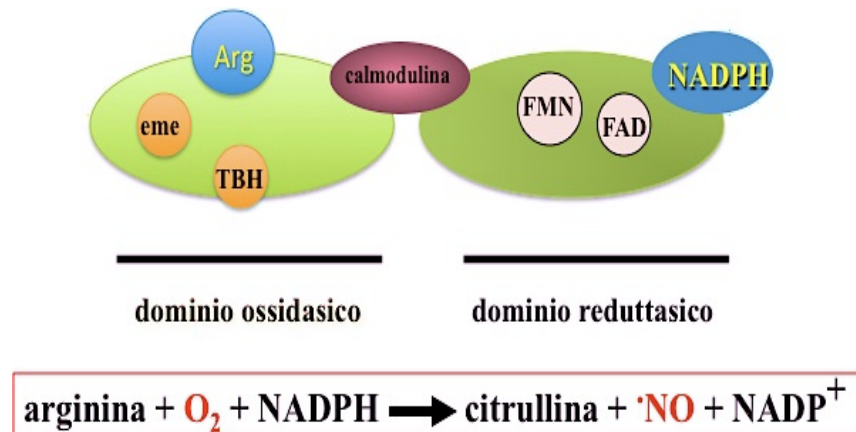
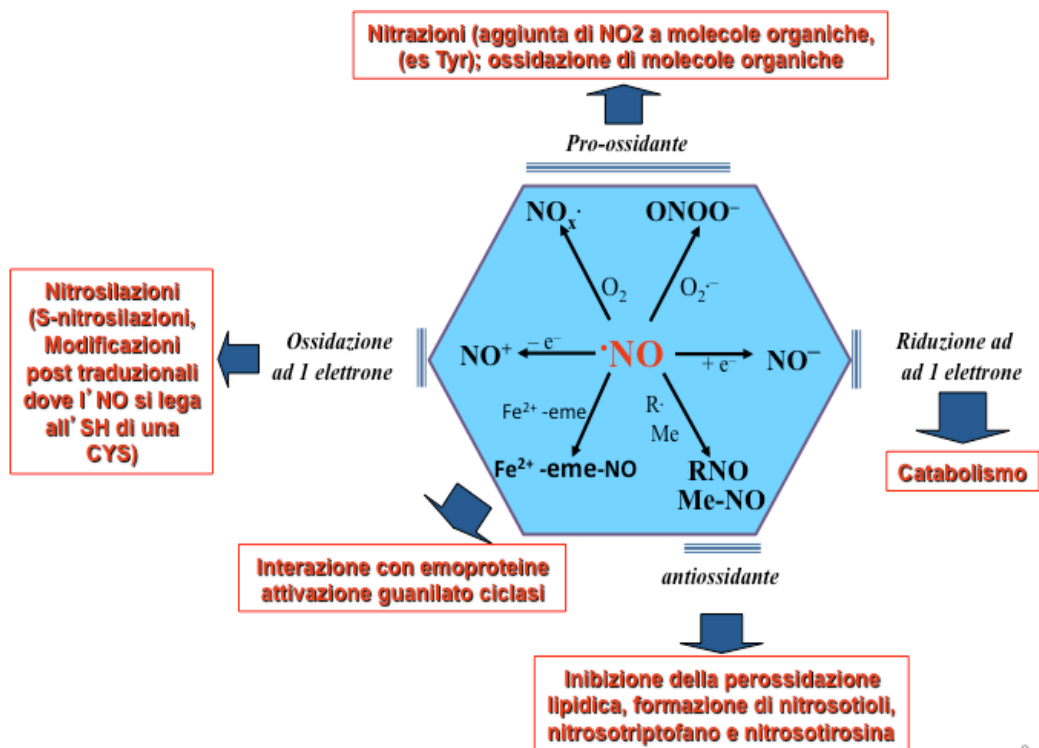


Figura 6 -Domini principali della Ossido nitrico sintasi (NOS) di mammifero: Le ossido nitrico sintasi, NOS, producono ossido nitrico e citrullina a partire da L-arginina, NADPH e ossigeno molecolare. L' NADPH fornisce equivalenti riducenti per la reazione. L'ossido nitrico sintasi NOS è costituita da due domini enzimatici: un dominio ossidasico N-terminale, che ha un gruppo eme direttamente implicato nell'ossidazione dell'arginina, e un dominio reduttasico C-terminale, che fornisce elettroni al dominio ossidasico. Tra i due domini è presente una sequenza regolatoria che lega il complesso Ca-calmodulina determinandone l'attivazione. L'attività di questo enzima dipende da numerosi cofattori responsabili del trasferimento degli elettroni necessari per produrre NO: l'eme e la tetraidrobiopterina (TBH) sono legati al dominio ossidasico, mentre il flavin adenine dinucleotide (FAD), il flavin mononucleotide (FMN) e il NADPH al dominio reduttasico. La Ca²⁺ calmodulina e la fosforilazione regolano in modo indipendente l'attività di NOS.

Nonostante i sorprendenti effetti benefici - NO^{*} previene la trombosi, è neuroprotettivo (Calabrese et al., 2007), è importante nell'immunità ecc. - il carattere radicalico dell'NO^{*} ha contribuito ad aumentare notevolmente la complessità della biochimica dei radicali liberi. NO^{*} può reagire con i radicali liberi e quindi avere una funzione antiossidante, ma gran parte della sua reattività è legata a prodotti non certo innocui (Beckman and Koppenol, 1996) (Figura 7).



9

Figura 7 - Schema delle reazioni chimiche e degli effetti biologici dell'ossido nitrico : Accanto all'interazione con l'eme della guanilato ciclasti solubile, responsabile dei suoi effetti miorilassanti, l'NO[•] presenta una reattività estremamente varia: può funzionare da antiossidante, reagire molto velocemente con l'anione superossido o con l'ossigeno molecolare per dare rispettivamente perossinitrito o NO_x[•], composti ossidanti in grado di reagire con altre molecole organiche e di aggiungere NO₂ a composti aromatici (nitrazioni) come la tirosina. L'NO⁺, prodotto di ossidazione di NO[•], è in grado di dare S-nitrosilazione, una modificazione post traduzionale delle proteine che comporta il legame di un gruppo NO ad un residuo di cisteina, una modificazione specifica e reversibile. La riduzione ad un elettrone comporta la formazione di NO⁻ e quindi il catabolismo dell'NO[•]. Modif. da H. Rubbo & R. Radi In *Handbook of Antioxidants Cadenas & Packer, Eds., pp. 689-707 (2001).*

Presto divenne chiaro che NO[•] reagisce con [•]O₂⁻ formando perossinitrito (ONOO⁻) con una costante di velocità di 10¹⁰ M⁻¹ sec⁻¹, una reazione quindi praticamente limitata solo dalla sola diffusibilità dei substrati (Nausser and Koppenol, 2002). ONOO⁻ si rivelò un altro ossidante forte, capace di reagire, tra l'altro con i tioli (Radi et al., 1991). NO[•] può anche aggiungere O₂, formando composti ossidanti (NO_x[•]) che hanno il potenziale di nitrare i residui di tirosina nelle proteine (Rubbo and Radi, 2001). La nitratura di residui di tirosina può anche essere ottenuta dal ONOO⁻, in presenza di metalli di transizione (Spear et al., 1997). Un'altra serie di prodotti dell'NO[•]

sono i nitrosotioili, il risultato dell'interazione del prodotto di ossidazione di NO^\bullet (NO^+) con un tiolo (Rubbo and Radi, 2001).

Molti dei prodotti secondari dell' NO^\bullet sopra menzionati sono stati implicati nella trasduzione del segnale (Spear et al., 1997). Tuttavia NO_x e ONOO^- hanno un considerevole potenziale tossico e possono essere alla base di fenomeni patologici che si instaurano qualora venga prodotto un eccesso di NO^\bullet .

Quindi, in analogia a re $^\bullet\text{O}_2^-$, NO^\bullet svolge ruoli fisiologici essenziali, ma il suo eccesso è dannoso.

Inoltre, la reattività del NO^\bullet con l' $^\bullet\text{O}_2^-$, con conseguente formazione di ONOO^- , comporta un chiaro potenziale di danno che deriva dalla loro simultanea produzione, come nella adult respiratory distress syndrome (ARDS) (Baldus et al., 2001), nella sindrome da riperfusione (Sittipunt et al., 2001) o in condizioni relate all'infiammazione (Figura 4).

In realtà il NO^\bullet e l' $^\bullet\text{O}_2^-$ rappresentano radicali liberi naturali non responsabili direttamente del danno tissutale che caratterizza lo stress ossidativo. Infatti, l'abbondanza di superossido dismutasi nei tessuti garantisce che l' $^\bullet\text{O}_2^-$ sia istantaneamente dismutato ad H_2O_2 , un ossidante non radicalico meno reattivo. In condizioni patologiche, tuttavia, l' H_2O_2 viene usata dalle eme perossidasi dei leucociti per produrre acido ipocloroso e altri composti reattivi o, attraverso la chimica di Fenton, $^\bullet\text{OH}$ (Hampton et al., 1998) (Figura 4).

Analogamente, il ONOO^- , che è di per se più reattivo dell' H_2O_2 , può venir trasformato in specie ancora più aggressive.

Ad oggi non sono stati scoperti enzimi che possano detossificare direttamente $^\bullet\text{OH}$, RO^\bullet , ossigeno singoletto o l'acido ipocloroso. Ovviamente la natura è stata sufficientemente accorta da non occuparsi del problema: è semplicemente impossibile competere per la reattività di queste specie con le macromolecole, essendo essa limitata dalla sola diffusibilità.

Di fatto, quindi, le reazioni radicaliche pericolose sono realtà e, ad esempio, sono utilizzate dagli organismi superiori per combattere i patogeni. Ne deriva che l'autoprotezione da parte delle cellule sia obbligatoria e, nei sistemi biologici, questa è stata ottenuta essenzialmente prevenendo la formazione di radicali dagli idroperossidi o dal perossinitrito. Gli enzimi implicati in questo processo di difesa funzionano attraverso la chimica del selenio (Se) o dello zolfo (S) e, nei mammiferi, appartengono a due distinte famiglie di proteine: le glutation perossidasi (GPxs) e le perossiredossine (Prxs). Entrambe agiscono sull'H₂O₂ e sul perossinitrito e su un ampio spettro di idroperossidi alchilici (ROOH) che comprende i prodotti delle lipo-ossigenasi e della perossidazione lipidica.

2. Le Glutation perossidasi

2.1. Storia

La prima GPx, oggi conosciuta come GPx citosolica o GPx-1, venne scoperta nel 1957 da Gordon C. Mills come un enzima che, nei globuli rossi, preveniva la distruzione ossidativa dell'emoglobina catalizzando la riduzione dell' H₂O₂ a spese di glutatione (GSH). (Eq. 1.1):



L'enzima è tetramerico e non contiene eme: a quell'epoca l'osservazione era sorprendente dal momento che erano note solo le eme perossidasi e l'eme era quindi considerato il gruppo prostetico obbligatorio delle perossidasi (Mills, 1957).

L'interesse per il nuovo enzima rimase praticamente silente per una decina di anni, fino al 1973 quando venne identificato il selenio (Se) nel suo sito catalitico (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973).

La GPx-1 rimase la sola glutation perossidasi nota fino al 1982, quando, nel laboratorio dell'allora Istituto di Chimica Biologica dell'Università di

Padova, oggi parte del Dipartimento di Medicina Molecolare -dove è stata prodotta questa tesi- venne descritta una nuova GPx monomeric. Questa, differentemente dalla GPx-1, venne fin dall'inizio apprezzata per la sua capacità di inibire la perossidazione lipidica e fu inizialmente chiamata 'peroxidation inhibiting protein' (PIP) (Ursini et al., 1982). In seguito venne riconosciuto che questa proprietà era dovuta alla sua capacità di ridurre gli idroperossidi dei fosfolipidi (PLOOH) a spese di glutathione (GSH) e fu così rinominata 'phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase' (PHGPx) (Maiorino et al., 1986; Ursini et al., 1985). Tuttavia la comunità scientifica riconobbe la PHGPx come nuova glutathione perossidasi solo nel 1991, quando l'elucidazione della sua struttura primaria indicò che si trattava di una nuova selenoperossidasi, scarsamente relata alla GPx-1, di cui però tipicamente conservava alcune anse che costituivano il sito attivo. (Figura 8) (Schuckelt et al., 1991). La PHGPx è oggi sistematicamente identificata come GPx-4: nel frattempo, infatti, altri omologhi delle GPxs sono stati descritti nei mammiferi.

```

hsGPx4      MCASR--DDWRCARSMHEFSAKDIDG-HMVNLDKYRGFVCIVTWNVASOWQWGKTEVNYTQLV 57
hsGPx1      MCAARLAAAAAAAAQSVYAF SARPLAGGEPVSLGSLRGKVLLIENVASLWGTTVRDYWTQMN 60
          ***:*      *:*: ***: : * * * ** * : : **** * * * :***:
hsGPx4      DLHARYAECGLRILAFPCWNQWFGKWEPGSNEEIK-----EFAAGYNVKFDMFSKICVNGD 111
hsGPx1      ELQRRLGPRGLVVLGFPCWNQWFGHWENAKNEEILNSLKYVRPGGGFEPNFMWLFEKCEVNGA 120
          :*: * ** :* *****:** ***** *:* :* :* * ***
hsGPx4      DAHPLWKWMKIWPKGKG-----ILGNAIKWNWFTKFLIDKNGCVVKRYG 154
hsGPx1      GAHPLFAFLREALPAPSDDATALMTDPKWLITWSPVCRNDVAWNWFEKFLVGPWDPGWVPLRRYS 180
          ****: : : : * : *** ***: :* ::**
hsGPx4      PMEELVIEKDLPHYF----- 170
hsGPx1      RRFQWTIDIEPDIEALLSQGPSCA 203
          : : ** * :

```

Figura 8 -Allineamento multiplo delle sequenze di GPx-4 e GPx-1 umane: In verde sono evidenziati gli aminoacidi componenti la tetrate catalitica, l'asterisco * contrassegna gli aminoacidi immutati nelle due sequenze, mentre i due punti : quelli che comunque hanno proprietà molto simili tra loro. Si può notare come l'intorno dei residui costituenti il sito catalitico sia conservato nelle due sequenze, così come in tutte sequenze della famiglia delle GPxs (inclusi i membri contenenti Cys).

A oggi la lista delle GPxs di mammifero è cresciuta fino a contenere 8 prodotti genici distinti. In maggioranza contengono selenocisteina (SecGPxs) e spesso coesistono nei diversi tipi cellulari (GPx-1, GPx-2, GPx-

4, GPx-6 che, invero, è espressa soprattutto nell'embrione e nell'epitelio olfattorio). Una di queste, la GPx-3, è extracellulare.

Nelle rimanenti varianti la Sec al sito attivo è sostituita da una Cys (CysGPxs) (GPx-5, GPx-6 in alcune specie, GPx-7 e GPx-8). Di queste solo la GPx-4, GPx-7 e GPx-8 hanno natura monomerica, mentre tutte le altre sono tetrameri (Toppo et al., 2008).

Il miglioramento delle tecniche di sequenziamento, combinato alla bioinformatica, ha permesso l'accumulo di database genomici e quindi l'analisi di proteine omologhe provenienti da gruppi tassonomici diversi. Da questi studi emerge che le SecGPx sono solo una minoranza di proteine che si trova, oltre che nei mammiferi, nei vertebrati non-mammiferi e, sporadicamente, in alcuni invertebrati come trematodi, nei protisti e in alcuni batteri. Invero, la maggioranza delle glutation perossidasi è costituita da CysGPx monomeriche che si ritrovano in tutto il resto del mondo vivente: piante, insetti, batteri, funghi e protozoi.

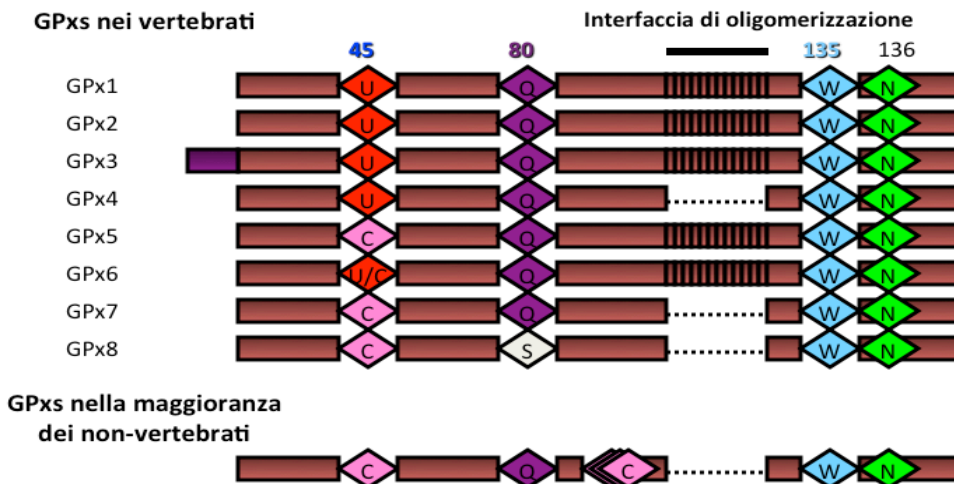


Figura 9- Schema della struttura della sequenza delle GPxs. Tutte le GPxs conservano i residui costituenti la tetrate catalitica: la Sec (Cys) perossidasi, la glutammina, il triptofano e l'asparagina. Nei vertebrati coesistono Sec-GPx e Cys-GPx e vi sono sia omologhi tetramerici che monomerici (le GPx4, 7, 8 che mancano dell'interfaccia di oligomerizzazione e sono pertanto monomeriche). Le GPx7 e 8 presentano un peptide segnale N-terminale, tipico delle proteine secretorie, ed un motivo C-terminale omologo a quello delle proteine residenti nel ER. Le GPx dei non-vertebrati, invece, sono 2Cys-GPx monomeriche che, oltre alla cisteina catalitica possiedono un secondo residuo di Cys che funge da 'resolving' durante la catalisi ed è la chiave della reattività con la tioredossina.

Queste CysGPx, oltre alla cisteina che reagisce direttamente con il perossido (detta anche perossidasi C_P), contengono un secondo residuo di cisteina non perfettamente allineato che funziona da 'resolving Cys' (C_R) e rappresenta un secondo centro di ossidoriduzione di queste proteine, in questa tesi denominate 2CysGPx (Figura 9).

La C_R conferisce alle 2CysGPx specificità per le redossine come substrato riducente (vedi avanti). Pertanto il termine storico 'glutathione perossidasi', descrivendo funzionalmente solo un piccolo numero di proteine, risulta oggi inadeguato a descrivere le GPx di tutto il regno vivente (Maiorino et al., 2007; Toppo et al., 2009).

2.2. Catalisi

Per apprezzare il ruolo catalitico delle GPxs deve essere chiarito che i tioli indissociati non reagiscono affatto con i perossidi, e pertanto l'equazione 1.1 non descrive la reazione non catalizzata: la dissociazione del tiolo è, infatti, un prerequisito indispensabile per l'ossidazione mediata dai ROOH. Altra osservazione importante è che nella reazione non catalizzata il prodotto non è un disolfuro ma un derivato dell'acido sulfenico:



Quest'ultimo, che possiede un pK_a attorno a 5 (Claiborne et al., 1993), si dissocia a pH fisiologico e forma così un disolfuro con un'altra molecola di GSH, secondo la reazione (1.3):



Questo implica che l'ossidazione spontanea di un tiolo da parte di un idroperossido dipenda dal valore di pK_a del tiolo (Flohe et al., 1971).

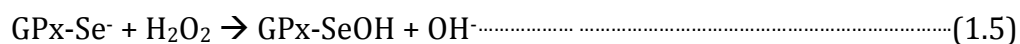
Il tiolo del GSH, principale riducente intracellulare, ha un valore di pK_a di oltre 9 e sembrerebbe essere stato specificamente selezionato per non

essere spontaneamente ossidato (Dominici et al., 2003). L'anione tiolato, infatti, è la forma che meglio permette l'ossidazione da parte dell'ossigeno molecolare con formazione di $\cdot\text{O}_2^-$ e del radicale tiile (eq. 1.4) la cui produzione è, per motivi ovvi, fisiologicamente non desiderabile:



Questi prodotti sono comunemente osservati durante l'ossidazione della cisteina e della cisteamina che possiedono, in paragone, un più basso valore di pK_a sia rispetto al GSH che ai selenoli, i quali, a pH fisiologico, sono in pratica completamente dissociati (Spallholz, 1994).

Per accelerare la reazione perossidica le GPxs hanno evoluto un meccanismo intelligente, che permette il superamento della meno favorevole interazione diretta del GSH o del GS^- con l'idroperossido (ROOH). Infatti è l'enzima che viene ossidato dall'ROOH e non il GSH. Ciò avviene a livello del centro catalitico dell'enzima, che contiene selenio (Se) in forma di selenocisteina (Sec) in analogia all'equazione 1.2 (Eq. 1.5)



Nelle GPxs questa reazione procede con una costante di velocità dell'ordine di $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Quando il residuo di Sec è sostituito dalla Cys, come nelle 2CysGPx degli invertebrati e delle piante (vedi sopra), la costante di velocità ottenuta è $>$ di $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Toppo et al., 2009). Questi valori sono nettamente superiori a quelli delle reazioni non catalizzate. Infatti, le costanti di velocità della reazione bimolecolare di ossidazione dei tioli a basso peso molecolare (come della cisteina o della cisteamina) con idroperossido non eccedono il valore di $30 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, anche quando estrapolate per la completa deprotonazione del tiolo (Winterbourn and Metodiewa, 1999).

La differenza, in termini di costanti cinetiche, tra la reazione catalizzata e non catalizzata rivela che le GPxs sono invenzioni brillanti in cui il microambiente del calcogeno perossidasi aumenta drammaticamente la sua stessa reattività. Come questo venga ottenuto è a tutt'oggi ancora materia di speculazione. A titolo di prova è stato assunto che il sito attivo debba adempiere alle seguenti funzioni: i) dissociare il sito attivo (seleno) cisteina; II) polarizzare l'ROOH substrato III) donare un protone per formare un ROH come un buon gruppo uscente (Toppo et al., 2009)(Figura 10).

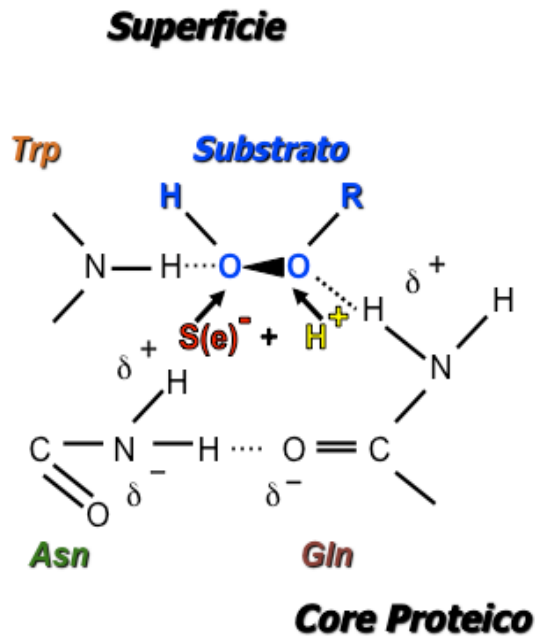
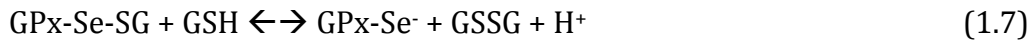


Figura 10- Rappresentazione schematica dell'intorno della Selenocisteina (cisteina) catalitica nelle glutation perossidasi: Il residuo catalitico U_p (C_p) è qui mostrato nella forma dissociata S(e)⁻+H⁺. Il sito attivo nelle GPxs è conservato e questo garantisce le caratteristiche necessarie per la catalisi: La polarizzazione del legame O-O del perossido da parte del triptofano e della glutammina, che consente l'attacco nucleofilo del S(e)⁻ sull'ossigeno depauperato di elettroni, e la donazione di un protone, che permette la formazione di un buon gruppo uscente, l'ROH.

Le strutture ai raggi X delle GPxs rivelano un sito attivo altamente conservato in tutti i membri della famiglia; inoltre, gli esperimenti di mutagenesi sito-specifica hanno sottolineato l'importanza funzionale dei residui di Trp, Asn, e Gln nell'ambiente della (seleno)cisteina (Tosatto et al., 2008).

Nelle SecGPxs, l'enzima viene rigenerato nel suo stato fondamentale GPx-Se⁻ da due consecutive reazioni con il GSH (eq. 1.6 e 1.7), che procedono

globalmente con una costante di velocità apparente attorno a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Il primo passaggio riduttivo è analogo all'Eq. 1.3, il secondo analogo a quello di uno scambio reversibile tiolo/disolfuro.



Quindi l'essenza della catalisi delle SecGPxs è rendere possibile la reazione rappresentata nell'eq. 1.1 senza necessità di generare la forma dissociata del GSH (Figura 11).

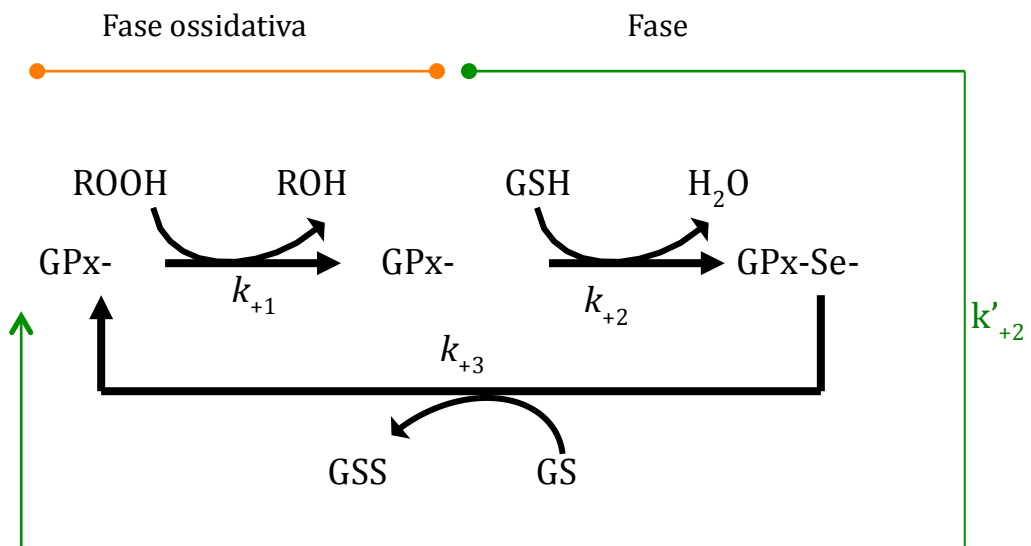


Figura 11 - Meccanismo catalitico a ping pong proposto per le Selenoperossidasi: La reazione catalizzata dalle selenoperossidasi è di tipo ping pong, questo implica che non vi sia la formazione di un complesso ternario, ma che la selenocisteina dell'enzima reagisca con il primo substrato (ROOH) ossidandosi a derivato dell'acido selenenico (R-SeO⁻). A questo primo passaggio ossidativo ne segue uno riduttivo in cui due molecole di GSH reagiscono consecutivamente con l'enzima ossidato che, passando attraverso un intermedio disolfuro misto GPx-Se-SG, viene così riportato nella sua forma ridotta. k_{+1} e k'_{+2} sono le costanti cinetiche di secondo ordine rispettivamente per l'ossidazione e la riduzione dell'enzima ($k'_{+2} = k_{+2} + k_{+3}$).

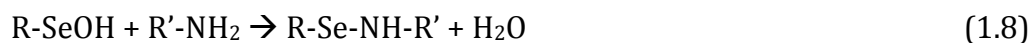
Inoltre il sito attivo deprotonato della selenocisteina (o cisteina) è evidentemente protetto nella micro architettura del sito attivo in modo da prevenire transizioni ad un elettrone. Il risultato è una riduzione 'pulita'

del perossido al corrispondente alcol, senza formazione di radicali intermedi. Ciò contrasta marcatamente con la riduzione dei perossidi da parte delle eme perossidasi che, a parte la notevole eccezione della catalasi, hanno la tendenza a generare intermedi radicalici e prodotti fortemente ossidati (Mason, 1986).

2.3. Intermedi catalitici

Nel dettaglio, la reazione delle GPxs è molto più complessa di quanto descritto nelle Eq. 1.5-1.7 e in Figura 11, e differisce nelle Sec o nelle 2CysGPx.

Nelle eq. 1.5 e 1.6 e in Figura 11 il primo intermedio catalitico è rappresentato nella forma di derivato dell'acido selenenico, rispettivamente R-SeOH o R-SeO⁻. Ad oggi, tuttavia, questo intermedio instabile non è mai stato positivamente identificato. Infatti, l'esposizione per tempi brevi della GPx-4 a H₂O₂ forma un prodotto più leggero di 2 unità di massa rispetto all'enzima ridotto, mentre manca un incremento di massa di 16, come ci si aspetterebbe per il derivato selenenico (Toppo et al., 2009). Ciò potrebbe suggerire che il prodotto primario – il derivato dell'acido selenenico dell'enzima – elimini velocemente H₂O con la formazione di un legame Se-X che sarebbe quindi ridotto dal GSH. Un'ipotesi plausibile potrebbe essere quella di un legame Se-X intramolecolare che, in analogia all'eq. 1.7, potrebbe essere risolto dal GSH. Tuttavia, nel sito attivo della GPx-4 non sembrerebbe esserci alcun residuo di Cys che possa reagire con il Se della Sec. Più probabilmente, quindi, lo stato di ossidazione dell' -SeOH potrebbe essere conservato in forma di legame Se-N che potrebbe poi essere rotto dal GSH, così come proposto per il ciclo catalitico dell' ebselen, un composto del selenio che mima l'attività delle GPxs (Maiorino et al., 1988) (Figura 12).



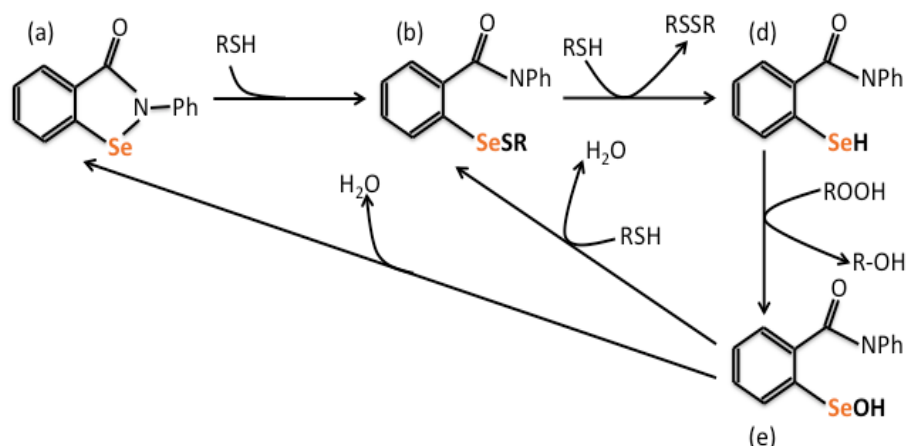


Figura 12 - Meccanismo d'azione suggerito dell'ebeselen (a): L'ebeselen è un composto organico sintetico contenente selenio capace di mimare l'attività delle SecGPx. Inizialmente l'ebeselen (a) reagisce con un tiolo (RSH) producendo un intermedio selenil sulfide (b). La reazione di quest'ultimo con un altro RSH, porta alla formazione di un selenolo (d) che, similmente alle SecGPx, riducendo ad alcoli i perossidi (ROOH), si ossida a derivato dell'acido sulfenico (e). A questo punto sono proposte due vie: la reazione con un altro tiolo RSH che riporta al disolfuro misto selenil sulfide (b), oppure la perdita di una molecola di acqua dall'acido sulfenico, a ripristinare l'ebeselen (a) che riprende il ciclo.

Di fatto la formazione di un legame sulfenilamidico simile a quello sopra descritto è stato trovato nella tirosina fosfatasi 1B (Salmeen et al., 2003) e non può essere escluso per le GPxs.

In contrasto, nelle 2CysGPx degli invertebrati e delle piante, che hanno la Sec catalitica sostituita da una Cys, lo stato di ossidazione del derivato sulfenico è invariabilmente conservato nella forma di disolfuro intramolecolare (vedi avanti).



Tipicamente la C_R delle 2CysGPx non è presente nelle SecGPxs (Maiorino et al., 2007).

2.4 Struttura

A oggi, circa venti strutture di omologhi delle GPx sono depositate nelle banche dati. La loro struttura terziaria è simile a quella osservata per la prima volta nella Trx, peraltro condivisa da molte altre famiglie di ossidoreduttasi. Consiste di quattro foglietti β fiancheggiati da tre α eliche che danno origine a una struttura a sandwich a due strati del tipo $\alpha/\beta/\alpha$ con un pattern di struttura secondaria $\beta_1 \alpha_1 \beta_2 \alpha_2 \beta_3 \beta_4 \alpha_3$. Nelle GPxs il ripiegamento 'Trx like' contiene però strutture secondarie addizionali (Figura13) (Martin, 1995).

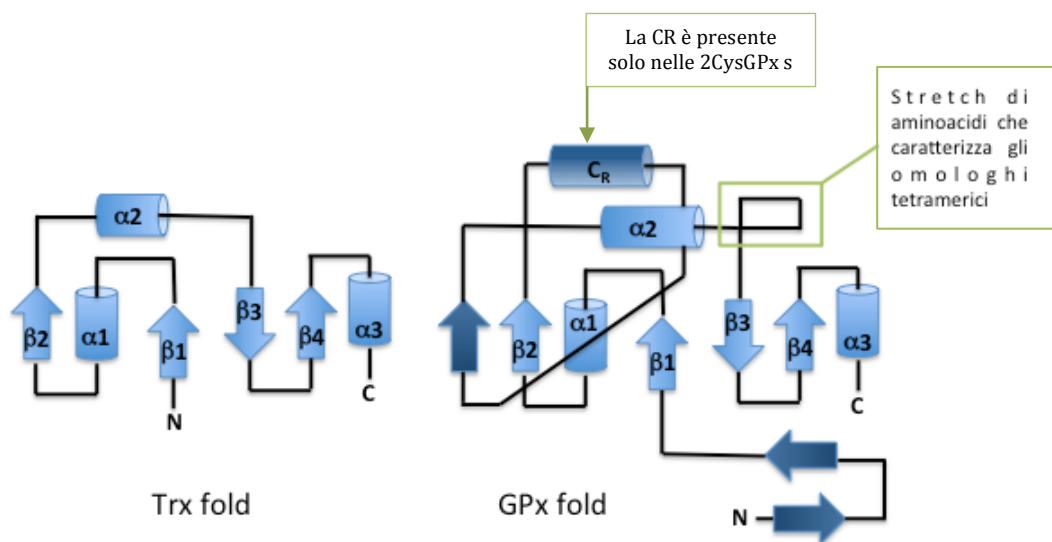


Figura 13 - Struttura terziaria delle Trx e delle GPx: Il ripiegamento della tioredossina (Trx, a sinistra) è di tipo $\alpha/\beta/\alpha$ ed è condiviso da molte ossidoreduttasi tra cui le glutation perossidasi (GPx, a destra). Quest'ultime si distinguono per la presenza di elementi di struttura secondaria in più che conferiscono alle GPxs peculiarità strutturali e funzionali. La CR dell' α elica addizionale è presente solo nelle 2CysGPxs.

Vicino all'estremità N-terminale si trovano due foglietti β , mentre un'alfa elica e un foglietto beta si trovano tra β_2 e α_2 . Degno di nota è che l'alfa elica addizionale contiene la C_R tipica delle 2CysGPxs e che negli omologhi tetramericici questo 'stretch' di aminoacidi è ulteriormente esteso a formare l'interfaccia di legame tra i monomeri. Un addizionale stretch di aminoacidi che caratterizza gli omologhi tetramericici si trova tra α_2 e β_3 .

Questo rappresenta, nella GPx-1, l'interfaccia tetramericata e pertanto è deleta negli omologhi monomerici.

Il sito attivo delle Trxs contenente la sequenza CXXC, caratteristica tipica delle Trx, è conservato seppur in forma mutata U/CXXT nella maggioranza delle GPxs. Il residuo di T, estremamente conservato, sembrerebbe critico per la stabilità della struttura (Scheerer et al., 2007).

Da un punto di vista strutturale, nelle GPxs la tasca contenente il sito attivo giace in un incavo poco profondo sulla superficie della proteina. In esso l'atomo di Se o di S, che funzionano nella catalisi ossidoriduttiva, si trovano a distanza di legame idrogeno da tre residui strettamente conservati: una Gln, un Trp e una Asn. Questi residui sono locati in anse lontane nella struttura primaria (Tosatto et al., 2008)(Figura 14) ed assieme alla U/C perossidasi costituiscono la tetrate (U/C, Q, W, N) che rappresenta la 'firma' dell'intera famiglia delle GPx e ha un ruolo funzionale nella catalisi.

Il confronto tra i siti attivi delle GPx1 e 4 umane rispetto all'accessibilità al residuo perossidasi potrebbe offrire una spiegazione logica del fatto che la maggioranza delle GPx monomeriche reagisce con gli idroperossidi complessi come quelli dei fosfolipidi, PLOOH (Flohe et al., 2011; Toppo et al., 2009). Infatti, come in tutti omologhi monomerici, l'interfaccia tetramericata è deleta e, poiché' gli aminoacidi che la compongono coprono parzialmente il Trp del sito attivo, sembrerebbe ovvio che la loro assenza, negli omologhi monomerici, faciliti l'accessibilità agli idroperossidi più complessi (Flohe et al., 2011).

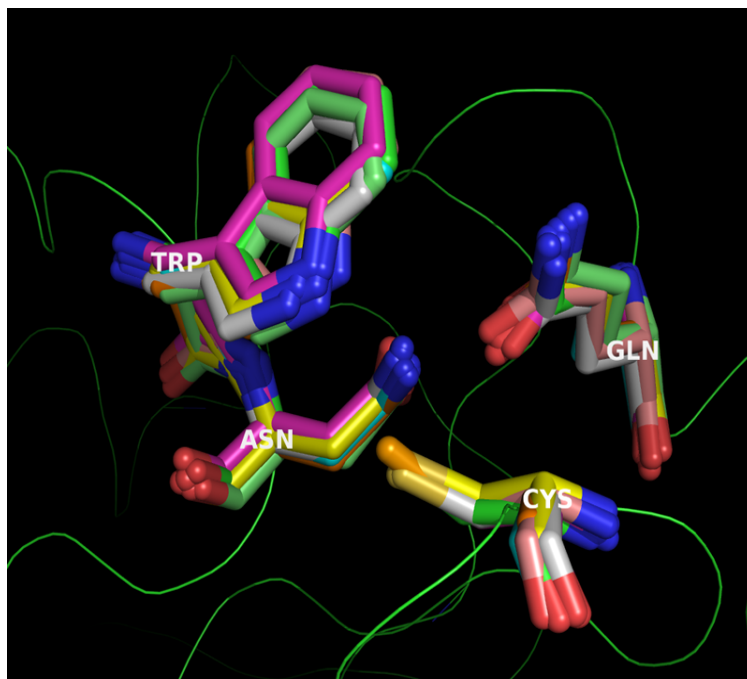
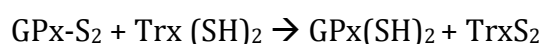


Figura 14 - Intorno molecolare della (seleno) cisteina perossidasi nella famiglia delle GPx:

Sovrapposizione delle 'tetraedi catalitiche' di alcune strutture note delle GPx. I colori dei residui nella raffigurazione a bastoncino, il codice pdb corrispondente e la sorgente sono i seguenti: : GPx-1 bovina (verde, 1GP1); GPx-1 umana (blu, 2F8A) [Structural Genomic Consortium (SGC)]; GPx-2 umana (violetto, 2HE3) [SGC]; GPx-3 umana (arancione, 2R37) [SGC]; GPx-4 umana (rosa, 2OBI); GPx-5 umana (giallo, 2I3Y) [SGC]; GPx-7 umana (bianco, 2P31) [SGC]; Trypanosoma brucei GPx (verde chiaro, 2VUP). Le strutture sono visualizzate con pymol. (<http://www.pymol.org>).

All'interno delle SecGPx di mammifero, anche la specificità per il substrato riducente sembrerebbe poter essere spiegata su basi strutturali. È stato proposto che nella GPx-1 quattro residui di Arg e un residuo di Lys forniscano un'architettura elettrostatica che dirige il substrato riducente GSH verso il centro catalitico, in modo che il suo gruppo sulfidrilico venga in contatto con la forma di Se ossidata (Figura 15 A). La peculiare architettura del sito di legame per il GSH è conservata solo parzialmente nella GPx2 e nella GPx3, ma completamente assente nella GPx4 (Figura 15B). Pertanto la specificità delle SecGPx per il GSH dovrebbe declinare nel seguente ordine GPx1>GPx2>GPx3>GPx4 (Figura 15 B) (Ursini et al., 1995).

La specificità per la tioredossina (Trx), invece, sembrerebbe essere dominio delle 2CysGPxs che, contenendo un residuo di C_R intramolecolare, mimano la specificità di substrato e il meccanismo di catalisi delle perossiredossine atipiche (Maiorino et al., 2007)(Figura 16). In queste proteine della famiglia delle GPxs la riduzione da parte della Trx della GPx ossidata a disolfuro intramolecolare (Eq. 1.9) è risultata essere da 3 a 5 volte più veloce rispetto a quella con il GSH.



1.10

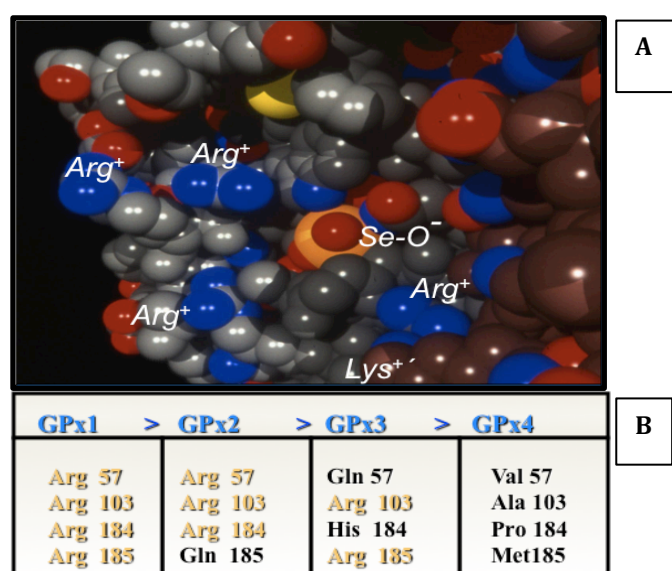


Figura 15 -A - Il sito attivo della GPx-1: la struttura dell'enzima è importante in quanto da essa dipende il substrato riducente. Nella GPx1 vi sono quattro arginine ed una lisina disposte in modo da costituire una 'trappola' per il GSH che, in tal modo, è selettivamente direzionato verso la selenocisteina ossidata. **B- Grado di conservazione dei residui di Arg nelle Sec-GPx:** le quattro arginine che nella GPx1 sono responsabili dell'affinità per il GSH, non sono conservate in tutte le Sec-GPx, anzi, nella GPx4 sono assenti.

Oltre alla presenza della C_R, l'altra peculiare caratteristica che determina la specificità per la Trx è la delezione della superficie di tetramerizzazione che impartisce flessibilità all'elica che contiene la C_R stessa. Il ponte disolfuro formatosi a seguito dell'ossidazione mediata dai perossidi (Eq. 1.9 e Figura 16) conferisce poi il motivo canonico per la riduzione da parte

della tioredossina, che è il prototipo delle proteine contenenti il motivo CXXC (Maiorino et al., 2007).

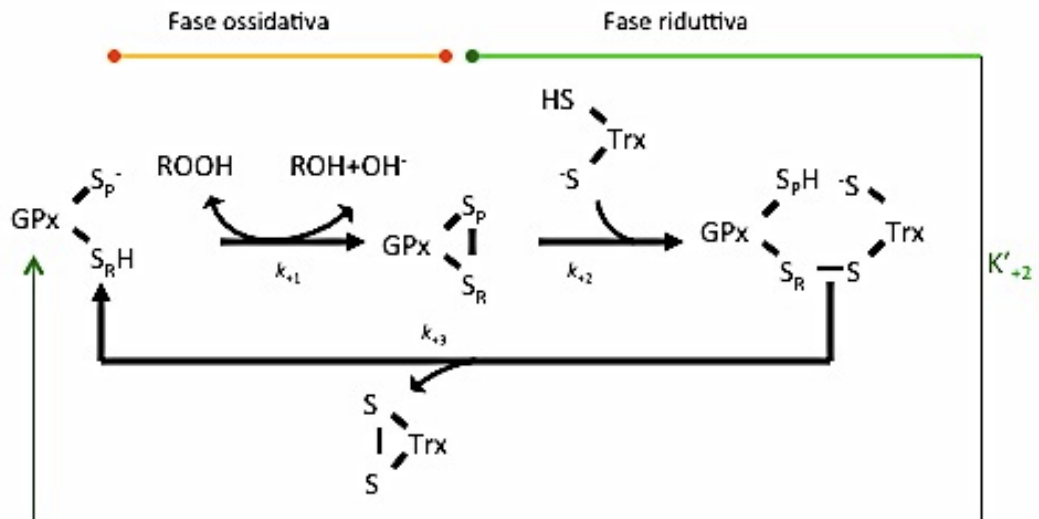


Figura 16 - Meccanismo catalitico ping-pong delle 2CysGPx: A differenza delle SecGPxs, le 2-CysGPxs, in seguito all'ossidazione da parte del perossido, formano un disolfuro intramolecolare tra la C_P e la C_R. Questo disolfuro viene poi ridotto efficacemente dalla Trx ma non dal GSH. La fase riduttiva del ciclo prevede la formazione di un disolfuro con una prima molecola di Trx, che viene spiazzato successivamente da una seconda Trx.

2.5 Funzioni fisiologiche delle GPxs

Rilevanti da un punto di vista fisiologico sono sicuramente le differenze di specificità di substrato all'interno della famiglia delle GPxs. Tutti i membri sembrano capaci di ridurre, oltre all'H₂O₂, gli idroperossidi organici semplici. Nei mammiferi, la GPx-4, l'unica selenoperossidasi monomeriche, è peculiare per la sua veloce reattività con gli idroperossidi complessi come quelli dei fosfolipidi, anche se questi sono integrati nelle membrane (Maiorino et al., 1989; Maiorino et al., 1986).

Come si formino i perossidi dei fosfolipidi *in vivo* non è chiaro, ma concetto emergente è che siano il risultato dell'attivazione di specifiche attività lipossigenasiche (Hammond and O'Donnell, 2011). Tutte le lipossigenasi richiedono un certo livello di idroperossidi per diventare attive (Schnurr et al., 1996) e perciò potrebbero, almeno in teoria, essere silenziate da

tutte le GPxs intracellulari. Recentemente, esperimenti di delezione genica hanno dimostrato che la GPx-4 è, a questo proposito, più rilevante rispetto alle altre GPxs. La GPx4, infatti, contrasta l'apoptosi caspasi-indipendente (Seiler et al., 2008) (più recentemente rinominata necroptosi)(Dunai et al., 2011), un'osservazione che suggerisce il ruolo peculiare dei perossidi dei fosfolipidi in questo processo. Nelle cellule neuronali, inoltre, la GPx-4 si è rivelata il solo enzima capace di contrastare l'apoptosi risultante dall'attivazione della 12/15 lipossigenasi, attiva sui lipidi integrati nelle membrane (Hammond and O'Donnell, 2011; Seiler et al., 2008). Oltre a questo è sicuramente degno di nota il fatto che delle 4 (5) SecGPx espresse nel topo, solo la GPx-4 si è dimostrata indispensabile per lo sviluppo embrionale (Imai et al., 2003). Sembrerebbe quindi lecito assumere che l'apoptosi, risultante dall'attività di ossigenazione dei fosfolipidi da parte della 12/15 lipossigenasi, sia rilevante anche nel rimodellamento dei tessuti che avviene nel periodo prenatale, dato che questo processo è fatalmente disturbato se non opportunamente bilanciato dalla attività della GPx-4.

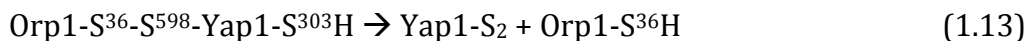
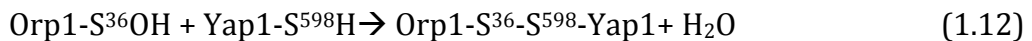
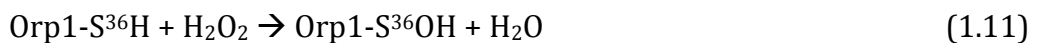
Come più sopra riportato, la GPx-4 è anche unica tra le selenoperossidasi per la sua limitata specificità rispetto al substrato riducente. Mentre la GPx-1, da cui la famiglia prende il nome, è invero una vera *glutathione* perossidasi (Ursini et al., 1995), la GPx-4 accetta, oltre al GSH, una varietà di altri tioli inclusi quelli di una proteina come la cromatina, o frammenti della proteina ricca di cisteina associata al mitocondrio degli spermatozoi (SMCP) che possiedono tipicamente cisteine adiacenti (Maiorino et al., 2005). Inoltre la GPx-4 può essere ridotta dai tioli della stessa GPx4 permettendo così la formazione di polimeri che, dopo la formazione di legami crociati con altre proteine ricche di cisteina, consente la costruzione e la stabilizzazione del materiale cheratinoso che costituisce la capsula mitocondriale dello spermatozoo dei mammiferi (Mauri et al., 2003). Su queste basi molecolari non sorprende che la GPx-4 - attraverso

esperimenti di genetica inversa - si sia rivelata essenziale per la spermatogenesi (Schneider et al., 2009).

La riducibilità della GPx4 da parte dei tioli proteici rappresenta il primo esempio, nei mammiferi, di una reazione in cui una GPx non ha il solo scopo di detossificare gli idroperossidi, ma usa gli ROOH per la sintesi di una macrostruttura proteica.

Questo costituisce un interessante e intrigante variazione meccanicistica dell'usuale ciclo catalitico in cui il GSH funziona da riducente (reazioni 1.5-1.7 e Figura 11): la GPx4, infatti, accettando tioli proteici come riducenti, funziona nella modificazione di essi formando disolfuri misti Se-S che, nello spermatozoo, sono funzionali alla maturazione della capsula mitocondriale.

Questa reazione, in contesti diversi, potrebbe avere una funzione regolatoria su specifiche proteine target ma di fatto questa possibilità non è stata ancora definitivamente dimostrata per le SecGPxs dei mammiferi. Tuttavia, Orp1, una 2CysGPx di lievito che appartiene alle glutation perossidasi, che sono Trx perossidasi, forma un eterodimero tramite un disolfuro con il fattore di trascrizione Yap1, determinando, alla fine, l'attivazione della trascrizione genica (Delaunay et al., 2002).



In questa sequenza di reazioni, le Eq. 1.11 e 1.12 sono analoghe alla 1.5 e 1.9 mentre l'equazione 1.13 è una reazione di scambio tiolo/disolfuro analoga all'equazione 1.7 che è in principio reversibile. In situ, tuttavia, la riduzione del disolfuro tra la Cys303 e Cys598 del fattore di trascrizione richiede Trx (Figura 17).

In pratica le equazioni 1.11-1.13 suggeriscono che una GPx possa funzionare da 'sensore' per gli ROOH e quindi come un segnale ossidante possa essere trasdotto o terminato.

Su queste basi non sarebbe inatteso se anche altre GPx, trovando partner alternativi al glutatione o alla tioredossina, risultassero essere capaci di trasferire gli equivalenti ossidanti derivanti dalla reazione con il ROOH, a specifici tioli di proteine regolatorie.

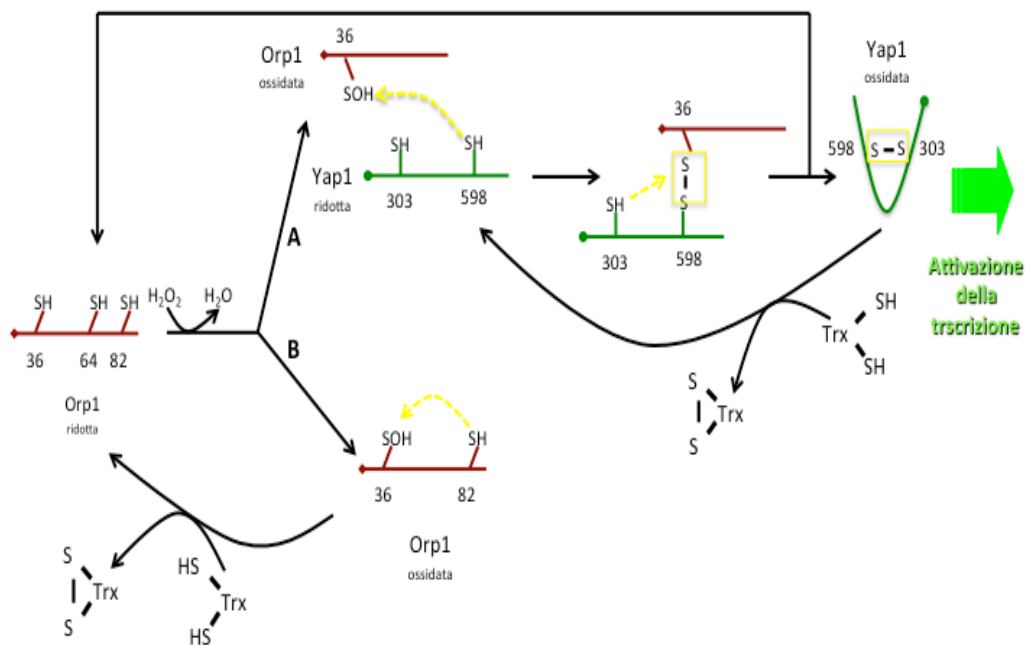


Figura 17 - Duplice funzione di sensore e trasduttore di Orp1: la proteina di lievito Orp1 è una GPx che contiene due residui di cisteina: uno con funzione perossidasi e l'altro resolving (2CysGPxs). Una volta ossidata dall'idroperossido a derivato dell'acido sulfenico (R-SOH), la Cys 36 può : A) reagire formando un disolfuro misto con la Cys 598 del fattore trascrizionale Yap1 che è successivamente sostituito da un disolfuro intramolecolare tra Cys598-Cys303 di Yap1. Orp1 è così ripristinata nella sua forma ridotta e Yap1 attivata a stimolare la trascrizione di geni implicati nella difesa antiossidante. La Trx è in grado di ridurre Yap1. B) formare un disolfuro intramolecolare con la Cys 82 che è spiazzato dalla Trx che riporta in tal modo Orp1 nello stato ridotto. Ecco che questa GPx di lievito è un esempio di come, accanto all'attività antiossidante, possa sussistere una di 'trasduttore del segnale perossidasi'.

2.6 Le 1 CysGPx dei mammiferi

I membri della famiglia delle glutation perossidasi dei vertebrati identificati più recentemente sono due GPx monomeriche del reticolo endoplasmatico (ER), chiamate GPx7 e GPx8, che esibiscono una notevole omologia con la GPx4 e le GPxs degli invertebrati (Utomo et al. 2004) (Toppo et al. 2008) (Nguyen et al. 2011). A livello di struttura primaria l'omologia fra la hGPx7 e la hGPx4 umana o la *DmGPx* è quantizzabile attorno al 37 % o al 31% rispettivamente (Fig.ura18).

Queste sono peculiari perché contengono un residuo di Cys in posizione omologa alla Sec delle GPxs dei vertebrati e per questo, possono essere ascritte alla sottofamiglia delle CysGPxs come le glutatione perossidasi degli invertebrati, che contengono tipicamente un residuo di Cys perossidasi (C_P) al posto della Sec (vedi anche il paragrafo 2.1). A differenza di queste però, mancano della Cys con funzione di resolving (C_R), tipicamente presente nell' elica addizionale alfa 4 del 'Trx folding' delle GPx (Figura 13) . Questo residuo è stato dimostrato essere critico per la reattività con la Trx ed altre proteine della superfamiglia delle tioredossine, come la triparedossina: le cosiddette 'redossine' o proteine 'CXXC' (Maiorino et al. 2007).

Le GPx7 e le GPx8 conservano, come tutte le GPxs del regno vivente, gli aminoacidi che compongono tetrade catalitica e che costituiscono la 'firma' della famiglia delle GPxs. Solo le GPx8 portano una sostituzione a livello della Gln della tetrade con un residuo di Ser (Figura 18). Struttralmente quindi possono essere considerate rari, se non unici, esempi di 1CysGPxs monomeriche. Secondo l'analisi filogenetica, queste proteine rappresenterebbero una recente acquisizione suggerendo che la storia evolutiva delle GPxs comporti un ritorno dall'uso di Sec, all'uso di una catalisi basata sulla Cys, come tipicamente si osserva nelle GPx più antiche, le 2CysGPxs (Toppo et al. 2008).

```

XlGPx7 -----
GgGPx7 -----MLDPEGSVEHKPSSSFPKVFLIPLAM 26
HsGPx7 -----MVA 3
MmGPx7 -----MVA 3
HsGPx8 -----MEPLAAYPLKCSGPRAKVFVALLSI 25
MmGPx8 -----MEPFAAYPLKCSGPKAKIFAVLLSM 25
hsGPx4 -----MCASR-- 5
DmPHGPx MSLRQFQNI SRQALRCYSMRRTPGPVLELSRGQRQCLRLCTIMLPVSCAATPMNAISSAA 60

XlGPx7 MYFAALVLLLSLSPSLQKSRDFYTFKVVNIRGKLVSLSEKYRGSVSLVNVVASECGYTDSH 60
GgGPx7 LLAITALLLLAFSATQQKETDFYTFKVVNIRGKLVSLSEKYRGSVSLVNVVASECGFTDSH 86
HsGPx7 ATVAAWLLLWAAACAQQEQDFYDFKAVNIRGKLVSLSEKYRGSVSLVNVVASECGFTDQH 63
MmGPx7 A-VATAWLLLWAAACAQQEQDFYDFKAVNIRGKLVSLSEKYRGSVSLVNVVASECGFTDQN 62
HsGPx8 VLCTVTLFLLQLKFLKPKINSFYAFEVKDAKGRTVSLEKYKGVSLVNVVASECQLTDRN 85
MmGPx8 VLCTVMLFLLQLKFLKPRNTNSFYSEVVDKAGRTVSLEKFKGKASLVNVVASEDCRFDTDKS 85
hsGPx4 -----DDWRCARSMHEFSAKDIDGHMVNLDKYRGFVICVTVNVASQUGKTEVN 52
DmGPx QHSTAAAIDMSANGDYKNAASIEFTVKDTHGNDVSLSEKYKGVSLVNVVNIASKGLTKNN 120
      . : * . : * . * . * : * . . : * . * . * : * . . : * . * . * : * .
XlGPx7 YKALQQLQRDLGSHHFNVLAFFPCNQFGQCEPNSD-REIENFIRKNYSVSFPMFSKTAVTG 119
GgGPx7 YKALQQLQKDLGPYHFNVLAFFPCNQFGQCEPDTN-KEIESFARKTYGASFPMFASKVAVSG 145
HsGPx7 YRALQQLQRDLGPHHFNVLAFFPCNQFGQCEPDSN-KEIESFARTYSVSFPMFSKIAVTG 122
MmGPx7 YRALQQLQRDLGPHHFNVLAFFPCNQFGQCEPDTN-REIENFARTYSVSFPMFSKIAVTG 121
HsGPx8 YLGLKELHKEFGPSHFVLAFFPCNQFGSEPRPS-KEVESFARKNYGVTFFPIFHKIKILG 144
MmGPx8 YQILRELHKEFGPYHFNVLAFFPCNQFGSEPKSS-KEVESFARQNYGVTFFPIFHKIKILG 144
hsGPx4 YTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGQCEPGSN-EEIKEFAAGYNVKF-DMFSKICVNG 110
DmGPx YEKLTDLKEKYGERGLVILNFPNCQFGSQMPEADGEAMVCHLRDSKADIGEVAKVDVNG 180
      * * : * : . : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *
XlGPx7 SGANTAFKYLISSGK-----EPDWNFWKYL VGPDKVVDWAGPTISVAEVRPHVTSLV 173
GgGPx7 AGAIPAFKYLIDSTGE-----EPTWNFWKYL VDPNGKVVKAWDSTVSVVEEIRPHVTELV 199
HsGPx7 TGAHPAFKYLAQTSGK-----EPTWNFWKYL VAPDGKVVGAWDPTVSVVEEVRPQITALV 176
MmGPx7 TGAHPAFKYLTQTSGK-----EPTWNFWKYL VDPDGKVVGAWDPTVPVAEIKPRITEQV 175
HsGPx8 SEGEPAFRFLVDSSKK-----EPRWNFWKYL VNPGEQVVKFWKPEEPIEVIRPDIAALV 198
MmGPx8 PEAEPAFRFIVDSSKK-----EPRWNFWKYL VNPGEQVVKFWRPEEPIEAIRPHVQSMI 198
hsGPx4 DDAHPLWKWMKI QPKGKILGNAIKWNFTKFLIDKNGCVVKRYGPMEEPLVIEKDLPHYF 170
DmGPx DNAAPLYKYLKAKQTG--TLGSGIKWNFTKFLVNKEGVPINRYAPTTDPMDIAKDIEKLL 238
      . . : : : . * * * * : * : * : : . : : .
XlGPx7 RKIILKKKEEL 184
GgGPx7 RKIILKKKDEL 210
HsGPx7 RKLILLKREDL 187
MmGPx7 MKLILLKREDL 186
HsGPx8 RQVIILKKKEDL 209
MmGPx8 GQIILKKKEDL 209
hsGPx4 -----
DmGPx -----

```

Figura 18 - Allineamento multiplo tra DmGPx, HsGPx4 e omologhi delle GPx7 e 8 di varie specie: In questa immagine le sequenze proteiche della GPx di drosfila (esempio di 2CysGPx) e della GPx4 umana (esempio di SecGPx) sono messe a confronto con quelle omologhe di GPx7 e GPx8 (esempi di 1CysGPx) di differenti organismi vertebrati. Dall'allineamento si evince che gli aminoacidi (evidenziati in verde) costituenti la tetrad catalitica - caratteristica tipica della famiglia delle GPxs - sono conservati in tutte le sequenze, eccezion fatta per le sequenze della GPx8 in cui il residuo di Glutamina è sostituito da una Serina (evidenziata in viola).

La presenza di C_p in assenza della C_R nelle 1CysGPxs rappresenta un elemento cruciale. Infatti, per la GPx7 e la GPx8, non può essere ipotizzata ne' la formazione di un il selenio-disolfuro misto, come avviene nelle SecGPx, le vere *glutathione* perossidasi della famiglia (Figura 11), ne' la

formazione il disolfuro intramolecolare, che conferisce specificità per la Trx alle GPx degli invertebrati (Figura 16). Perciò l'esistenza e la specificità di un substrato riducente delle due nuove 1CysGPxs dei vertebrati non può essere predetto.

La funzione fisiologica delle GPx7 e -8 è oggetto di notevole interesse. È stato dimostrato infatti che le cellule epiteliali dell'esofago esprimono quantità di GPx7 relativamente elevate e che l'enzima è frequentemente silenziato attraverso meccanismi epigenetici durante la progressione di patologie come l'esofago di Barrett o l'adenocarcinoma dell'esofago (Peng et al. 2009). Studi *in vitro* hanno poi dimostrato che l'enzima può regolare i livelli intracellulari di ROS che aumentano a seguito del trattamento di cellule di esofago con sali biliari a pH acido e che questo meccanismo regola l'attivazione delle Mitogen-activated protein kinases (MAPK) JNK e p38 (Peng et al. 2011).

La GPx7 è stata inoltre casualmente identificata come il fattore che difende le cellule dallo stress indotto da non-targeting SiRNA, che comporterebbe anch'esso formazione di 'ROS'. È stato osservato che il trattamento di cellule con non-targeting SiRNA induce specificamente l'espressione della GPx7 e non quella di altri geni del reticolo che rispondono allo stress (Wei et al. 2011).

Inaspettatamente, in uno studio recente entrambe le 1CysGPxs sono state descritte come glutathione perossidasi poco attive, capaci però di accettare elettroni dalla proteina disolfuro isomerasi (PDI), suggerendo così che le due proteine possano essere coinvolte nel 'folding' delle proteine, rigenerando la PDI ossidata necessaria per formare nuovi disolfuri (Nguyen et al. 2011).

La reattività delle GPx7 e 8 con la PDI, una 'redossina' della superfamiglia della Trx è davvero inattesa alla luce dei criteri canonici precedentemente definiti (Maiorino et al. 2007), per almeno due motivi 1) l'assenza della CR che conferisce reattività con le proteine CXXC e 2) il fatto che le 2CysGPx dei non vertebrati, che mostrano reattività preferenziale con la Trx, comunque esibiscono attività glutathione perossidasi.

Scopo della Tesi

Poiche' nel lavoro di Nguyen et al. 2011, il saggio di attività PDI perossidasi è stato effettuato in presenza di GSH, precludendo così la possibilità di capire se esista una diretta reattività tra PDI e GPx, in questa tesi abbiamo accuratamente investigato la GPx7 come esempio di 1CysGPx, allo scopo di caratterizzarne i substrati riducenti e la cinetica della reazione. Abbiamo inoltre studiato il possibile ruolo fisiologico.

Lo studio è stato condotto sulla GPx7 di topo ricombinante espressa eterologamente in *E. coli*, ricorrendo ad un artificio che ne ha permesso l'espressione a livelli elevati. Inoltre, abbiamo evitato procedure di purificazione, in modo da minimizzare la altrimenti severa ossidazione/inattivazione del sito attivo.

Lo studio indica che la GPx 7, come praticamente tutte le glutation perossidasi monomeriche, viene ossidata dagli idroperossidi dei fosfolipidi (PCOOH), con una efficienza comparabile a quella delle altre 2CysGPx monomeriche. Inoltre la forma ossidata dal perossido viene ridotta dalla PDI più efficientemente rispetto al GSH.

Per escludere la presenza di una C_R alternativa, è stato mutato l'unico residuo di cisteina (C85A) oltre alla Cys perossidasi presente nella sequenza primaria della GPx7. L'analisi cinetica del mutante ha rivelato un'attività PDI/GSH perossidasi praticamente indistinguibile da quella della forma selvatica. Quindi la GPx7 viene ridotta dalla PDI attraverso un meccanismo diverso rispetto a quello con cui la Trx riduce le 2CysGPx degli invertebrati, che necessita della formazione di un disolfuro intramolecolare. Infatti, la riducibilità della GPx7 da parte PDI/GSH richiede unicamente la C_P, che viene ossidata dal perossido a derivato dell'acido sulfenico.

Ulteriori approfondimenti sulle preferenze di substrato riducente da parte delle glutation perossidasi indicano che la PDI non riduce altre GPx

descritte essere substrati delle Trx, e cioè le 2CysGPx degli invertebrati (ad es. la *DmGPx*, una 2CysGPx di *Drosophila*). La PDI inoltre però non riduce il mutante della Cys resolving di questa proteina (*DmGPxC91K*), una 1CysGpx 'artificiale' simile alla GPx7. Infine, come la Trx, la PDI non riduce la SecGPx4, che contiene solo la selenocisteina perossidasi. D'altra parte la Trx non riduce la GPx7.

Quindi, come si giustifica che certe 'redossine', come la Trx, la triparedossina etc preferiscano, ridurre l'intermedio disolfuro delle GPx (Maiorino et al. 2007; Sztajer et al. 2001) mentre, un'altra 'redossina', la PDI, preferisce la GPx7 che può formare solo un derivato dell'acido sulfenico come intermedio catalitico ossidato? Ragionevolmente più del meccanismo di reazione è importante l'interazione bimolecolare. Una conferma di questa è venuta da studi in surface plasmon renance (SPR) che hanno rivelato che, tra le diverse GPxs, solo la GPx7 possiede una misurabile affinità per la PDI. In conclusione, studi di specificità di substrato hanno permesso di rivedere il 'criterio' secondo cui la riducibilità di una GPx da parte una redossina richiede C_R e quindi formazione di disolfuro. Infatti i nostri dati ottenuti usando la PDI come substrato riducente della GPx7, indicano che il motivo CXXC delle 'redossine' può ridurre sia intermedi ossidati di GPx nella forma di disolfuro o l'acido sulfenico, ma l'affinità della glutation perossidasi per la specifica redossina gioca un ruolo chiave nella scelta dell'intermedio di ossidazione. Pertanto la GPx7 (e probabilmente anche la GPx8), per la loro limitata diffusione in natura, rappresentano eccezioni al 'criterio canonico' precedentemente formulato sulla base della ampia maggioranza dei membri della famiglia, che contengono la C_P assieme alla C_R .

Il cDNA della GPx7 è distribuito in tutti i tessuti umani studiati, suggerendo che l'enzima è ubiquitario nell'uomo e nel topo (Utomo et al. 2004) e la sua estremità N terminale - contenente un peptide segnale- e C terminale -contenente un motivo 'KREDL'- sono importanti per la formazione della proteina matura, correttamente localizzata nel ER.

In cerca di una funzione per la GPx7, non siamo riusciti a mettere in evidenza un ruolo nel 'folding' delle proteine, come la localizzazione nel reticolo endoplasmatico e la capacità di ossidare la PDI potrebbe suggerire. L'analisi del promotore della GPx7 non ha indicato infatti presenza di elementi rilevanti nella risposta allo stress nel reticolo, che sono invece presenti nel promotore delle proteine residenti nell'ER, inclusa la PDI, implicata in questa funzione. Inoltre la sovra-espressione o il silenziamento della GPx7 non ha prodotto un significativo effetto quando l'apoptosi è stata indotta da tunicamicina, che provoca stress del reticolo, come ci si aspetterebbe per una proteina implicata nel 'folding'.

I nostri dati sembrerebbero suggerire invece che la GPx7 sia implicata nel controllo dell'attivazione delle mitogen-activated protein kinases (MAPKs). In particolare, il silenziamento della GPx7 aumenta notevolmente la fosforilazione di ERK 1/2 indotta dal trattamento con fibroblast growth factor (FGF). Questa evidenza suggerisce un ruolo dell'enzima nel controllo dell'attività di recettori tirosin chinasi legati alla proliferazione. A questo proposito, degno di nota è il fatto che il silenziamento della GPx4 non ha alcun effetto su ERK 1/2.

Dai nostri dati in conclusione la GPx7 emerge come un fattore di regolazione di segnali provenienti da fattori di crescita legati alle tirosin chinasi, che opera attraverso un ancora misterioso cross-talk ossidoriduttivo attraverso la membrana del reticolo endoplasmatico,

Viene qui presentato il manoscritto in forma di 'bozza avanzata', che rappresenta il frutto del lavoro effettuato per questa Tesi e che sarà sottoposta per pubblicazione

BIBLIOGRAFIA

- Babior, B.M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 93:1464-1476.
- Babior, B.M. 2004. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 16:42-47.
- Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte. 1973. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation*. 52:741-744.
- Baldrige, C., and R. Gerard. 1933. The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol*. 103:235-236.
- Baldus, S., L. Castro, J.P. Eiserich, and B.A. Freeman. 2001. Is *NO news bad news in acute respiratory distress syndrome? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 163:308-310.
- Beckman, J.S., and W.H. Koppenol. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 271:C1424-1437.
- Calabrese, V., C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, and A.M. Stella. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience*. 8:766-775.
- Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, and P.T. Schumacker. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:11715-11720.
- Claiborne, A., H. Miller, D. Parsonage, and R.P. Ross. 1993. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 7:1483-1490.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M.B. Barrault, J. Vinh, and M.B. Toledano. 2002. A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. 111:471-481.
- Dominici, S., A. Paolicchi, E. Lorenzini, E. Maellaro, M. Comporti, L. Pieri, G. Minotti, and A. Pompella. 2003. Gamma-glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *Biofactors*. 17:187-198.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82:47-95.
- Dunai, Z., P.I. Bauer, and R. Mihalik. 2011. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathology oncology research : POR*. 17:791-800.
- Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, M.S. Noel-Hudson, D. Deme, and A. Virion. 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *The Journal of biological chemistry*. 274:37265-37269.
- Fenton, H. 1876. On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News*. 33:190.
- Flohe, L., W. Gunzler, G. Jung, E. Schaich, and F. Schneider. 1971. [Glutathione peroxidase. II. Substrate specificity and inhibitory effects of substrate analogues]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*. 352:159-169.
- Flohe, L., W.A. Gunzler, and H.H. Schock. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters*. 32:132-134.

- Flohe, L., S. Toppo, G. Cozza, and F. Ursini. 2011. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants & redox signaling*. 15:763-780.
- Forstermann, U., E.I. Closs, J.S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, and H. Kleinert. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 23:1121-1131.
- Forstermann, U., H.H. Schmidt, J.S. Pollock, H. Sheng, J.A. Mitchell, T.D. Warner, M. Nakane, and F. Murad. 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochemical pharmacology*. 42:1849-1857.
- Gerschman, R., D.L. Gilbert, S.W. Nye, P. Dwyer, and W.O. Fenn. 1954. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 119:623-626.
- Gruetter, C.A., B.K. Barry, D.B. McNamara, D.Y. Gruetter, P.J. Kadowitz, and L. Ignarro. 1979. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*. 5:211-224.
- Haber, F., and J. Weiss. 1934. The catalytic decomposition of Hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci*. 147:332-351.
- Halliwell, B., and J.M. Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 219:1-14.
- Hamanaka, R.B., and N.S. Chandel. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 35:505-513.
- Hammond, V.J., and V.B. O'Donnell. 2011. Esterified eicosanoids: Generation, characterization and function. *Biochimica et biophysica acta*.
- Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 92:3007-3017.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11:298-300.
- Hennet, T., C. Richter, and E. Peterhans. 1993. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *The Biochemical journal*. 289 (Pt 2):587-592.
- Imai, H., F. Hirao, T. Sakamoto, K. Sekine, Y. Mizukura, M. Saito, T. Kitamoto, M. Hayasaka, K. Hanaoka, and Y. Nakagawa. 2003. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 305:278-286.
- Jacob, H.S., and J.H. Jandl. 1966. Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. 3. Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. *The Journal of biological chemistry*. 241:4243-4250.
- Jones, S.A., V.B. O'Donnell, J.D. Wood, J.P. Broughton, E.J. Hughes, and O.T. Jones. 1996. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *The American journal of physiology*. 271:H1626-1634.
- Keele, B.B., Jr., J.M. McCord, and I. Fridovich. 1970. Superoxide dismutase from escherichia coli B. A new manganese-containing enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 245:6176-6181.

- Klebanoff, S. 1967. Iodination of bacteria: A bactericidal mechanism. *J. Exp. Med.* 126:1063-1078.
- Klebanoff, S. 1974. Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 249:3724-3728.
- Lowrie, D.B., and V.R. Aber. 1977. Superoxide production by rabbit pulmonary alveolar macrophages. *Life Sci.* 21:1575-1584.
- Maiorino, M., M. Coassin, A. Roveri, and F. Ursini. 1989. Microsomal lipid peroxidation: effect of vitamin E and its functional interaction with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Lipids.* 24:721-726.
- Maiorino, M., A. Roveri, L. Benazzi, V. Bosello, P. Mauri, S. Toppo, S.C. Tosatto, and F. Ursini. 2005. Functional interaction of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein discloses the adjacent cysteine motif as a new substrate of the selenoperoxidase. *The Journal of biological chemistry.* 280:38395-38402.
- Maiorino, M., A. Roveri, M. Coassin, and F. Ursini. 1988. Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51). *Biochemical pharmacology.* 37:2267-2271.
- Maiorino, M., A. Roveri, C. Gregolin, and F. Ursini. 1986. Different effects of Triton X-100, deoxycholate, and fatty acids on the kinetics of glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Archives of biochemistry and biophysics.* 251:600-605.
- Maiorino, M., F. Ursini, V. Bosello, S. Toppo, S.C. Tosatto, P. Mauri, K. Becker, A. Roveri, C. Bulato, L. Benazzi, A. De Palma, and L. Flohe. 2007. The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *Journal of molecular biology.* 365:1033-1046.
- Martin, J.L. 1995. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure.* 3:245-250.
- Mason, R.P. 1986. One- and two-electron oxidation of reduced glutathione by peroxidases. *Advances in experimental medicine and biology.* 197:493-503.
- Mauri, P., L. Benazzi, L. Flohe, M. Maiorino, P.G. Pietta, S. Pilawa, A. Roveri, and F. Ursini. 2003. Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biological chemistry.* 384:575-588.
- McCord, J.M., and I. Fridovich. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry.* 243:5753-5760.
- McCord, J.M., and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry.* 244:6049-6055.
- Mills, G.C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of biological chemistry.* 229:189-197.
- Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs. 1988. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 12:365-372.
- Muller, F.L., Y. Liu, and H. Van Remmen. 2004. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *The Journal of biological chemistry.* 279:49064-49073.

- Nausser, T., and W. Koppenol. 2002. The rare constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: Approaching the diffusion limit. *J. Phys. Chem. A* 106:4984-4986.
- Nguyen, V. D., Saaranen, M. J., Karala, A.-R., Lappi, A.-K., Wang, L., Raykhel, I. B., Alanen, H. I., et al. 2011. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of molecular biology*. 406: 503–515.
- Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327:524-526.
- Peng, D., Belkhir, A., Hu, T., Chaturvedi, R., Asim, M., Wilson, K. T., Zaika, A., et al. 2011. Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2011-301078
- Poderoso, J.J., M.C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, F. Schopfer, and A. Boveris. 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Archives of biochemistry and biophysics*. 328:85-92.
- Radeke, H.H., B. Meier, N. Topley, J. Floge, G.G. Habermehl, and K. Resch. 1990. Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int*. 37:767-775.
- Radi, R., J.S. Beckman, K.M. Bush, and B.A. Freeman. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The Journal of biological chemistry*. 266:4244-4250.
- Richter, C., A. Azzi, U. Weser, and A. Wendel. 1977. Hepatic microsomal dealkylations. Inhibition by a tyrosine-copper (II) complex provided with superoxide dismutase activity. *The Journal of biological chemistry*. 252:5061-5066.
- Rotruck, J.T., A.L. Pope, H.E. Ganther, A.B. Swanson, D.G. Hafeman, and W.G. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179:588-590.
- Rubbo, H., and R. Radi. 2001. Antioxidant Properties of Nitric Oxide. *In Handbook of antioxidants*. E. Cadenas and L. Packer, editors. CRC Press. 689-707.
- Salmeen, A., J.N. Andersen, M.P. Myers, T.C. Meng, J.A. Hinks, N.K. Tonks, and D. Barford. 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*. 423:769-773.
- Scheerer, P., A. Borchert, N. Krauss, H. Wessner, C. Gerth, W. Hohne, and H. Kuhn. 2007. Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry*. 46:9041-9049.
- Schneider, M., H. Forster, A. Boersma, A. Seiler, H. Wehnes, F. Sinowatz, C. Neumuller, M.J. Deutsch, A. Walch, M. Hrabe de Angelis, W. Wurst, F. Ursini, A. Roveri, M. Maleszewski, M. Maiorino, and M. Conrad. 2009. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 23:3233-3242.
- Schnurr, K., J. Belkner, F. Ursini, T. Schewe, and H. Kuhn. 1996. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of

- the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *The Journal of biological chemistry*. 271:4653-4658.
- Schuckelt, R., R. Brigelius-Flohe, M. Maiorino, A. Roveri, J. Reumkens, W. Strassburger, F. Ursini, B. Wolf, and L. Flohe. 1991. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a selenoenzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. *Free radical research communications*. 14:343-361.
- Seiler, A., M. Schneider, H. Forster, S. Roth, E.K. Wirth, C. Culmsee, N. Plesnila, E. Kremmer, O. Radmark, W. Wurst, G.W. Bornkamm, U. Schweizer, and M. Conrad. 2008. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism*. 8:237-248.
- Sittipunt, C., K.P. Steinberg, J.T. Ruzinski, C. Myles, S. Zhu, R.B. Goodman, L.D. Hudson, S. Matalon, and T.R. Martin. 2001. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 163:503-510.
- Spallholz, J.E. 1994. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free radical biology & medicine*. 17:45-64.
- Spear, N., A.G. Estevez, R. Radi, and J.S. Beckman. 1997. Peroxynitrite and cell signaling. In *Oxidative stress and signal transduction*. H.J. Forman and E. Cadenas, editors. Chapman & Hall, New York.
- Sztajer, H., Gamain, B., Aumann, K. D., Slomianny, C., Becker, K., Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. 2001. The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *The Journal of biological chemistry*, 276: 7397–7403.
- Toppo, S., L. Flohe, F. Ursini, S. Vanin, and M. Maiorino. 2009. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et biophysica acta*. 1790:1486-1500.
- Toppo, S., S. Vanin, V. Bosello, and S.C. Tosatto. 2008. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & redox signaling*. 10:1501-1514.
- Tosatto, S.C., V. Bosello, F. Fogolari, P. Mauri, A. Roveri, S. Toppo, L. Flohe, F. Ursini, and M. Maiorino. 2008. The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants & redox signaling*. 10:1515-1526.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552:335-344.
- Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohe, K.D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, and L. Flohe. 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology*. 252:38-53.
- Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*. 839:62-70.
- Ursini, F., M. Maiorino, M. Valente, L. Ferri, and C. Gregolin. 1982. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on

- phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et biophysica acta*. 710:197-211.
- Utomo, A., Jiang, X., Furuta, S., Yun, J., Levin, D. S., Wang, Y.-C. J., Desai, K. V., et al. 2004. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 279: 43522–43529.
- Wei, P.-C., Lo, W.-T., Su, M.-I., Shew, J.-Y., & Lee, W.-H. 2011. Non-targeting siRNA induces NPGPx expression to cooperate with exoribonuclease XRN2 for releasing the stress. *Nucleic Acids Research*. doi:10.1093/nar/gkr714.
- Winterbourn, C.C., and D. Metodiewa. 1999. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free radical biology & medicine*. 27:322-328.
- Yost, F.J., Jr., and I. Fridovich. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*. 248:4905-4908.

Draft del manoscritto da sottomettere a pubblicazione

GPx7 reduces lipid hydroperoxides in the endoplasmic reticulum membrane, accepts electrons either from PDI or GSH and dampens growth factor signaling.

Running title: GPx7 reduces lipid hydroperoxide

Keywords: kinetics, PDI, Redoxin, Selenium

SUMMARY

The canonical mechanism of GPxs entails a Sec or a Cys as the peroxidatic center (U_P or C_P) and, only when the redox center is a C_P , a "resolving Cys" (C_R), forming the disulfide ($C_P - C_R$). This is in turn reduced by proteins of the Trx family. GSH, instead, reduces directly at fast rate only the oxidized form of U_P . The discovery of GPx7 (and the cognate GPx8) containing a C_P but missing the canonical C_R challenges this paradigm. GPx7 is widely distributed in tissues, and is located and retained in ER by its N-terminal signal peptide and C-terminal KREDL motif. On GPx7, expressed in *E. coli* fused with synuclein to overcome a poor expression, steady-state kinetic analysis was carried out using phospholipid hydroperoxides, the typical oxidizing substrate of monomeric GPxs. The C_P is oxidized at fast rate ($k_{+1} = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), whilst the rate of the regeneration of the catalyst by GSH remarkably low ($k'_{+2} = 12.6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), although molecular docking suggests a specific interaction. The oxidized C_P , instead, is more rapidly regenerated by PDI ($k'_{+2} = 3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) but not by Trx. The involvement of a Cys, alternative to the canonical C_R , was positively ruled out. The strength of the GPx7-PDI interaction was quantified by surface plasmon resonance ($K_D = 5.2 \mu\text{M}$). Although this frames GPx7 in the area of protein oxidative folding, no evidence was obtained for a role in the unfolded protein response. Searching for alternative adaptive responses to the expected oxidative stress in ER by GPx7 silencing, we observed an enhancement of ERK 1-2, activation following stimulation by FGF. These data finalize the enzymatic characterization of GPx7 as a non-canonical member of the GPxs family, and foresee a function in the cross talk between the redox status of ER and cytoplasmic growth factor signaling.

Living cells are continuously facing an oxidative challenge brought by hydroperoxides (R-OOH). Hydrogen peroxide, is mainly produced by dismutation of O_2^- generated by electrons escaping the mitochondrial transport chain (1), activity of the NADPH oxidase (Nox) family of enzymes (2-4) or autooxidation of flavoenzymes (5). Cells also produce organic R-OOH, such as fatty acid or phospholipid hydroperoxides (PL-OOH) by lipoxygenase activity (LOX) or non-enzymatic peroxidative chain reactions (6-8).

Hydroperoxides have an impact on redox homeostasis either producing highly reactive free radicals by homo or hetero-lytic cleavage of the O-O bond or directly reacting as electrophiles. These nucleophilic displacement reactions of R-OOH with specific Cys residues in proteins have been recently recognized as a relevant in redox signaling (9-11).

A large body of evidence indicated that H_2O_2 is produced upon cytokine/growth factor signaling (12). Stimulation by insulin, TGF- β 1, VEGF, EGF, FGF PDGF, indeed, activates Nox enzymes to produce H_2O_2 via O_2^- -dismutation (13-19). Moreover, recent evidence indicates that also oxidized phospholipids are produced by receptor/agonist mechanisms and not merely as an undesirable consequence of inflammation (8, 20). However how these pathways are activated, regulated and switched off is far from being clear (1).

The non-heme peroxidases, by reducing R-OOH to redox inactive hydroxyl-derivatives, besides playing a crucial role in antioxidant defense, are among major performers in redox signaling. This class of enzymes includes two non-homolog families, sharing a typical thioredoxin (Trx) fold and a similar mechanism: glutathione peroxidases (GPxs), the latter using either selenium

or sulfur as redox center and peroxiredoxins (Prdxs), which only relies on sulfur (21).

In selenoperoxidases (SecGPxs) selenium is the catalytic moiety incorporated as Selenocysteine (U_P) (22). The members of this subfamily encompass both monomeric and tetrameric members, typically using glutathione (GSH) as electron donor. Kinetics, supported by MS/MS evidence, suggested that selenol, oxidized by R-OOH to selenenic acid derivative, reacts with GSH forming a mixed seleno-disulfide, in turn displaced by a second GSH, eventually producing GSSG and releasing the reduced catalyst (23, 24). Due to sterical hindrance, only the monomeric but not the tetrameric enzymes are competent for reducing hydroperoxide derivatives of complex lipids in membranes.

Prdxs came into stage later (25). They rely on a sulfur redox center usually involving 2 Cys residues (2CysPrdx). Here, the peroxidatic Cys (C_P), oxidized to sulfenic acid derivative by R-OOH, reacts with a second Cys in the same or another subunit, named resolving Cys (C_R), to form an intra- or inter-chain disulfide (21). In Prdxs the disulfide intermediate of the catalytic cycle is efficiently reduced by Trx but not monothiols such as GSH (26).

The presence of an intra-chain disulfide intermediate was also recognized in the catalytic cycle of non-vertebrates and plants GPxs, the recently discovered subfamily of monomeric enzymes containing a C_P (CysGPxs) in place of the U_P of the vertebrate homologs. Similarly to Prdxs, CysGPxs require Trx or Trx-related proteins as reducing substrate, although some activity with GSH is detectable (27). In non-vertebrates and plants CysGPxs the sulfenic acid derivative of C_P forms a disulfide with the C_R , located within a definite stretch of secondary structure, the flexible α_4 helix of the fold (24, 27, 28). Therefore, as the 2CysPrdx, the non-vertebrates and plants CysGPxs are mechanistically '2CysGPxs'. Consistently with the mechanism of the catalytic cycle, mutation of the C_R in 2CysGPxs abolishes the peroxidase activity by Trx, while preserving, or slightly increasing, the low activity on GSH (27). Consistently with the different mechanism, in SecGPxs the C_R residue is constantly missing.

As a whole, available data suggest the general paradigm where the thiol-peroxidases using a C_P to form a disulfide intermediate are in turn rapidly reduced by Trx -or other proteins of the Trx family, the so called 'redoxin'- while the seleno-peroxidases, missing the C_R , efficiently use GSH. This seemingly descends from the peculiar reactivity of selenium. The recent discovery of rare 1CysPrdx and 1CysGPxs challenges the paradigm.

In mammalian cells, two monomeric 1CysGPxs (GPx7 and GPx8) are expressed and have been suggested to be located the endoplasmic reticulum ER (29, 30). Structurally, these enzymes are lacks the canonical intra-chain C_R . Despite this, GPx7 has been reported competent for the oxidation of protein disulfide isomerase (PDI) (30). Since the assay on PDI was carried out in the presence of GSH, thus preventing the precise assessment of the actual capability of GPx to directly oxidize PDI, we addressed the issues of rigorous kinetic analysis to better figure out the enzymology and than a compatible physiological function of GPx7.

Is GPx7 a real GSH peroxidase? Is there an alternative Cys playing the role of canonical C_R ? On what relies the physiological function: oxidation of the thiol substrate or reduction of the hydroperoxide? Is GPx7 involved in oxidative protein folding? Do it play a role in oxidative signaling? These questions emerge as particularly relevant since a cross-talk has been suggested for redox transitions in endoplasmic reticulum (ER) and cytokine signaling (17).

Experimental procedures

Plasmid constructs- The GPx7-overexpressing vector containing wild type human GPx7 (pcDNA3.1/hGPx7^{wt}) was obtained by conventional cloning of the PCR product obtained using a cDNA from human liver tissue (Clontech) as template with the following primers: fw: ATAAGGATCC**GCCACCAT**GGTGGCGGCGACGGTGGCAGCGGCGTG; rev: ATTACTCGAGTTATAAGTCTTCTCGCTTCAGTAGGATGAGCTTCC (restriction site underlined, bold indicates the Kozak sequence), into the BamHI/XhoI site of pcDNA3.1.

The plasmid carrying the deletion of the C-terminal KREDL motif (pcDNA3.1/hGPx7^{wt}DKREDL) of hGPx7, was obtained as above by replacing the rev. primer with: ATTACTCGAGTTACAGTAGGATGAGCTTCCTCACGAGCGCTGTGATCT (restriction site underlined, bold indicates the stop codon).

Similarly, the plasmid carrying insertion of the HA epitope 5' to wild type hGPx7 (pcDNA3.1/HAhGPx7^{wt}) was obtained on the same template by the primers fw.: ATAAGGATCC**GCCACCATGTACCCCTACGACGTCCCGACTACGCAGTGGCGGCGACGGTGGCAGCGG**CGTG; rev.: ATTACTCGAGTTATAAGTCTTCTCGCTTCAGTAGGATGAGCTTCC (restriction site underlined, bold indicates the start ATG and the HA epitope).

The GPx7 overexpression vector containing mouse GPx7 (*MmGPx7*) (accession number NM_024198) fused to human Synuclein (pRSET/SynGPx7), used for kinetic analysis, was obtained by conventional cloning of the PCR product obtained using a cDNA from mouse liver tissue using the following primers fw: GCGGATCCCAATCCGAGCAGGACTTCTACG; rev: GTGGAATCCACAAGTCTTTCGTTTCCGAAG. After digestion, the PCR product was cloned in the BamHI and EcoRI sites of the plasmid pSynA, prepared as described below. The product of this vector is SynGPx7. The pRSET plasmid encoding for human alpha-synuclein (pSynA) has been described (31). A modified nucleotide sequence without the inner restriction sites *BamHI* and *EcoRI* encoding the same protein sequence was obtained by site-directed mutagenesis. The stop codon was replaced by a nucleotide linker sequence encoding for a thrombin cleavage site (ASLVPRGS amino acids) and by nucleotide sequence containing the restriction sites *BamHI* and *EcoRI* in order to make the fusion vector pSynA encoding for GPx7 (pSynA/SynGPx7).

SynGPx7 was mutated at the residue Cys 85 of the *MmGPx7* sequence to yield SynGPx7^{C85A} by PCR, using pRSET/SynGPx7 as template and iProof High Fidelity Polymerase turbo (BioRad) using the following primers (changed codons in italics): fw: TAATGTGCTTGCCTTCCCTGCCAACAGTTTGGCCAACAGG; rev: CCTGTTGGCCAACTGGTTGGCAGGGAAGGCAAGCACATTA.

HsPDI was obtained by cloning in the multicloning site (BamHI/KpnI) of the pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany) the PCR product obtained from human cDNA by the primers fw:5'-ATAAGGATCCGACGCCCCCGAGGAGGAGGAC-3' rev: 5'-ATTAGGTACCTTACAGTTCATCTTTCACAGCT-3' (NCBI Reference Sequence: NP_000909.2), which yielded the plasmid pQE30/*HsPDI*. Correctness of constructs was verified by sequencing.

RT-PCR analysis-Detection of GPx7 in human tissues was performed by PCR using a commercially available cDNA panel (Clontech panel human 1) as template. Primers were the following: fw: ACTGGTGTGCTGGAGAAGT rev: GTCTGGCCAGGTACTIONTAA. 1 ng of cDNA was used for PCR and 40 cycles were applied at the annealing temperature of 58°C

Cell culture, overexpression and siRNA experiments – MDA 231/HEK 293T were maintained in a humidified atmosphere of 95% O₂ / 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine and antibiotics.

For overexpression, HEK 293T cells, seeded in 6 well plates, were transfected with the indicated plasmids using the *TransIT* -LT1 transfection Reagent (Mirus) on cells at 70% confluence, as indicated by the manufacturer. Typically 1 µg of plasmid per well were used and cells were used for experiment 24 hr later. Cells were collected by lysis buffer (0.1 M Tris-HCl,

0.15 M NaCl, 10% Glycerol, 1mM EDTA 1% Triton, pH 7.4 containing proteases inhibitors) and immunoblotted.

MDA 231 cells were used for siRNA experiments, using lipofectamine (Gibco) as transfection reagent, according to the manufacturer's instruction.. Two different sets of primers were used for silencing GPx7 or GPx4. GPx7siRNA fw 1: AAGUACCGGCCAGACUUCU , rev 1: AGAAGUCUGGGCCAGGUACUU (29)-ERROR; fw 2: CCCACCACUUUAACGUGCUGCCUU, rev 2: AAGGCGAGCACGUUAAAGUGGUGGG; GPx4siRNA fw 1: CCUCCCAGUGAGGCAAGAC, rev 1: GUCUUGCCUCACUGGGAGG (32)-ERROR; fw 2: GGCACAUGGUUAACCUGGACAAGUA, rev. 2: UACUUGUCCAGGUUAACCAUGUGCC.. Control cells were transfected with siRNA scramble (Dharmacon, Lafayette, CO) fw: UAGCGACUAAACACAUCAAUU, rev: AAUUGAUGUGUUAGUCGCUA. Silencing was verified by RT-PCR. After transfection, cells were incubated serum -free for 24 hr to 72 hours before treatment with fibroblast growth factor (FGF) (Sigma-Aldrich), for 10 minutes. Cells were collected in lysis buffer and immunoblotted.

Heterologous expression, preparation of the bacterial extract and quantification of recombinant enzymes -For production of recombinant SynGPx7 or SynGPx7^{C85A}, competent BL21 (DE3) pLysS *E. coli* cells, which allows high-efficiency protein expression of genes under the control of a T7 promoter, were transformed with the vector pSynA/SynGPx7. Expression was induced by adding 1mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and cells were harvested after 3 hr by centrifugation at 5,000 x g for 30 min. The pellet was stored at -20°C for no longer than one week or immediately lysed. For lysis, bacterial pellets obtained from one liter of culture were resuspended in 30 ml of cold lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 5% Nonidet, 0.15 M KCl, 0.1% Triton X-100, 3mM GSH containing protease inhibitors (0.1 mg / ml PMSF, 0.7 mg / ml pepstatin, 0.5 mg / ml leupeptin) for 15 min at 4°C, under slow agitation. After centrifugation at 29,000 x g for 30 min at 4°C, the supernatant was immediately used as enzyme source for activity/kinetic analysis. Protein was quantified by the Bradford assay (32).

Quantitation of SynGPx7 or SynGPx7^{C85A} within the 29,000 x g supernatant of bacterial lysate was obtained by western blotting (see below), using known amounts of purified SynGPx7 for the standard curve and polyclonal antibody to human GPx7 from Abnova (Germany). For this purpose, the bacterial extract expressing SynGPx7 was purified by nickel affinity chromatography (Ni-NTA, Qiagen), followed by a Superdex 75 column (26 mm x 620 mm) as described (27). This procedure yielded an inactive peroxidase. A calibration curve was obtained from the digital read-out of western blot spots.

Human recombinant PDI was obtained as indicated above, after transformation of the *E. coli* JM 109 strain with the PQE30/HsPDI construct. Bacterial pellets obtained from one liter of culture were suspended in 60 ml of cold B-Per extraction reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) containing 0.1 mg/ml PMSF, 0.7 mg/ml pepstatin, 0.5 mg/ml leupeptin, and stirred for 10 min on ice to obtain cell lysis. After centrifugation (20,000 x g, 30 min), the supernatant was diluted 1:1 (v/v) with 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2% (v/v) Triton X-100 (pH 7.4), purified by Ni-NTA chromatography and size exclusion chromatography as described (27), and concentrated. Protein content was quantified as above (32).

Western Blotting- Western blotting was performed as previously described (33) and revealed using horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody and a freshly prepared luminol solution (1.1 mM luminol, 1 mM 4-jodophenol, 0.12% BSA, 1.4 M H₂O₂, 0.025 mM Tris-HCl pH 9.25). Densitometric analysis of immunoblots was obtained by the Kodak Image Station 440.

Glutathione peroxidase activity assay and kinetic analysis.- The coupled assay for glutathione peroxidases was used for activity measurements and kinetic analysis, by a single-beam Beckman DU70 spectrophotometer. Before the assay, the buffer of the bacterial lysate expressing SynGPx7/Syn/SynGPx7^{C85A} was exchanged with the assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.6; 5 mM EDTA 1 mM NaN₃, 0.1 % Triton X-100) by NAP-5 column chromatography, (GE

healthcare), repeated twice. An appropriate amount of GSH was then added together with 0.15-0.3 mM NADPH and 3 U/ml glutathione reductase and volume adjusted to 2.5 ml with the assay buffer. Reaction started by 20-25 μ M, phosphatidyl- choline hydroperoxide (PC-OOH). Reaction was recorded until complete consumption of substrate. PC-OOH was prepared and quantitated as described (34).

Thioredoxin (Trx) peroxidase activity was determined as above by replacing GSH with 5.0 μ M human Trx and glutathione reductase with non limiting amount of plasmodium falciparum *PfTrxR* prepared as described (27). *DmGPx* used in place of the transformed bacterial lysate containing SynGPx7, served as positive control of the assay (27).

For protein disulfide isomerase (PDI) peroxidase activity, 10 μ M human recombinant PDI was used (see below) and glutathione reductase with non-limiting amount of bovine thioredoxin reductase (*BtTrxR*) (Sigma-Aldrich) (35). An extinction coefficient of 6,220 $M^{-1} cm^{-1}$ was used for calculations.

Trx or PDI concentration was calculated spectrophotometrically, by titrating the total amount of NADPH oxidized following a definite amount of redoxin addition. One mol of Trx contains one CXXC center, thus 1 mol of NADPH reduces 1 mol of oxidized Trx. One mol of PDI contains two CXXC centers, thus 2 mol of NADPH reduces 1 mol of oxidized PDI.

Kinetic analysis was carried out by analyzing the single progression curve of NADPH oxidation, as reported (36, 37). Briefly, the digitalized absorbance data vs. time, produced by the spectrophotometer, were transferred to an Excel sheet and used to evaluate the substrate concentration and the reaction rate at each time interval (typically from 1 to 3 min). The reaction rate was corrected for the unspecific GSH/PDI oxidation. Non-specific PCOOH reduction in the absence of cell extract was negligible and thus not considered. The data obtained were analyzed as described by Dalziel for reaction with two substrates (38). The Φ_1 and Φ_2 parameters describing the kinetic of GPxs (eqn. (1), see below), were obtained by a Lineweaver and Burk plot, in which the reciprocal velocities were multiplied by enzyme molarity (38) (36, 37), as the slope and the intercept respectively. In this primary plot, Φ_1 represents the reciprocal value of the rate constant for the first enzyme oxidation reaction and Φ_2 represents the reciprocal value of the sum of the rate constants of the two reducing half reactions (see also Figure 8). The kinetic coefficient Φ_0 , which is equivalent to the reciprocal of the maximum turnover number, was not calculated.

MS spectrometry experiments and data analysis – Pooled fractions obtained from NiNTA purified SynGPx7, 25 mM N-ethyl maleimide (NEM) was added and incubated for 30 min. Sample was then subjected to multiple acidic precipitation with 0.01 % (w/v) sodium deoxycholate (DOC) and 6 % (v/v) trichloroacetic acid (TCA). Tryptic digestion of ethanol washed sample pellets was performed overnight at 37 °C in the presence of 40mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.0, containing 1 mM EDTA, with a protease to protein ratio of 1:50. After stopping digestion by formic acid acidification, samples were dried by vacuum centrifugation and resuspended in 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution for MS analysis. Peptides mix from each digested sample were separated before ionization by reverse phase chromatography on a 1200 Rapid Resolution system equipped with a nanofluidic chip directly interfaced with a nanoESI source from the 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Separation was achieved by a 3% to 70% acetonitrile gradient onto a c18 Zorbax capillary column at a flow of 300 nL/min. MS acquisition was performed from 350 to 2400 m/z at a scan rate of 2 spectra/second, while MS/MS analysis was performed from 59 to 3000 m/z at the same scan rate in a data-dependent way on the four most abundant precursor in each MS scan. Collision Induced Dissociation (CID) was used for selected precursor ion fragmentation given a function for collision energy of 3.7 V/(100 Da) with an offset of 2.5V. Obtained MS and MS/MS data were processed by the MassHunter Workstation – Qualitative Analysis (B.02.00) suite (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Suitable custom database was developed for use with Mascot release 2.3 (www.matrixscience.com) merging the entire bacterial proteome with sequence from GPx7 fusion construct. Tolerance of ± 5 ppm and ± 0.05

Da was considered respectively for precursor and fragment ions database matching. Cysteine containing identified peptides from GPx7 were compared using in house tuned LabKey Server v11.2.

Molecular modeling- Human GPx7 structure was retrieved from the PDB (PDB code: 2P31) and processed in order to remove water molecules. Hydrogen atoms were added using standard geometries to the protein structure by the MOE program (39). To minimize contacts between hydrogen's, the structures were subjected to Amber99 force field minimization until the *rms* of conjugate gradient was $<0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ keeping the heavy atoms fixed at their crystallographic positions (39). GSH structure was built using MOE-builder tool, part of the MOE suite (39) and were subjected to MMFF94x energy minimization until the *rms* of conjugate gradient was $0.05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$. Charges were calculated using ESP methodology. Three different programs have been used: MOE-Dock (39), GOLD (40) and Glide (41). The estimated association constant (pK), was calculated using MOE suite, expressed as the summation of a directional hydrogen-bonding term (direct bonds, water-mediated, transition metal contacts), a directional hydrophobic interaction term, and an entropic term. The center of the docking box or of the docking sphere was set at Cys 57 with a radius of 12 \AA .

Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the GPx/PDI interaction- For surface plasmon resonance analysis SynGPx7 was purified and digested by thrombin to obtain pure *MmGPx7*, lacking the synuclein fusion. To this end, SynGPx7 was purified by Ni-NTA (27) and further digested by thrombin, to cleave off synuclein. and further purified to remove it, a procedure that yielded homogeneous *MmGPx7*. Digestion was carried out by incubating overnight at room temperature the digestion mixture obtained after exchanging protein buffer into 20 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM MgCl₂, and adding 10 units of thrombin (Sigma) per mg of protein. Reaction was then stopped by adding protease inhibitors and the cleaved protein was recovered. Purified GPx of *Drosophila melanogaster*, *DmGPx^{wt}*, or its C_R mutant *DmGPx^{C91K}* (27) were subjected to SPR analysis to quantify the kinetic constants for PDI binding, by a Biacore T100 biosensor system (BIAcore, Uppsala Sweden). To this end, purified PDI was bound to the sensor surface (CM5 sensor chip) utilizing the reaction between amino groups and the carboxyl groups of the sensor chip: following the activation of the latter with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/*N*-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) (0.2/0.05M), a 10 $\mu\text{l/min}$ constant flux of PDI (30 $\mu\text{g/mL}$ in 10mM acetate at pH 4.0) was injected in the flow cell, until the immobilization level of 600 RU was reached. Ethanolamine (1M, pH 8.5) was used for the deactivation of excess reactive carboxyl groups. For blank subtraction, the reference flow cell was activated with EDC/NHS and then deactivated with ethanolamine. Before proceeding with protein-protein interaction experiment, the PDI modified sensor chip was equilibrated with the running buffer HBS-EP+ (10 mM Hepes pH7.4, 150mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % Biacore surfactant P20) at flow rate of 30 $\mu\text{L/min}$. In addition, 30 $\mu\text{L/min}$ of 50 mM DTT was injected 10 min before each daily experiments set. Kinetics analysis of the binding was performed by successive injections of different concentrations of each purified enzyme (ranging 0.10-40 μM), diluted in HBS-EP+. Regeneration of the sensor chip after each binding events was obtained with 0.1% SDS.

Results

GPx7 is widely expressed human tissues –GPx7 cDNA is widely distributed in all human tissues tested (Figure 1). Specific primers detected a band at the expected molecular weight in all the tissues investigated, including liver, where, in the mouse, it has not been previously detected (29). From the rather high number of PCR cycles to obtain a detectable band, GPx7 expression in human tissues may be rated as quite low.

The N-terminal signal peptide and C-terminal KREDL motif address GPx7 to ER–Primary structure of GPx7 of different species, aligned with that of homologous monomeric GPxs (Figure 2) reveals, besides the absence of the tetramerization interface and the presence of the C_P in the expected position, the absence of the canonical C_R. GPx7 also contains the canonical N-terminal signal peptide and a C-terminal KREDL, homologous to the canonical signal for proteins resident in the luminal ER. Since ER is an unusual location for a vertebrate GPxs and GPx7 was originally described as a cytosolic protein (29), we investigated whether both the signal peptide predicted by the Signal P v3 program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and the (K)REDL motif of GPx7 -which does not completely match that annotated in Prosite ([KRHQSA]-[DENQ]-E-L)- are functional in mammalian cells. To validate the function of the signal peptide, a construct carrying an HA epitope at the 5' end of HsGPx7 (HAHsGPx7^{wt}) was used, and the expressed protein analyzed by immunoblotting, using antibodies to HA and GPx7 (Fig 3A). Antibodies against GPx7 decorated two bands -one corresponding to the MW of mature GPx7 and the other at higher molecular weight-. Antibodies against HA, instead, decorated only the high MW band. This positively demonstrated that the N-terminal signal peptide is processed during maturation of the protein.

Next, we evaluated whether the C-terminal KREDL motif is functionally relevant for retention in ER. Cells were transfected with an expression construct expressing HsGPx7^{wt} or harboring a stop codon in place of the C terminal motif 'KREDL' (HsGPx7^{wt}ΔKREDL). Western blot analysis of cell lysates and medium revealed that only the cells transfected with the WT construct fully retain the protein, while those transfected with the construct lacking the 'KREDL' secrete the protein (Fig 3B).

Thus, GPx7 KREDL is functional to retain the protein in the ER.

Heterologous expression of GPx7- Kinetic analysis of the reaction of GPx7 requires an amount of protein that can be obtained only by heterologous expression. However, the expression of GPx7 in *E. coli* by the usual pQE30 expression system is extremely low. To overcome this limit, we expressed GPx7 as a fusion protein with synuclein (Syn), an expedient already adopted in our laboratory to prepare otherwise poorly expressed proteins. Human Syn was fused with the C terminus of mouse GPx7, lacking the signal peptide (Figure 4A) by the pSynA expression vector, which produces C terminal His-tagged proteins (pSynA/SynGPx7). This strategy led to the required high yield of SynGPx7 expression that by far resulted the most abundant protein in the bacterial extract (Figure 4B). This preparation showed a clearly measurable GSH peroxidase activity.

However, the purification by Ni-NTA affinity chromatography, despite the optimal yield, caused an irreversible massive loss of enzymatic activity. The most likely hypothesis of an oxidative inactivation of the active site was tested by MS/MS analysis. Following affinity chromatography, the molecular weight of the C_P increased by 32 or 48 a.m.u, (Figure 5) probing the artifactual oxidation of C_P to sulfinic and sulfonic acid derivative. The oxidative lability of C_P also in the presence of reducing compounds such as mercaptoethanol or GSH discouraged from trying other chromatographic approaches, while the high expression level was compatible with a kinetic analysis carried out on freshly prepared 29,000 x g supernatant of the bacterial extract.

Kinetics of GSH peroxidase activity of GPx7- Since as the other monomeric GPxs, GPx7 reduces phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) (Figure 6), this substrate was used for kinetic

studies. This approach was validated by the absence of any peroxidase activity on PC-OOH in the extract of bacteria transformed with the control plasmid expressing only synuclein. This is not the case when the hydroperoxide substrate is H₂O₂, for the reduction of which SynGPx7 competes with both GSH-dependent and GSH-independent activities present in the extract (not shown). The concentration of SynGPx7 required for computing rate constants and kinetic parameters was calculated by quantitative Western blotting using as standard the homogeneous but inactive Ni-NTA purified SynGPx7.

The steady-state kinetics was analyzed as previously reported (37, 42), using data of reaction rate and hydroperoxide concentration calculated from digitalized read-out at defined time intervals along each trace of the spectrophotometric test. Consistently with the canonical ping-pong mechanism of GPxs, the Lineweaver-Burk plots, obtained at different concentration of GSH, produced parallel regression lines of the same slope, confirming that also SynGPx7 follows the enzyme substitution kinetic mechanism (Scheme 1).

For double substrate reactions this mechanism is described by the simple version of the Dalziel equation (38), which, for GPxs, can be written as follows:

$$E/v_o = \Phi_0 + \Phi_1/ROOH + \Phi_2/GSH \quad (1)$$

Where Φ_1 and Φ_2 are equivalent to the reciprocal second order rate constants of the enzyme oxidation and reduction respectively (Fig. 8). Φ_0 is equivalent to the reciprocal of maximum rate with unit of enzyme concentration, i.e. the reciprocal of the maximum turnover number (37, 38). Since Φ_0 is 0 in the majority of GPxs so far studied, in agreement with a non-saturation kinetics where substrate transformation is faster than enzyme substrate interaction, in this study we used a direct computational approach to give an account for the interaction between enzyme and GSH.

Specific activity, kinetic coefficients and apparent rate constants are reported in Table I.

The active site of the enzyme is oxidized by PC-OOH and the rate constant ($k_{+1}=9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) is in the low range of that measured for other CysGPxs (24), approximately three orders of magnitude faster than the oxidation of a thiolate by a hydroperoxide (43). The rate constant for the reductive steps, instead, is low ($k'_{+2}=12.6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$), again in agreement with that calculated for the reductive step of the Cys mutant of GPx4 and *DmGPx*^{C91K} missing the C_R, which are artificial 1CysGPx (37). This rate is in the range of the non-enzymatic thiol disulfide exchange reaction (44)

Molecular docking of GSH to GPx7—The low rate constant for the reductive part of the peroxidatic cycle, actually depends on two forthcoming reactions that are not separated by the steady-state analysis: the formation of the intermediate disulfide between the enzyme and GSH, and the exchange reaction when the second GSH forms the disulphide and releases GSSG. On the light of the slow rate of reductive part of the cycle, we questioned whether GSH is a “real” GPx7 substrate. This issue was addressed by a computational analysis the interaction of GSH to GPx7 in comparison with known GPxs. The molecular docking pose for the complex GSH-GPx7 indicated that GSH is bound in a similar way shown for GPx1 and GPx4 and that the strength of the interaction is even stronger (Figure 7) (21). In the case of GPx7, the electrostatic network between GSH negative charges and Arg 180/Arg 52 (GPx1 human numbering), Lys 135/Lys 148 (GPx4 human numbering), are replaced by the interactions with His 63 and Thr 162 and a relevant hydrophobic network (with Pro 161, and in particular with Phe 59) give an important contribution to the complex stabilization. The associated constant values (pK) of GSH indicate that the complex with GPx7 is even more stable than with GPx1 and GPx4. The hydrophobic term (hyd) contribution in the associated constant appearing critical for binding strength.

All together kinetic and docking data indicate that GSH is a true substrate of GPx7 even though the rate of the overall peroxidatic reaction is limited by the slow final thiol-disulfide exchange reaction.

Kinetics of the oxidation of PDI catalyzed by SynGPx7 -The oxidation of PDI by GPx7 has been already observed in the presence of GSH (30), thus precluding a clear definition of precise kinetic constants. Moreover, such an activity is in overt contrast with the canonical mechanism of CysGPxs, requiring a C_R for been reduced by a redoxin (27). The kinetics of the peroxidatic reaction on PDI as reducing substrate has been analyzed using bovine TrxR (35) as non rate-limiting, ancillary enzyme. For comparison, Trx as reducing substrate was also tested, using non rate-limiting Plasmodium falciparum TrxR to track Trx oxidation rate (27).

Activity was measurable in the presence of PDI but not Trx. (Table II), and kinetic analysis of the peroxidase reaction showed that SynGPx7 was reduced by PDI orders of magnitude faster than by GSH ($k'_{+2} = 3.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Peroxidatic cycle of SynGPx7 does not involve a C_R - The absence of a canonical C_R in GPx7, despite the reduction of the active site by a redoxin, suggested to screen whether a different Cys residue could substitute for it. Besides C_P, the only Cys present in *MmGPx7* is Cys 85, which lies within the GPxs strictly conserved motif PCNQF. The Cys85/Ala substitution (SynGPx7^{Ala85}) failed to affect activity and kinetics of the peroxidatic reaction, irrespective the reducing substrate was GSH or PDI (Table II).

This evidence definitely rules out the formation of a non-canonical disulfide and conclusively support the notion that SynGPx7 catalyzes a catalytic cycle involving the C_P only, even though the reducing substrate is a redoxin attacking oxidized C_P and not C_R of the C_P-C_R disulfide as expected.

Oxidation of PDI is peculiar to GPx7 among monomeric GPxs - The notion that the catalytic cycle of GPx7 does not include the formation of a C_P - C_R disulfide during the catalytic cycle, prompted us to address the question whether the other monomeric GPxs, whose catalysis does not rely on disulfide, might accept PDI as reductant. To this end, Selenium-containing GPx4, the Cys 91 mutant of *DmGPx* (*DmGPx*^{C91K}), an artificial 1CysGPx, were analyzed. Native *DmGPx*^{wt}, a typical 2CysGPx was also analyzed for comparison. None of these enzymes, reducing PC-OOH in the presence of GSH, exhibited any PDI peroxidase activity (Table III).

Thus, among monomeric GPxs, oxidation of PDI emerges as a specific feature of GPx7.

Kinetic constants of the interaction between GPx7 and PDI - The interaction between mouse GPx7 and PDI was studied by Surface Plasmon Resonance (SPR) (Figure 8). The experimental data could be successfully fitted with a 1:1 binding model and the average values of the kinetic constants of binding could be correctly measured: $k_a = 346 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_d = 0.0018 \text{ s}^{-1}$, $K_D = 5.2 \text{ }\mu\text{M}$ (being $K_D = k_d/k_a$). The observed weak, seemingly aspecific, interaction between PDI and other peroxidases (*DmGPx*^{wt}, its C_R mutant *DmGPx*^{C91K} and GPx4) did not permit any meaningful evaluation of the interaction constants.

GPx7 and oxidative protein folding within ER- The location in the ER and the oxidation of PDI, are both suggestive of a GPx7 function in oxidative folding of proteins, as previously suggested (30). A further support to this hypothesis was searched by screening the GPx7 promoter for cis-acting elements related to the unfolded protein response (UPR) and by evaluating the effect of either silencing or overexpressing GPx7 on apoptosis induced by tunicamycin. Neither of these approaches produced a positive evidence that GPx7 is involved in the adaptive UPR.

GPx7 increases extracellular-signal related kinases 1- 2 (ERK 1-2) phosphorylation induced by FGF- Besides UPR, the adaptive response to ER stress is recognized to activate the mitogen activated kinase (MAP) pathway. This pathway, indeed, besides transducing the proliferative signal of growth factors counteracts apoptotic signals such as those arising from ER stress. The investigation about the involvement of GPx7 in the area of proliferative signaling was also inspired by the notion that the gene is found hyper-methylated or under-expressed in some types of pre cancerous lesion or cancer respectively (29, 45) .

Silencing of GPx7 by SiRNA transfection strongly increased the ERK 1-2 phosphorylation in MDA 231 cells when stimulated by fibroblast growth factor (FGF). Notably silencing of the cytosolic/mitochondrial GPx4, by far much more active than GPx7 as peroxidase, had no effect (Figure 9). This indicates that, despite low expression and specific activities, GPx7 within the ER communicate with growth factor signaling in cytosol.

Discussion

GPx7 is widely expressed in human tissues where it is located and retained in the ER by the NH₂-terminal signal sequence and the COOH-terminal KREDL motif.

For kinetic analysis of GPx7 activity we used a bacterial extract freshly prepared, expressing at high yield *Mm*GPx7 as a chimeric protein containing human synuclein (SynGPx7). The high yield of expression also gave the advantage of escaping the severe oxidative inactivation of the enzyme during affinity purification. The PC-OOH used as oxidizing substrate provided the required specificity of the reaction since there is not any peroxidase activity on PC-OOH bacterial lysate not expressing the enzyme, and thus the measured activity could be unequivocally ascribed to GPx7 only.

In the active site, highly conserved among GPxs, the oxidation of the C_P by PC-OOH ($k_{+1} = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) in the low range of other CysGPxs (24, 43), orders of magnitude faster than the non enzymatic oxidation of a thiolate (43). As suggested for other GPxs, a proton shuffling in the active site facilitates deprotonation of the chalcogen and protonation of the anionic leaving group (RO⁻) on which the catalytic efficiency stands. Notably, this mechanism of oxidation of the active site is shared by all GPxs, irrespective the presence of selenium or sulfur as redox moiety (24).

As the other monomeric GPxs, GPx7 catalyzes the reduction of phospholipid hydroperoxides, a reaction forbidden by steric hindrance in the tetrameric members of the family (46). It is therefore conceivable that the peroxidase activity in membranes could be of critical relevance for deciphering the physiological function of the monomeric enzymes of vertebrates. Reverse genetics in fact show that only the monomeric GPx4 is a vital enzyme due to the peculiar peroxidase activity on phospholipid hydroperoxides (47).

GPx7 binds GSH and uses it as reducing substrate, and thus it must be rated as a true 'GSH' peroxidase (Table I and Figure 9). The kinetics is similar to that of the artificial mutant U_P/C_P of GPx4 where the specific activity is deeply limited by reductive part of the catalytic cycle, regenerating the catalyst, where the two forthcoming reactions are not resolved by steady-state kinetic analysis. Nevertheless, the reduction of the mixed disulfide intermediate of the catalytic cycle by GSH is seemingly the rate limiting. This reaction is very fast, instead, when the redox center is a selenol or when a Trx reduces the C_P-C_R disulfide (37). Although the slow turnover, GSH binds GPx7 in a similar way as GPx1 and GPx4 (21) and a strong hydrophobic network, not present in the other GPxs, (with Pro 161, and in particular with Phe 59) gives an important contribution to the complex stabilization, by increasing the associated constant value.

Searching for an alternative substrate to GSH, we confirmed by steady-state kinetic analysis that PDI is competent for reducing the active site of GPx7 (Table II). At a first glance this was somehow atypical since GPx7 does not contain the C_R partner of the C_P as the 2CysGPxs do (27). The formation of an intra-chain C_P-C_R disulfide was indeed considered an indispensable step for a CysGPx being reduced by a redoxin, specifically attacking the C_R. In these enzymes the rate constant for the reductive part of the catalytic cycle is usually around $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Thus, GPx7, as most likely also the cognate GPx8, does not obey to the canonic requirement of the formation of an intra-chain disulfide for being reduced by a protein of the thioredoxin family. Also the option that a non-canonical Cys could substitute for the missing C_R was positively ruled out by mutagenesis of the sole non catalytic Cys present in GPx7 (Table II).

Therefore the rule that dictates that the N-terminal Cys of the CXXC motif of the redoxin can only attach the C_R of the disulfide in the peroxidase is not so strict. In fact PDI directly reacts with the oxidized C_P of the peroxidase to form a mixed disulfide intermediate that rearranges leading to disulfide of PDI. On the other hand, the absence of a reactive C_R on the peroxidase is expected to favor, instead, the oxidation of PDI since the C-terminal Cys of the CGHC motif is a poor nucleophile and thus the formation of the disulfide on the peroxidase would compete with the oxidation of PDI (48).

In conclusion therefore, the canonic mechanism by which a C_R is required for being reduced by a redoxin does not apply to GPx7 (and probably also to -8), which indeed work by a one-Cys mechanism. Indeed these enzymes are rare exceptions within the glutathione peroxidase family, the majority of which is composed of non-vertebrates 2CysGPx reacting with Trx.

The proximity of the two Cys residues in the redoxin motif is the most obvious reason of the increase of the rate of thiol disulfide reaction in respect of GSH. Nonetheless, the specificity of the protein-protein interaction is relevant as well. GPx7, in fact, does not react with Trx, the most common physiological reductant of protein disulfides and typical substrate of 2CysGPxs. Finally PDI does not react with other monomeric peroxidases (Table III). The affinity constant of GPx7 and PDI measured by SPR confirms the specificity of the protein-protein interaction.

The difference in rate constant for the reduction of the enzyme by GSH or PDI argues for a function of GPx7 in oxidizing PDI. However, the difference in oxidation rate between GSH and PDI is balanced by the difference in concentration between these substrates. This, as the actual affinity of GPx7 for GSH, might suggest that under physiological conditions GSH concentration must control PDI oxidation rate by GPx7.

The oxidation of PDI frames the function of GPx7 in the area of oxidative folding of proteins, as previously proposed (30). However, the GPx7 promoter does not contain any *cis*-acting element related to the unfolded protein response (UPR) and silencing or overexpressing the enzyme does not affect apoptosis induced by tunicamycin.

The ER stress, however, activates besides UPR, the MEK/ERK pathway as an adaptive response (49). This is a survival mechanism activated to counteract the ER stress induced apoptosis. To test the impact of GPx7 on this pathway we tested effect of GPx7 silencing on ERK phosphorylation and we observed an increased phosphorylation following a stimulus with fibroblast growth factor.

This information bring again to the focus the challenging question whether the physiological function of GPx7 is oxidizing thiols or reducing hydroperoxides, or, even more specifically, lipid hydroperoxides in membranes. Although the question is still open a new concept is emerging of a possible cross talk between proliferative signaling and ER redox status.

Since it seems reasonable to assume that silencing of GPx7 increases the hydroperoxide tone of the ER (50), and this rises at the intriguing question about the mechanism the transfer of an oxidative signal through the membrane required to activate ERK.

Granted that GPx7 is active on PL-OOH and its silencing enhances ERK phosphorylation in cytosol, while focusing a possible function of PL-OOH in the cross-talk between oxidants in the ER and MAP kinases pathway, we must also consider that: a) ERK is activated by hydroperoxides (8, 17); c) a 15 Lipoxygenase produces signaling PL-OOH in the ER (51); d) PL-OOH promote flip-flopping of phospholipid in membranes (52).

Although such a function of GPx7 in controlling a transmembrane redox signaling is so far no more than a challenging hypothesis to be specifically addressed in the future, the available evidence supports the hypothesis and contributes to stimulate the interest on this intriguing enzyme and phospholipid hydroperoxides as relevant players of redox signaling.

Figure legends

FIGURE 1. Expression of GPx7 in human tissues. Representative PCR analysis of a panel of cDNAs from human tissues.

FIGURE 2. Alignment of different GPx7 homologues with other GPxs. Human GPx1 and 4 have been taken as examples for SecGPxs, *Drosophila melanogaster* GPx and yeast GPx3 for 2CysGPxs. The peroxidatic center of GPxs (either Cys or Sec) is indicated by an arrow. The 'Cys block' within the α_4 helix of the dimer interface, where the C_R is usually located in the 2CysGPxs, is indicated. Note that and this residue can be identified in *DmGPx* and yeast GPx3 sequence only. The signal peptide and the ER retention sequence of GPx7 are boxed. Accession numbers are: NP_056511.2, for human GPx7 (*HsGPx7*); NP_077160.1, for *Mus musculus* GPx7 (*MmGPx7*); NP_001088904.1, for *Xenopus laevis* GPx7 (*X. laevis* GPx7); AAF47761.1, for the GPx of *Drosophila melanogaster* (*DmGPx*); P40581.1, for yeast GPx3; NP_000572.2, for human GPx1 (*HsGPx1*).

FIGURE 3. The N-terminal signal peptide and C-terminal KREDL motifs of GPx7 are functional. A) The N-terminal signal peptide carried by GPx7 is cleaved off in the mature protein. The coding region of the expression construct used for transfecting HEK 293T cells (*HAHsGPx7^{wt}*) is summarized in the upper part of the panel. It contains the HA epitope NH₂ to the signal peptide of wild type human GPx7. In the lower part, immunoblot analysis of lysates transiently expressing the construct. The antibody used for detection is indicated. B) The C terminal motif of GPx7 is relevant for cell retention. In the upper part of the panel, the coding region of the expression constructs used for transfecting HEK 293T is summarized: a) wild type human GPx7 (*HsGPx7^{WT}*); b) wild type human GPx7 truncated by a stop codon replacing the C-terminal KREDL motif of the wild type protein (*HsGPx7^{WT,KREDL}*). The culture medium was collected 24 hours after transfection, centrifuged (2,000 x g) and concentrated to a volume identical to that used for cell lysis. Equal volumes of both medium and lysates underwent western blot analysis with antibodies to GPx7. Lanes are as follows: 1, medium from cells transfected with a; 2, medium from cells transfected with b. 3, cell lysate from cells transfected with a; 4, cell lysate from cells transfected with b.

FIGURE 4. The pSynA/GPx7 vector containing the encoding fusion α -SynGPx7 and its expression in *E. coli*. A) Scheme of pSynA/GPx7 construct used for heterologous expression. The pSynA/GPx7 construct contains an inducible T7 RNA polymerase promoter, and encodes for an N terminal His₆Tag fused to synuclein and mouse GPx7, which lacks the N-terminal signal peptide. The asterisk indicates a thrombin cleavage site. B) SDS-PAGE analysis of the 29,000 x g supernatant from induced bacterial lysate. The *E. coli* strain pLysS was transformed with the pSynA/GPx7 construct and induced as indicated under Experimental procedures. After lysis, a 29,000 x g supernatant was prepared and analyzed by SDS-PAGE. Lane 1: 1:50 dilution (2 μ l); MW: molecular mass standards. Typical yield was approx. 40 mg per one liter of bacterial culture.

FIGURE 5. MS/MS analysis of the fragment of containing the catalytic Cys of SynGPx7 purified by nickel chromatography. MS/MS spectrum of a 759.6843 (left) and 765.0173 (right) a.m.u. tryptic peptide obtained from Ni-NTA purified SynGPx7. The spectrum represents the *MmGPx7* 44-64 peptide containing the C_P (Cys56) in the sulfenic or sulfinic acid form (left or right panel respectively)

FIGURE 6. Glutathione peroxidase activity in the 29,000 x g supernatant of bacteria expressing SynGPx7 or Syn alone. The 29,000 x g supernatant of the pSynA/GPx7 transformed bacterial lysate, containing 0.6 μ g SynGPx7 (a) or 29,000 x g supernatant of the pSynA transformed bacterial lysate, expressing equal amounts of Syn alone (b), was used as

enzyme source. Purified GPx4 from rat testis was used as control (c). The spectrophotometric assay for glutathione peroxidases was performed in presence of 3mM GSH, as indicated under Experimental procedures. Reaction started with. 25 μ M PC-OOH. Of the two bacterial lysates, only that containing SynGPx7 exhibited activity after addition of PCOOH. Absence of activity in b was confirmed by addition of rat testis GPx4 to reduce the peroxidic substrate.

FIGURE 7. Molecular docking pose for the complex GSH-GPx7 Molecular docking of GSH bound to the active site of the human GPx7 (PDB code: 2P31); on the right side, hydrophilic (red) and hydrophobic (green) residues contribution for GSH - *HsGPx1*, GSH - *HsGPx4*, GSH - *HsGPx7* complexes, with associated constants values (pK). The pK values of GSH with GPx1, GPx4 and GPx7 indicate that the GSH- GPx7 complex is more stable, where the hydrophobic term (Hyd) contribution is fundamental for binding strength.

FIGURE 8. SPR analysis of binding of different GPxs to PDI. The figure represents the typical sensograms of the binding *MmGPx7*, *DmGPx^{wt}*, *DmGPx^{C91K}* to immobilized PDI. 5 μ M of each enzyme was used. Curve a = *MmGPx7*; Curve b = *DmGPx^{C91K}*; Curve c = *DmGPx^{wt}*; Curve d = HBS-EP+, pH 7.4. All samples were exchanged to the HBS-EP+, pH 7.4 buffer by NAP chromatography before analysis. (RU= response unit, where 1 RU represents the binding of 1pg of protein per square mm)

FIGURE 9. GPx7 regulates FGF signaling. (A). MDA 231 cells were transfected with antisense nucleotides to GPx7 or GPx4 or scrambled nucleotides (control) for 24 hr followed by 225 ng/ml FGF treatment for 10 min, and lysed as reported under Experimental Procedures. Cell lysates were immunoblotted with mouse monoclonal antibody to phospho-ERK or, to normalize protein load, antibody to beta catenin. Autoradiography followed incubation with HRP conjugated anti-mouse IgG. Lanes are as follows: 1, non-treated cells; 2, FGF-treated cells; 3, FGF-treated, GPx7-silenced cells; 4, FGF-treated, GPx4-silenced cells. Silencing was evaluated by PCR and showed a decrease of mRNA by approx. 40% for both GPx7 and GPx4. This experiment is representative of at least four replicates, two of which made using different nucleotides (see experimental procedures).

SCHEME 1. Reaction pathway of GPxs describing the enzyme-substitution mechanism. The rate constant k_{+1} is equivalent to reciprocal of the value of the slope in Lineweaver-Burk plot, where $1/ROOH$ is plotted vs $[E]/v$, which yields the term Φ_1 in the Dalziel eqn (1). The rate constant k'_{+2} represents the sum of the rate constants of the two reducing half reactions (i.e. $k_{+2} + k_{+3}$) and is equivalent to the reciprocal of the intercept in the same plot, yielding Φ_2 in the Dalziel eqn (1).

Acknowledgements- We thank Professor Stefano Moro, Molecular Modelling Section of the University of Padova, for invaluable technical support.

TABLE I

Specific activity, kinetic coefficients and apparent rate constants of SynGPx7 and SynGPx7^{C85A} for the reduction of PCOOH by GSH

Enzyme	Specific activity μmoles/min/mg prot.	Φ_1 (μM s)	k_{+1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	Φ_2 (μM s)	k'_{+2} (M ⁻¹ s ⁻¹)
SynGPx7	0.065±0.014	105±51	9.5x 10 ³	7.9±8 x 10 ³	12.6
SynGPx7 ^{C85A}	0.057±0.018	153±40	6.5x10 ³	80±6 x10 ³	12.4

Specific activity was measured on the 29,000 x g supernatant of the bacterial lysate expressing SynGPx7 or SynGPx7^{C85A}. For kinetic analysis enzyme concentration was calculated as described under Experimental procedures. Specific activity was performed in the presence of 25μM PCOOH and 3 mM GSH as substrates, in the presence of NADPH and non-limiting amount of GSH reductase. Kinetic coefficients are reported as mean ± standard deviation of three independent experiments.

TABLE II

Specific activity, kinetic coefficients and apparent rate constants of SynGPx7 and SynGPx7^{C85A} for the reduction of PCOOH by PDI

Enzyme	Specific activity μmoles/min/mg prot.	Φ_1 (μM s)	k_{+1} (M ⁻¹ s ⁻¹)	Φ_2 (μM s)	k'_{+2} (M ⁻¹ s ⁻¹)
SynGPx7	0.048±0.016	204±60	4.9 x 10 ³	285±50	3.5x10 ³
SynGPx7 ^{C85A}	0.059±0.010	172±30	5.8x10 ³	166±70	6.0x10 ³

Specific activity, kinetic analysis and quantification were performed as reported in Table I, except that GSH and GSH reductase were replaced by 10 μM PDI and non-limiting amount of bovine Trx reductase respectively.

TABLE III
Specific activity of distinct GPxs with different reducing substrates

Enzyme	Reducing substrate	Specific activity ($\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein)
SynGPx7	GSH	0.065*
	<i>HsTrx</i>	undetectable
	<i>HsPDI</i>	0.048**
<i>RrGPx4</i>	GSH	17.2
	<i>HsTrx</i>	undetectable
	<i>HsPDI</i>	undetectable
<i>DmGPx^{wt}</i>	GSH	0.08
	<i>HsTrx</i>	5.12
	<i>HsPDI</i>	undetectable
<i>DmGPx^{C91K}</i>	GSH	0.26
	<i>HsTrx</i>	undetectable
	<i>HsPDI</i>	undetectable

Specific peroxidase was measured on the indicated enzymes, as reported under Experimental procedures, with $25\mu\text{M}$ PC-OOH as the oxidizing substrate. GSH, *HsTrx* or *HsPDI* when present were 3mM , $5\mu\text{M}$ or $10\mu\text{M}$ respectively. Source of SynGPx7 was the bacterial pellet expressing this enzyme, *RrGPx4* is a purified preparation of GPx4 from rat testis, *DmGPx^{wt}* and *DmGPx^{C91K}* represent the wild type and the C_R mutated forms of the *DmGPx*, respectively (27). *data from Table I; ** data from Table II.

References

1. Hamanaka, R. B., and Chandel, N. S. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* **35**, 505–513
2. Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., and Stoppani, A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**, 248–257
3. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* **552**, 335–344
4. Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., and Lambeth, J. D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**, 131–140
5. Messner, K. R. (2002) Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 42563–42571
6. Kuhn, H., and Thiele, B. J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* **449**, 7–11
7. Sevanian, A., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hodis, H., Hwang, J., Zamburlini, A., Maiorino, M., and Ursini, F. (1997) LDL- is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J Lipid Res* **38**, 419–428
8. Zhao, J., O'Donnell, V. B., Balzar, S., St Croix, C. M., Trudeau, J. B., and Wenzel, S. E. (2011) 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14246–14251
9. Flohé, L. (2010) Changing paradigms in thiology from antioxidant defense toward redox regulation. *Meth Enzymol* **473**, 1–39
10. Rhee, S. G. (2006) Cell signalling: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* **312**, 1882–1883
11. Forman, H. J., Maiorino, M., and Ursini, F. (2010) Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* **49**, 835–842
12. Petry, A., Weitnauer, M., and Görlach, A. (2010) Receptor Activation of NADPH Oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 467–487
13. Mukherjee, S. P., and Lynn, W. S. (1977) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insulin. Possible role in the hormone's effects on adenylate cyclase and the hexose monophosphate shunt. *Arch Biochem Biophys* **184**, 69–76
14. Krieger-Brauer, H. I., and Kather, H. (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* **89**, 1006–1013
15. Barnes, J. L., and Gorin, Y. (2011) Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* **79**, 944–956
16. Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., Pagano, P. J., Johnson, C., and Alexander, R. W. (2002) Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* **91**, 1160–1167
17. Chen, K., Kirber, M. T., Xiao, H., Yang, Y., and Keaney, J. F. (2008) Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol* **181**, 1129–1139
18. Schroder, K., Helmcke, I., Palfi, K., Krause, K. H., Busse, R., and Brandes, R. P. (2007) Nox1 Mediates Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27**, 1736–1743
19. Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296–299
20. Thomas, C. P., Morgan, L. T., Maskrey, B. H., Murphy, R. C., Kuhn, H., Hazen, S. L., Goodall, A. H., Hamali, H. A., Collins, P. W., and O'Donnell, V. B. (2010) Phospholipid-

- esterified Eicosanoids Are Generated in Agonist-activated Human Platelets and Enhance Tissue Factor-dependent Thrombin Generation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6891–6903
21. Flohé, L., Toppo, S., Cozza, G., and Ursini, F. (2011) A Comparison of Thiol Peroxidase Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 763–780
 22. Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P. R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the “termination” codon, TGA. *EMBO J* **5**, 1221–1227
 23. Mauri, P., Benazzi, L., Flohé, L., Maiorino, M., Pietta, P. G., Pilawa, S., Roveri, A., and Ursini, F. (2003) Versatility of selenium catalysis in PHGPx unraveled by LC/ESI-MS/MS. *Biol. Chem.* **384**, 575–588
 24. Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009) Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 1486–1500
 25. Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7017–7021
 26. Seo, M. S. (2000) Identification of a New Type of Mammalian Peroxiredoxin That Forms an Intramolecular Disulfide as a Reaction Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 20346–20354
 27. Maiorino, M., Ursini, F., Bosello, V., Toppo, S., Tosatto, S. C. E., Mauri, P., Becker, K., Roveri, A., Bulato, C., Benazzi, L., De Palma, A., and Flohé, L. (2007) The thioredoxin specificity of Drosophila GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases. *J. Mol. Biol.* **365**, 1033–1046
 28. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471–481
 29. Utomo, A. (2004) Identification of a Novel Putative Non-selenocysteine Containing Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (NPGPx) Essential for Alleviating Oxidative Stress Generated from Polyunsaturated Fatty Acids in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 43522–43529
 30. Nguyen, V. D., Saaranen, M. J., Karala, A.-R., Lappi, A.-K., Wang, L., Raykhel, I. B., Alanen, H. I., Salo, K. E. H., Wang, C.-C., and Ruddock, L. W. (2011) Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation. *J. Mol. Biol.* **406**, 503–515
 31. Negro, A. (2001) Multiple phosphorylation of a-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. *The FASEB Journal* **16**, 210–212
 32. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254
 33. Roveri, A., Maiorino, M., Nisii, C., and Ursini, F. (1994) Purification and characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from rat testis mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1208**, 211–221
 34. Maiorino, M., Gregolin, C., and Ursini, F. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. (1990) Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* **186**, 448–457
 35. Lundström, J., and Holmgren, A. (1990) Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 9114–9120
 36. Ursini, F., Maiorino, M., and Gregolin, C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **839**, 62–70
 37. Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohé, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohé, L. (1995) Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 651–660

38. Dalziel, K., Dam, H., Moutschen-Dahmen, M., Noer, B., and Reio, L. (1957) Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms. *Acta Chem. Scand.* **11**, 1706–1723
39. C. C. G. Molecular Operating Environment (MOE 2009.10), Inc, 1255 University St., Suite 1600, Montreal, Quebec, Canada, H3B 3X3.
40. C. C. D. C. C. h. w. c. c. a. u. GOLD suite
41. Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P., and Shenkin, P. S. (2004) Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem* **47**, 1739–1749
42. Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., and Gregolin, C. (1982) Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* **710**, 197–211
43. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 322–328
44. Gallogly, M. M., Starke, D. W., and Mielay, J. J. (2009) Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1059–1081
45. Peng, D. F., Razvi, M., Chen, H., Washington, K., Roessner, A., Schneider-Stock, R., and El-Rifai, W. (2008) DNA hypermethylation regulates the expression of members of the Mu-class glutathione S-transferases and glutathione peroxidases in Barrett's adenocarcinoma. *Gut* **58**, 5–15
46. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohé, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* **252**, 38–53
47. Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., Bornkamm, G. W., SCHWEIZER, U., and Conrad, M. (2008) Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metab* **8**, 237–248
48. Masui, S., Vavassori, S., Fagioli, C., Sitia, R., and Inaba, K. (2011) Molecular Bases of Cyclic and Specific Disulfide Interchange between Human ERO1 Protein and Protein-disulfide Isomerase (PDI). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 16261–16271
49. Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., and Exton, J. H. (2004) Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **279**, 49420–49429
50. Peng, D., Belkhir, A., Hu, T., Chaturvedi, R., Asim, M., Wilson, K. T., Zaika, A., and El-Rifai, W. (2011) Glutathione peroxidase 7 protects against oxidative DNA damage in oesophageal cells. *Gut*
51. Cole, B. K., Kuhn, N. S., Green-Mitchell, S. M., Leone, K. A., Raab, R. M., Nadler, J. L., and Chakrabarti, S. K. (2012) 12/15-Lipoxygenase signaling in the endoplasmic reticulum stress response. *AJP: Endocrinology and Metabolism* **302**, E654–E665
52. Volinsky, R., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., and Kinnunen, P. K. J. (2011) Oxidized phosphatidylcholines facilitate phospholipid flip-flop in liposomes. *Biophys. J.* **101**, 1376–1384

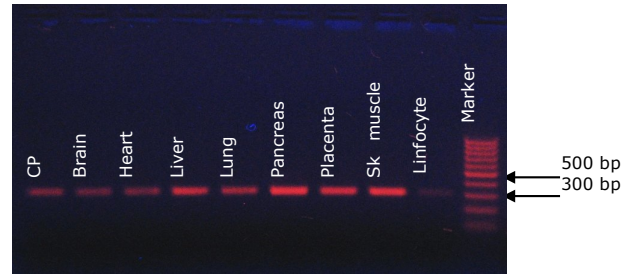


Figure 1

DmPHGPx -----MSA--NGDYKNAASIYEFTVKDTHG--NDVSLEKYKGVVLLVNIASKCGL 47
 yeastGPx3 -----MSEFYKLAPVDKKG--QPFPPDQLKGVVLLVNVASKCGF 38
 HsGPx4 -----MCAS--RDDWRCARSMHEFSAKDIDG--HMVNLDKYRGFVICIVTNVASQUGK 48
 HsGPx1 -----MCAARLAAAAAAAAQSVYAFSARPLAGGEPVSLGSLRGKVLLEIENVASLUGT 51
 HsGPx7 MVAATVAAAWLLLWAAACAQQEQDFYDFKAVNIRG--KLVSLEKYRGSVSLVNVASECGF 59
 MmGPx7 MVA--VATAWLLLWAAACAQEQDFYDFKAVNIRG--KLVSLEKYRGSVSLVNVASECGF 58
 X.laewisGPx7 ---MYFAALVLLLSLSPSLQKSRDFYTFKVVNIRG--KLVSLEKYRGSVSLVNVASECGY 56
 . . : : * . . : . : * * : : * : * * *

Cys-Block

DmGPx TKNNYEKLTDLKEKYGERGLVILNFPNCQFGSQM--PEADG--EAMVCHLRDSKADIG--EV 103
 yeastGPx3 TP-QYKELEALYKRYKDEGFTIIGFPCNQFGHQE--PGSDEEIAQFCQLNYGVTFP----I 92
 HsGPx4 TEVNYTQLVDLHARYAECGLRILAFPCNQFGKQE--PGSNEEIKEFAAG--YNVKFD----M 102
 HsGPx1 TVRDYTMNELQRRLLGPRGLVVLGFPNCQFGHQENAKNEEILNSLKVYRPGGGFEPNFML 111
 HsGPx7 TDQHYRALQQLQRDLGPHHFNVLAFFPCNQFGQOE--PDSNKEIESFARRTYSVSFP----M 114
 MmGPx7 TDQNYRALQQLQRDLGPHHFNVLAFFPCNQFGQOE--PDTNREIENFARRTYSVSFP----M 113
 X.laewisGPx7 TDSHYKALQQLQRDLGSHHFNVLAFFPCNQFGQOE--PNSDREIENFIRKNYSVSFP----M 111
 * . * : * : : * * * * * * . : . : . :

Dimer interface

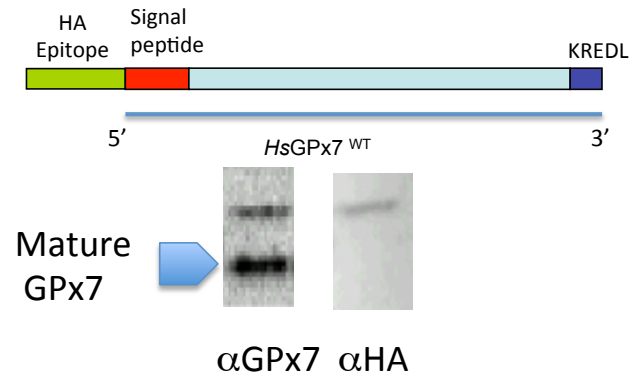
DmGPx FAKVDVNGDNAAPLYKYLKAKQTG-----TLGS--GIKWNFTKFLVNK 144
 yeastGPx3 MKKIDVNGNEDPVYKFLKSQKSG-----MLGLRGIKWNFEKFLVDK 134
 HsGPx4 FSKICVNGDDAHPLWKWKMIQPKGKG-----ILGN--AIKWNFTKFLIDK 145
 HsGPx1 FEKCEVNGAGAHPLFAFLREALPAPSDATAALMTDPKLITWSPVCRNDVAWNFEKFLVGP 171
 HsGPx7 FSKIAVTGTGAHPAFKYLAQTS GK-----EPTWNFWKYLVAP 151
 MmGPx7 FSKIAVTGTGAHPAFKYLTQTS GK-----EPTWNFWKYLVDP 150
 X.laewisGPx7 FSKTAVTGSANTAFKYLI ESSGK-----EPDWNFWKYLVGP 148
 : * * . * . : : : * * * * * :

Tetramer interface

DmGPx EGVPIINRYAPTDPMDIAKDIEKLL----- 169
 yeastGPx3 KGKVYERYSSSLTKPSSLSETIEELLKEVE----- 163
 HsGPx4 NGCVVKRYGPMEEPLVIEKDLPHYF----- 170
 HsGPx1 DGVPLRRYSRRFQTIDIEPDIEALLSQGPSCA---- 203
 HsGPx7 DGKVVGAWDPTVSVVEVRPQITALVRKLILLKREDL 187
 MmGPx7 DGKVVGAWDPTVPVAEIKPRI TEQVMKLIILKREDL 186
 X.laewisGPx7 DGKVVDAGWPTISVAEVRPHVTSLVRKIILKKKEEL 184
 . * : : : :

Figure 2

A)



B)

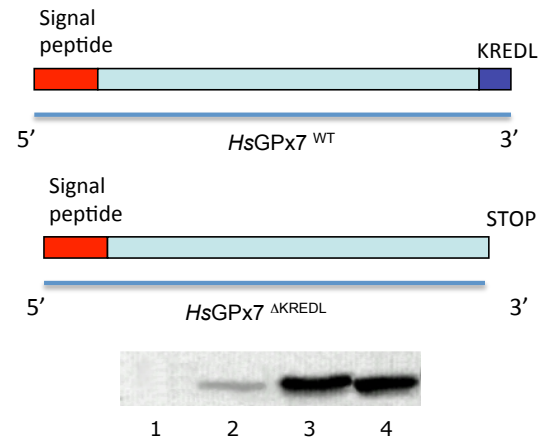


Figure 3

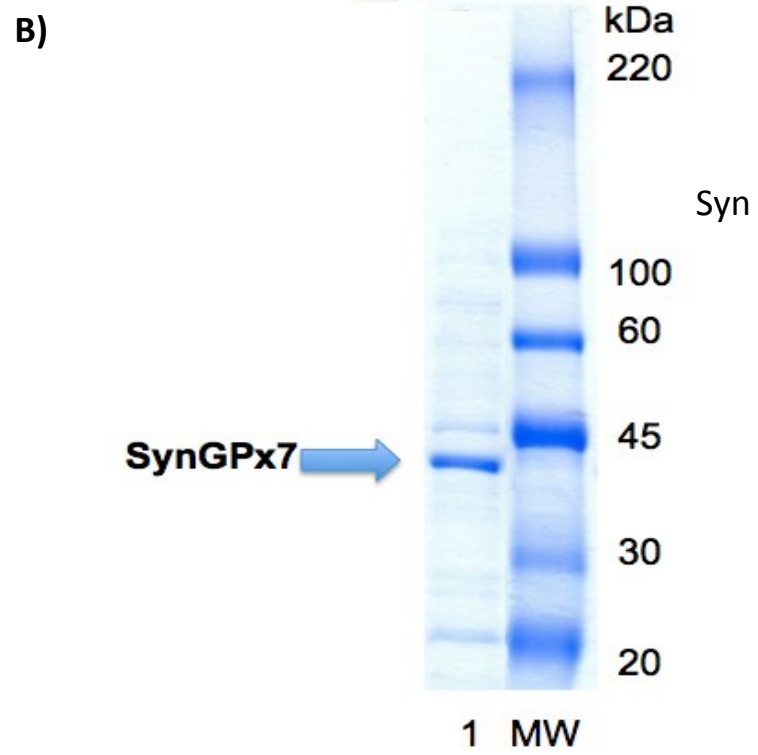
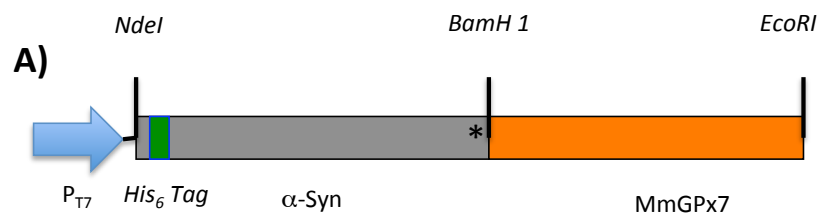
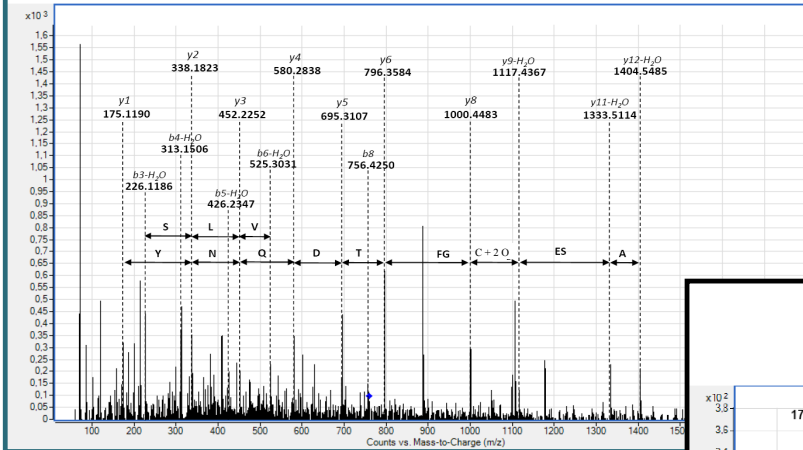


Figure 4

GSVSLVNVASECGFTDQNYR

MS2 spectrum from 759.6843 [z = 3], Cys + 20



GSVSLVNVASECGFTDQNYR

MS2 spectrum from 765.0173 [z = 3], Cys + 30

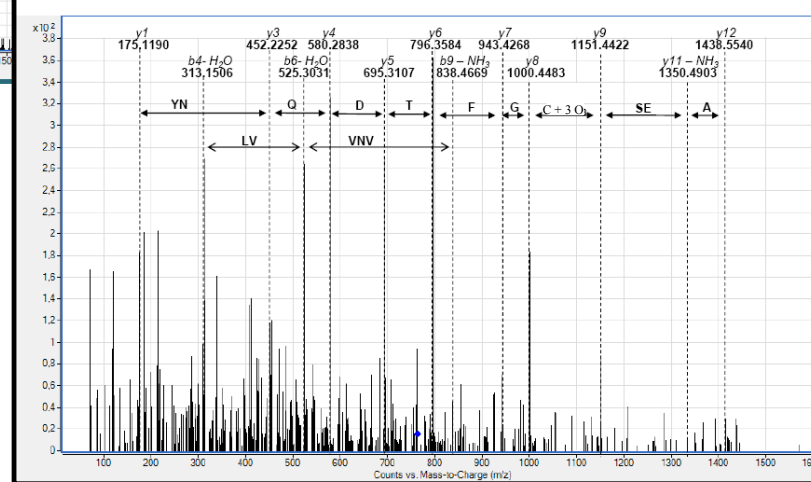


Figure 5

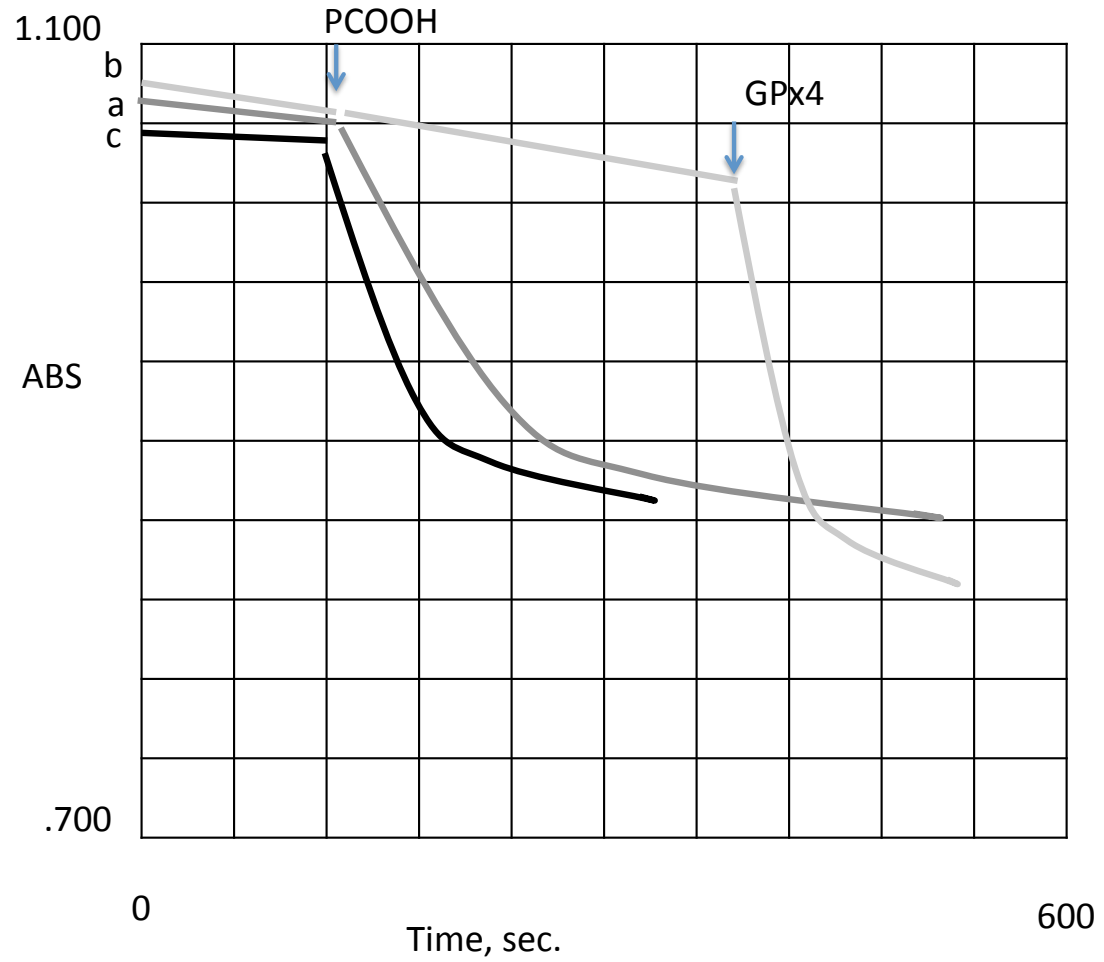
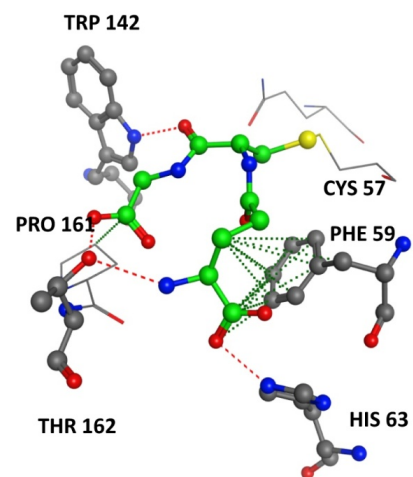


Figure 6



GPx1	GPx4	GPx7
Arg 180	Lys 135	Thr 162
Arg 52	Lys 48	His 63
Arg 179	Trp 136	Trp 142
CH ₃ -Thr 49	(CH ₂) ₄ -Lys 48	Phe 59
		Pro 161
pK = 2.21	pK = 2.18	pK = 4.89
H-bond= 1.16	H-bond= 1.09	H-bond= 1.56
Hyd= 0.186	Hyd= 0.231	Hyd= 1.621

Figure 7

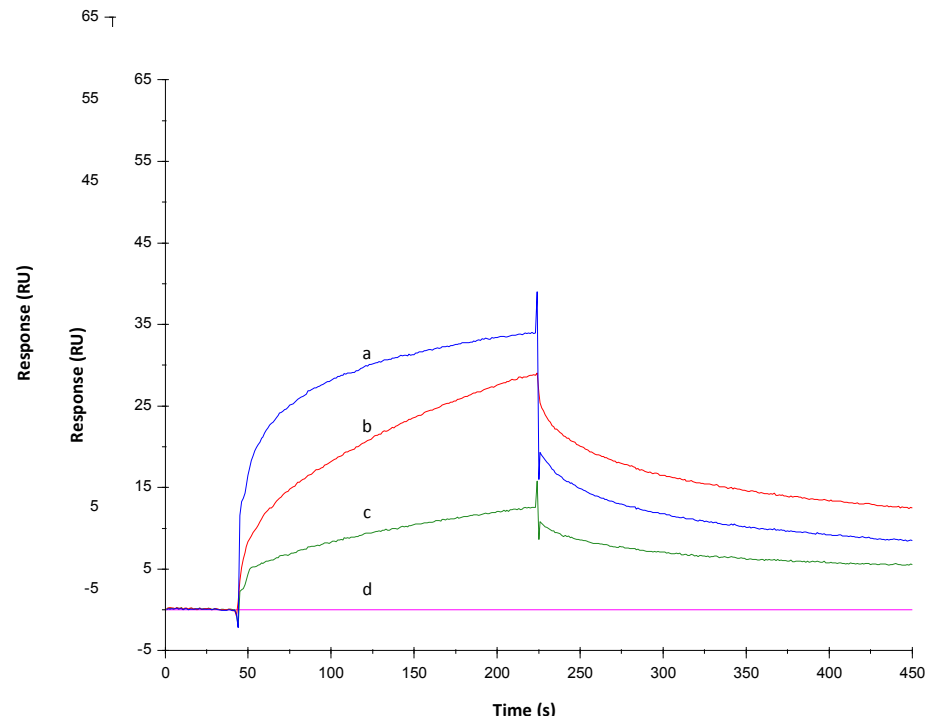


Figure 8

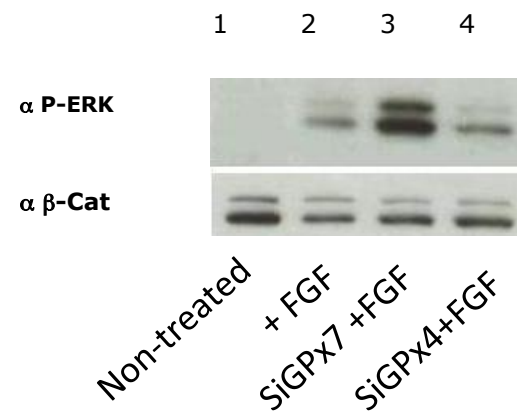
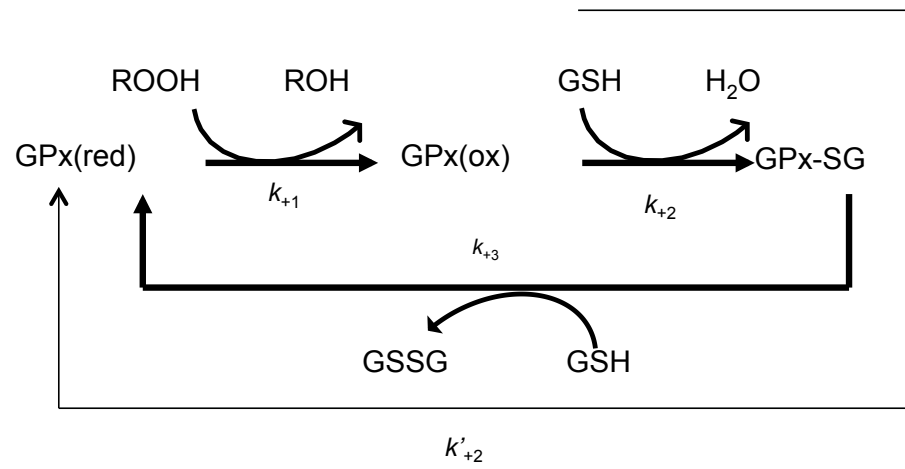


Figure 9



Scheme 1

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Fulvio Ursini per l'opportunità che mi ha dato di frequentare il suo laboratorio durante il dottorato.

Un particolare ringraziamento alla Prof.ssa Matilde Maiorino che mi ha seguita in questi anni e a cui devo quello che ho imparato.

Ringrazio infine la Dott.ssa Valentina Bosello Travain, con cui ho frequentemente collaborato, per la sua disponibilità e competenza.