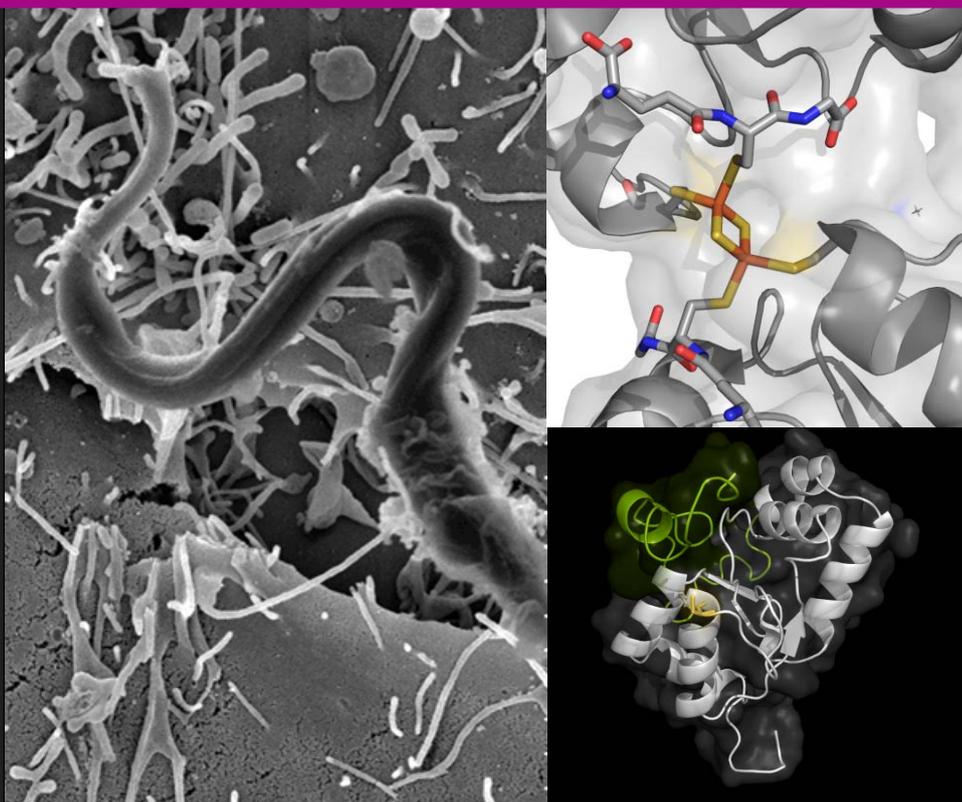


Luciana Fleitas

Tutores: Marcelo A. Comini
Bruno Manta

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA GLUTARREDOXINA MONOTIÓLICA 1 DE *Trypanosoma Cruzi*.



Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica 2012.
Laboratorio de Biología redox de Trypanosomas,
Institut Pasteur de Montevideo.

Contenido

Abreviaturas.....	4
1. Introducción.....	6
1.1. Visión general.....	7
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas	7
1.3. En búsqueda de blancos terapéuticos	8
1.4. Glutarredoxinas.....	11
1.4.1. Generalidades.....	11
1.4.2. Estructura de las glutarredoxinas.....	12
1.4.3. Mecanismo de reacción	13
1.4.4. Clasificación de las glutarredoxinas: ditiólicas y monotiólicas.....	14
1.5. Hierro	16
1.6. Centros [Fe-S].....	17
1.6.1. Tipos de centro [Fe-S].....	17
1.6.2. Sistemas que participan en el ensamblaje de centros [Fe-S].....	18
1.7. Rol de las glutarredoxinas en la coordinación de centros [Fe-S] y en la homeóstasis del hierro; antecedentes en el estudio del rol de las glutarredoxinas en la coordinación de centros [Fe-S]	20
1.8. Metabolismo del hierro	22
1.8.1. Metabolismo del hierro en el huésped mamífero	22
1.8.2. Metabolismo del hierro en tripanosomátidos	23
1.8.3. Rol del hierro en la infección.....	25
1.9. Las glutarredoxinas de los tripanosomas.....	27
1.9.1. Glutarredoxinas ditiólicas.....	27
1.9.2. Las glutarredoxinas monotiólicas y el rol primordial de la 1-C-Grx1	28

2. Objetivos	31
2.1. Objetivo general.....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Materiales y métodos	33
3.1. Materiales	34
3.2. Producción de proteínas recombinantes.....	34
3.2.1. Clonado de Tc 1-C-Grx1 y generación de versiones mutantes	34
3.2.2. Preparación y transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3) competentes.....	39
3.2.3. Expresión y purificación de distintas variantes de la Tc 1-C-Grx1 recombinante	40
3.2.4. Expresión y purificación de la Proteasa del Virus del Gravado del Tabaco	41
3.2.5. Expresión y purificación de la desulfurilasa de cisteína de <i>E. coli</i>	42
3.3. Técnicas analíticas.....	43
3.3.1. Cuantificación de proteína	43
3.3.2. Cuantificación de grupos tiol.....	43
3.3.3. Determinación del pKa de la cisteína del sitio activo putativo	43
3.4. Ensayos de reconstitución de centros [Fe-S]	44
3.5. Ensayo de reducción de la insulina	45
3.6. Ensayos de cristalogénesis	45
3.7. Cultivos celulares	46
3.8. Inmunoensayos	47
3.8.1. Protocolo de inmunización de ratones para la generación de anticuerpos anti-Tc 1-C-Grx1	47
3.8.2. Ensayo de <i>Western Blot</i>	48
4. Resultados y discusión	49
4.1. Glutarredoxinas monotiólicas de <i>T. cruzi</i>	50

4.2. Clonado, expresión y purificación de Tc 1-C-Grx1	53
4.3. Ensayos de cristalogénesis	57
4.4. Caracterización bioquímica de la Tc 1-C-Grx1	60
4.4.1. Determinación de la masa molecular.....	60
4.4.2. Determinación del estado oligomérico	61
4.4.3. Ensayos de coordinación de centros [Fe-S].....	64
4.4.4. Determinación del pKa de la Cys del sitio activo putativo	66
4.4.5. Actividad reductora de insulina.....	69
4.4.6. Estudio de la expresión de la proteína por ensayos de <i>Western blot</i>	70
5. Conclusiones y perspectivas	74
6. Referencias.....	80
7. Agradecimientos.....	95

Abreviaturas

1-C-Grx	Glutarredoxina monotiólica
2-C-Grx	Glutarredoxina ditiólica
Ala	Alanina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
β -ME	β -Mercaptoetanol
C-terminal	Carboxilo terminal
Centro [Fe-S]	Centro ferro-sulfurado
Cys	Cisteína
$\Delta 77$	Mutante truncado
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DLS	Dispersión dinámica de luz
FL	<i>Full length</i> /forma larga
Ft	Ferritina
Fpn	Ferroportina
Gly	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Glutámico
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
Gsp	Mono(glutationil)esperimidina
GspS	Mono(glutationil)espermidina sintetasa
His	Histidina
HED	Hidroxietil disulfuro
Hc	Hepcidina
Ile	Isoleucina
IRE	<i>Iron response element</i>
IRP	<i>IRE binding proteins</i>

Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
MTS	<i>Mitochondrial targeting sequence</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nramp	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>
N-terminal	Amino terminal
ON	<i>Over night</i>
Phe	Fenilalanina
PM	Peso molecular
ROS	<i>Reactive oxigen species</i>
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
TEV-P	Proteasa del virus del grabado del tabaco
Tf	Transferrina
TfR	Receptor para transferrina
Trx	Tiorredoxina
TryS	Tripanotión sintetasa
T(SH) ₂	Tripanotión
UTR	Región no traducida
VSG	<i>Variant surface glycoprotein</i>
Val	Valina

1. Introducción

1.1. Visión general

Los Tripanosomátidos son protozoarios del orden *Kinetoplastida* que parasitan a una gran variedad de huéspedes vertebrados e invertebrados. Los especímenes más relevantes para la salud humana y animal pertenecen a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, los cuales afectan a más de un billón de personas (un sexto de la población mundial) y son responsables de alrededor de medio millón de muertes anualmente en regiones subtropicales (Cavalli *et al.*, 2009). En países del África subsahariana *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense* son causantes de la enfermedad del sueño y *T. brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* ocasionan Nagana en el ganado. En América, *T. cruzi* es el responsable de la enfermedad de Chagas. Los parásitos del género *Leishmania* presentan una distribución más amplia, encontrándose en África, Asia y América Latina. Los mismos son causantes de espundia (Leishmaniasis mucocutánea) y Kala-azar (Leishmaniasis visceral), entre otras patologías (Krauth-Siegel *et al.*, 2008).

1.2. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis que constituye un problema de salud pública importante en Latinoamérica, afectando aproximadamente a 8 millones de personas, y produciendo alrededor de 12 mil muertes cada año (PAHO, 2011). La morbilidad y mortalidad son especialmente elevadas en personas que viven en el medio rural y en condiciones de pobreza donde el tipo de vivienda y la dificultad para el acceso a la atención médica facilitan la transmisión vectorial y complican el diagnóstico en etapas tempranas de la infección, respectivamente. Asimismo, el parásito se presenta en una gran variedad de cepas e infecta muchas clases de animales domésticos y silvestres, lo que hace difícil su control y erradicación (WHO, 2007).

El ciclo de vida del parásito incluye una etapa extracelular proliferativa en el insecto vector (epimastigota) y dos estadios que ocurren en el huésped mamífero: una forma no proliferativa e infectiva (tripomastigota) y otra intracelular y proliferativa (amastigota) (Irigoín *et al.*, 2008).

La forma más frecuente de infección se produce por el contacto de las mucosas o dermis con heces de insectos infectados pertenecientes a la familia *Triatominae*. Si bien se han

reconocido más de cien especies de estos hemípteros hematófagos, solamente unas diez cohabitan con los humanos. Entre ellas se encuentra *Triatoma infestans*, responsable del 85% de los casos en el cono sur, y *Rhodnius prolixus*, el segundo vector más importante en Centroamérica (WHO, 2007). Aunque en menor medida, la infección también puede ocurrir por ingesta de alimentos contaminados con el insecto. Formas alternativas de transmisión de la infección son: la transfusión de sangre, el trasplante de órganos y la vía congénita por parte de madres infectadas (Cavalli *et al.*, 2009; WHO, 2007, 2010). Estas formas de transmisión cobran relevancia en países desarrollados (América del Norte, Europa) donde la inmigración de personas infectadas ha llevado a la expansión de la enfermedad de Chagas fuera de su región endémica (WHO, 2010).

Existen varias cepas de *T. cruzi* que de acuerdo a su epidemiología, patogenia, respuesta al tratamiento, bioquímica o inmunogenicidad, se clasifican en dos grupos, I y II. El grupo II está vinculado al ciclo doméstico y presenta alta morbilidad en seres humanos, mientras que el I está asociado al ciclo silvestre y provoca infecciones leves. La sintomatología en ambos casos incluye lesiones cardíacas, pero sólo los tripanosomas del grupo II ocasionan lesiones del tracto digestivo (WHO, 2007).

1.3. En búsqueda de blancos terapéuticos

Si bien existen algunas iniciativas en la generación de vacunas para el tratamiento/prevenición de estas enfermedades (Aparicio-Burgos *et al.*, 2011; Dumonteil *et al.*, 2008; Perez-Brandan *et al.*, 2011), su desarrollo no resulta todavía demasiado promisorio en vistas de la gran variación antigénica que presentan los tripanosomátidos (Cavalli *et al.*, 2009). Por lo tanto, los tratamientos quimioterapéuticos son, por el momento, la única opción disponible para controlar estas enfermedades.

Hoy en día, únicamente dos drogas se encuentran disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, el nifurtimox y el benznidazol (Figura 1). No obstante su uso es restringido debido a su elevada toxicidad, limitada eficacia en la fase crónica de la enfermedad y alto costo debido, en parte, a la necesidad de tratamientos prolongados (Cavalli *et al.*, 2009; Irigoín *et al.*, 2008; WHO, 2007). La falta de formulaciones pediátricas es otra carencia importante a la cual recién se le está comenzando a dar solución (LAFEPE, *Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco*, generó dosis pediátrica de

benznidazol). Asimismo se ha observado el desarrollo de resistencia contra estos derivados nitroheterocíclicos (Murta *et al.*, 1998; Sokolova *et al.*, 2010).

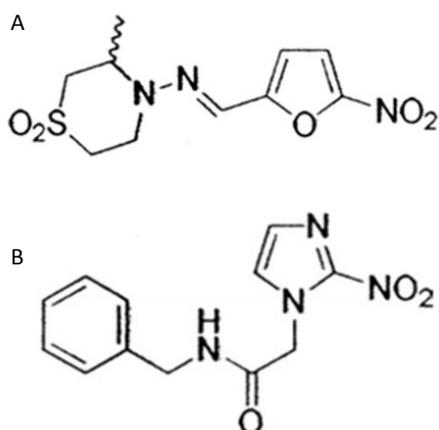


Figura 1. Estructura química de: A. Nifurtimox, y B. Benznidazol.

Por estos motivos, el estudio de rutas metabólicas del parásito que presenten relevancia para la viabilidad e infectividad del mismo pueden dar lugar a la identificación de nuevos blancos terapéuticos. En este sentido, puesto que el orden Kinetoplastida constituye una de las ramas más tempranas de la evolución eucariota, los tripanosomátidos presentan varias características genéticas, bioquímicas y biológicas distintivas. La secuenciación de los genomas de los tripanosomátidos *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* ha facilitado la identificación de vías metabólicas y proteínas que puedan potencialmente consolidarse como nuevos blancos de fármacos.

Es importante destacar que para que una proteína pueda considerarse como un potencial blanco terapéutico debe en primer lugar ser indispensable, presentar bolsillos de unión a sustrato singulares (preferentemente para metabolitos poco comunes) o, en el caso de que la estructura sea desconocida, presentar particularidades funcionales como su especificidad por sustrato, concentración intracelular o tasa de recambio (Flohé, 2011). En este sentido el metabolismo redox de estos parásitos, ligado fundamentalmente al empleo del tiol de bajo peso molecular tripanotión (T(SH)₂), único de tripanosomátidos, representa una fuente muy prometedora de posibles blancos moleculares.

El T(SH)₂ es el tiol de bajo peso molecular predominante en tripanosomátidos, sustituyendo al GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio de tiol-disulfuro y como principal

amortiguador redox intracelular (Fairlamb *et al.*, 1985; Krauth-Siegel *et al.*, 2011). La síntesis de este tiol implica la conjugación de dos moléculas de GSH a una de espermidina en dos pasos ATP-dependientes consecutivos (Fairlamb *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1992). En todos los kinetoplastidos estudiados a la fecha (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*, *L. donovani*) la T(SH)₂ sintetasa (TryS) puede catalizar ambos pasos de conjugación (Comini *et al.*, 2003). En *C. fasciculata* se ha reportado la existencia de una enzima adicional, la mono(glutationil)espermidina sintetasa (GspS), especializada en catalizar la primera reacción (Comini *et al.*, 2003, 2005; Fyfe *et al.*, 2008; Koenig *et al.*, 1997; Oza *et al.*, 2002, 2005).

La extrema dependencia de estos parásitos en el sistema T(SH)₂/T(SH)₂ reductasa (TR) se debe a que los mismos carecen de genes para la GSH reductasa (GR) y la tiorredoxina (Trx) reductasa, dos enzimas que junto con sus pares GSH y Trx, respectivamente, conforman los sistemas redox clásicos de la mayoría de los seres vivos. Sin ahondar demasiado, el T(SH)₂ participa en la descomposición de oxidantes como H₂O₂, peroxinitrito y varios hidroperóxidos derivados de ácidos grasos y fosfolípidos de cadena corta así como en la detoxificación de cetoácidos, metales pesados y xenobióticos, entre otros ejemplos. El T(SH)₂ también contribuye a la proliferación celular al suministrar equivalentes de reducción a la ribonucleótido reductasa (Fairlamb y Cerami, 1992; Flohé, 2011; Irigoín *et al.*, 2008; Krauth-Siegel *et al.*, 2003, 2008, 2011).

Dentro de las rutas metabólicas T(SH)₂-dependientes, el estudio de las glutarredoxinas monotiólicas (1-C-Grxs) aparece como una opción interesante, como se irá esclareciendo en el correr de este trabajo. Estas proteínas son miembros de la superfamilia de las Trxs y se caracterizan por contener una única cisteína en su sitio activo. Algunas 1-C-Grxs pueden, al igual que las glutarredoxinas ditiólicas (2-C-Grxs), participar en reacciones redox tiol-dependientes pero también existe profusa evidencia de que la gran mayoría de ellas participan en la biogénesis y/o transferencia de centros ferro-sulfurados (centros [Fe-S]) así como en la homeóstasis del hierro (ver referencias más adelante). No obstante, antes de hacer foco sobre el rol de éstas Grxs en los tripanosomátidos se hará referencia a algunos aspectos generales de las Grxs, su rol tentativo en el metabolismo del hierro y en algunas generalidades sobre la homeóstasis del hierro.

1.4. Glutarredoxinas

1.4.1. Generalidades

Las Grxs, fueron descritas por primera vez en el año 1976 como reductasas GSH-dependientes del disulfuro formado en la ribonucleótido reductasa durante su ciclo catalítico, en relación al estudio de este proceso en un mutante de *Escherichia coli* carente de la tiorredoxina 1 (Holmgren, 1976). Las mismas comparten una serie de características con las Trxs, si bien son más versátiles en cuanto a los sustratos sobre los que actúan (Lillig *et al.*, 2008). En los sistemas de Grx los electrones son transferidos del NADPH a la GR, luego al GSH y finalmente a una Grx (Figura 2; Fernandes *et al.*, 2004), si bien algunas isoformas pueden utilizar la tiorredoxina reductasa para su reducción (Johanson *et al.*, 2004).

Las Grxs participan en una gran variedad de reacciones relevantes desde el punto de vista biológico. Ya se mencionó su función como dadora de electrones a la ribonucleótido reductasa, pero también actúan como reductasas de enzimas participantes en la reducción asimilativa y desasimilativa del azufre en bacterias, hongos y plantas (Bick *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006), así como para la reducción de peróxidos (Hanschmann *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2008; Vergauwen *et al.*, 2001), sulfóxidos (Kim *et al.*, 2011; Tarrago *et al.*, 2009), tiorredoxinas (Reichheld *et al.*, 2007; Sotirchos *et al.*, 2009; Trotter *et al.*, 2005), entre otras. También se ha propuesto que poseen actividad chaperona que contribuye al plegamiento de proteínas (Berndt *et al.*, 2008). Además, son partícipes importantes en la glutationilación y deglutationilación de proteínas, modificación reversible que regula la actividad de chaperonas, factores de transcripción (Chantazoura *et al.*, 2010; Jbel *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2010; Ojeda *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2009; Xing *et al.*, 2005), proteínas del citoesqueleto (Landino *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2001), proteínas reguladoras del ciclo celular (Adachi *et al.*, 2004), por mencionar algunas. Asimismo, esta actividad se asocia con una función protectora en condiciones de estrés, ya que esta modificación bloquea reversiblemente grupos tiol evitando que se oxiden o sobreoxiden de manera inespecífica (Herrero *et al.*, 2007). Las Grxs también participan en el metabolismo y la homeostasis del hierro, función de particular relevancia en cuanto a las 1-C-Grxs concierne (Lillig *et al.*, 2008; Rouhier *et al.*, 2010).

En la mayoría de los organismos que poseen sistemas GSH-Grxs, las Grxs son codificadas por familias multigénicas, siendo especialmente abundantes en plantas (Herrero *et al.*, 2007),

presentando unas 30 Grxs de las cuales aproximadamente la mitad contiene el motivo CXXS (Couturier *et al.*, 2009).

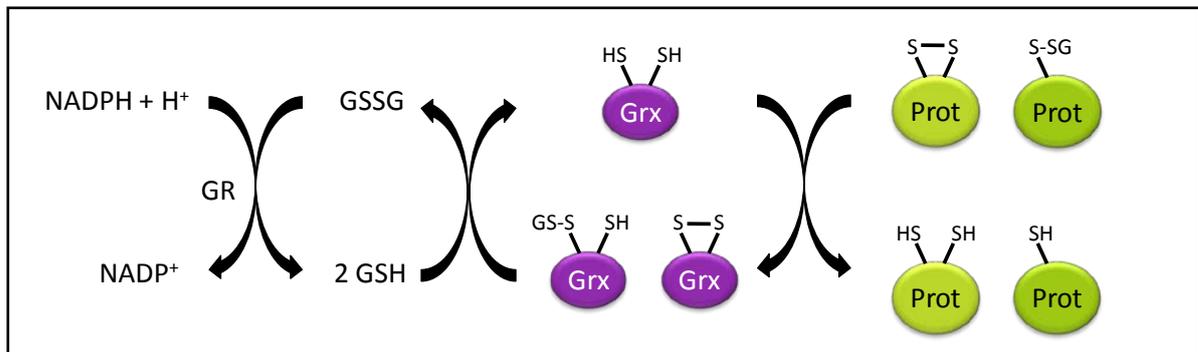


Figura 2. Mecanismo general del sistema glutarredoxina. Los electrones son transferidos desde el NADPH a la glutatión reductasa (GR), de ésta al glutatión (GSH) y finalmente a la glutarredoxina (Grx). La Grx reduce entonces disulfuros o disulfuros mixtos con GSH en la proteína blanco.

1.4.2. Estructura de las glutarredoxinas

El plegamiento de Trx fue identificado en 1975 cuando se elucidó la estructura cristalográfica de la Trx1 de *Escherichia coli* en su forma disulfuro (Holmgren *et al.*, 1975). El plegamiento de las Trxs se caracteriza por un núcleo central de cinco hojas β antiparalelas rodeadas por cuatro hélices α (Collet *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2004; Lillig *et al.*, 2008). Las Grxs exhiben un plegamiento de Trx en versión reducida, consistente en cuatro hojas β rodeadas por tres hélices α (Figura 3). Muchas otras proteínas comparten esta clase de plegamiento (tioredoxinas, glutarredoxinas, peroxidasa, isomerasas de disulfuro, glutatión-S-transferasas, oxidasas de disulfuro; Ren *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005), de manera que pertenecen también a la familia de las Trxs a pesar de que su homología de secuencia sea baja (Atkinson *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2004).

Todas las oxidorreductasas de la familia Trx presentan un sitio activo con los motivos CXXC o CXXS, posicionados en el *loop* que conecta una hoja β con una hélice α en la región N-terminal (Figura 3). La Cys N-terminal del sitio activo es la que lleva a cabo el ataque nucleofílico sobre distintos disulfuros (ver próxima sección). La misma se encuentra expuesta a la superficie y presenta un pKa bajo, *i.e.* unas tres unidades de pH por debajo del de una Cys libre (Lillig *et al.*, 2008).

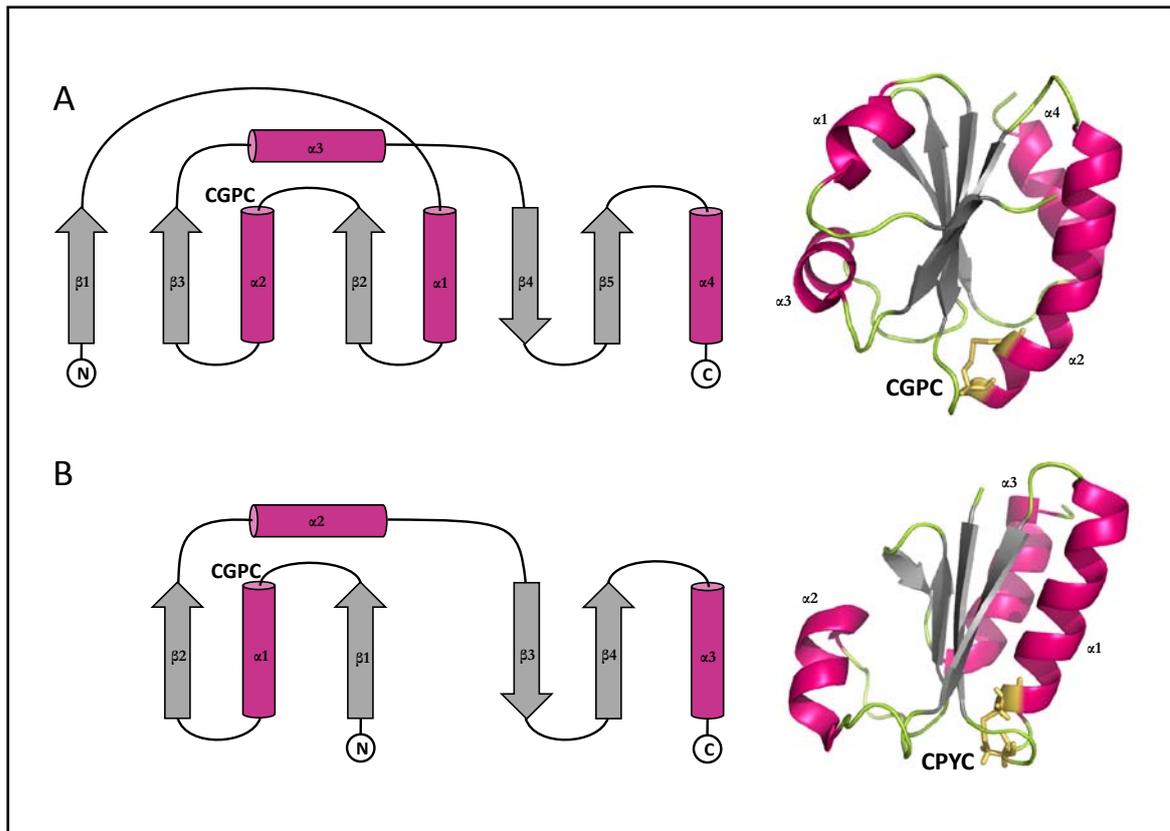


Figura 3. Plegamientos de tiorredoxina y glutaredoxina. (Adaptada de Collet, 2010) Estructura secundaria y terciaria de **A.** Trx (*Staphylococcus aureus*; PDB 2O7K). Cuatro hélices α rodean una lámina β de cinco hebras. El motivo CXXC se localiza hacia el sector N-terminal de la hélice α_2 . **B.** Grx (*E. coli*; PDB 1E6O). Tres hélices α rodean una lámina β de cuatro hebras. Las hoja β_1 y la hélice α_1 correspondientes al plegamiento de Trx están ausentes. La hélice α_2 conecta dos motivos (β_1 - α_1 - β_2 y β_3 - β_4 - α_3). El motivo CXXC se localiza siempre hacia la región N-terminal de una hélice α .

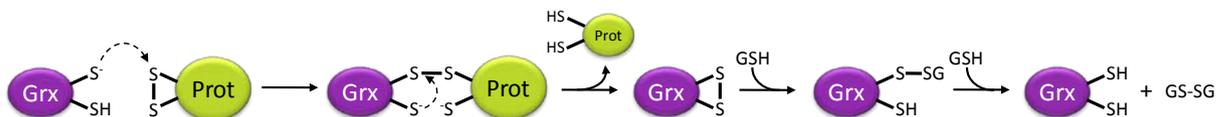
1.4.3. Mecanismo de reacción

Las Grxs pueden emplear dos mecanismos de reacción para reducir distintos tipos de disulfuros, los cuales se diferencian de acuerdo a la participación de uno o ambos tioles de su sitio activo en el mismo. Mediante el mecanismo ditiólico, compartido con sus parientes Trxs, las Grxs catalizan la reducción reversible de disulfuros proteicos utilizando ambas Cys del sitio activo. En el primer paso, el tiolato formado sobre la Cys N-terminal realiza un ataque nucleofílico sobre el disulfuro blanco. A continuación, la Cys C-terminal en su forma desprotonada elimina el disulfuro mixto entre ambas proteínas. El disulfuro intramolecular formado expuesto a la superficie sólo es accesible por un lado de la proteína (Collet *et al.*, 2010). El mismo es reducido por una molécula de GSH, que reacciona con la Cys N-terminal formando un disulfuro mixto que es resuelto por el ataque de una segunda molécula de GSH,

dando origen a la Grx reducida y a glutatión oxidado (GSSG; Figura 4; Fernandes *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2007; Lillig *et al.*, 2008).

Mediante el mecanismo monotiólico las Grxs se encargan de reducir disulfuros mixtos de proteínas con GSH, lo cual es una diferencia considerable con las Trxs, las cuales reducen una gran variedad de disulfuros proteicos pero tienen actividad baja o la carecen por completo frente a los primeros. En este caso, únicamente la Cys N-terminal es utilizada. Debido a su afinidad por GSH la Grx interactúa directamente con la molécula de GSH que forma parte del disulfuro mixto, liberando la proteína blanco reducida. El nuevo disulfuro mixto formado sobre la Grx es entonces reducido por otra molécula de GSH, regenerando la Grx reducida y liberando GSSG (Figura 4; Fernandes *et al.*, 2004).

A. Mecanismo ditiólico



B. Mecanismo monotiólico

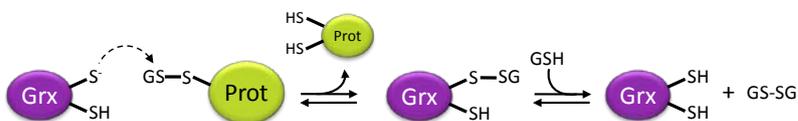


Figura 4. Mecanismos de oxidorreducción empleados por las Grxs. Mediante el mecanismo ditiólico se reducen disulfuros proteicos. Ambas Cys del sitio activo participan. En el mecanismo monotiólico se reducen disulfuros mixtos entre las Cys de proteínas y GSH. En este caso, sólo la Cys N-terminal participa de la catálisis.

1.4.4. Clasificación de las glutarredoxinas: ditiólicas y monotiólicas

En función de la secuencia y la estructura de sus dominios, las Grxs pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado las Grxs ditiólicas (2-C-Grx), las cuales presentan en su sitio activo la secuencia consenso C-P-Y/F-C y, por otro lado, las Grxs monotiólicas (1-C-Grx), en las que la secuencia consenso es C-G-F-S (Herrero *et al.*, 2007; Lillig *et al.*, 2008). Las 1-C-Grxs pueden clasificarse a su vez en proteínas de dominio único o de dominio múltiple, en cuyo caso presentan un dominio N-terminal generalmente de tipo Trx y entre uno y tres dominios de 1-C-Grx C-terminales. Incluso podría decirse que las 1-C-Grx de dominio múltiple

constituyen una subfamilia de proteínas en sí mismas, distinta de las 1-C-Grxs de dominio único (Hoffmann *et al.*, 2011). Cabe destacar que la clasificación en ditiólicas o monotiólicas no hace referencia al mecanismo de reacción que la proteína siga durante su ciclo catalítico. Todas las 2-C-Grxs catalizan mecanismos monotiólicos y varias, pero no todas, actúan mediante un mecanismo ditiólico también (Lillig *et al.*, 2008).

Por otro lado, la mayoría de las 1-C-Grxs son inactivas en ensayos con sustratos clásicos de las Grxs, como ser la reducción de hidroxietil disulfuro (HED). Brevemente, en este ensayo se incubaba HED con GSH, lo que da origen a un disulfuro mixto entre el β -ME y el GSH. Las 1-C-Grxs son generalmente incapaces de romper este disulfuro mixto (Herrero *et al.*, 2007). No obstante, algunas 1-C-Grxs excepcionales sí pueden, como las glutarredoxinas clásicas, deglutacionilar otras proteínas por un mecanismo monotiólico, como se ha propuesto para la GrxS12 cloroplástica (Couturier *et al.*, 2009) o mediante un mecanismo ditiólico como se ha descrito para la Grx5 de levadura (Tamarit *et al.*, 2003) y la Grx3 cloroplástica (Zaffagnini *et al.*, 2008). Las Grx6 y 7 de las rutas secretorias de levadura son otros ejemplos de 1-C-Grxs activas en el ensayo de HED (Izquierdo *et al.*, 2008).

Tanto las 2-C-Grxs como las 1-C-Grxs de dominio único son ubicuas, presentándose en todos los dominios filogenéticos, mientras que las 1-C-Grxs de dominio múltiple se hallan exclusivamente en eucariotas, desde hongos unicelulares hasta plantas y vertebrados superiores. Posiblemente esta última clase se haya originado por eventos de duplicación del dominio 1-C-Grx seguido de fusión a un módulo Trx en una etapa temprana de la evolución eucariota (Vilella *et al.*, 2004). Resulta interesante que las 1-C-Grxs, en comparación con las 2-C-Grxs, tienen una mayor identidad de secuencia entre sí lo que sugiere que las primeras tienen un antepasado común más reciente (Lillig *et al.*, 2008).

Las 2-C-Grxs y 1-C-Grxs también muestran otras diferencias estructurales entre sí, las cuales afectan en estas últimas su capacidad para unir GSH. Si bien los residuos relevantes en la interacción con la Gly C-terminal en el GSH están conservados en ambos grupos de proteínas, los residuos cargados que permiten la interacción con el residuo γ -Glu sólo se encuentran en las 2-C-Grxs. Estas sutiles divergencias estructurales explican en cierta medida las diferencias bioquímicas observadas entre los dos grupos de Grxs (Lillig *et al.*, 2008).

1.5. Hierro

El hierro es el segundo metal más abundante luego del aluminio y es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. El mismo puede encontrarse en diversos estados de oxidación (desde -2 hasta +6, siendo +2 y +3 los estados biológicamente más relevantes) (Crichton *et al.*, 2001), de modo que su versatilidad para llevar adelante ciclos de oxidoreducción es importante, aunque por otra parte determina su toxicidad. El hierro puede catalizar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante reacción de Fenton, motivo por el cual los organismos que lo utilizan mantienen un estrecho control sobre su transporte, metabolismo y almacenamiento (Taylor *et al.*, 2010).

El hierro es un elemento necesario para el funcionamiento de muchas metaloproteínas (Tabla 1), incluyendo aquellas que presentan centros ferro-sulfurados (centros [Fe-S]; Tabla 2), grupos hemo, centros férricos no hémicos mono o bifuncionales, y sitios activos homo o heterometálicos. Tanto en procariontas como en eucariotas la inserción de estos cofactores en las proteínas que los utilizan ocurre posteriormente a su síntesis bajo la forma apo (Rohuier *et al.*, 2009).

Tabla 1. Tipos de ferro-proteínas.

Metaloproteína	Ejemplo	Referencia
Hemoproteínas	hemoglobinas, citocromos, peroxidases, catalasas	mioglobina, oxidasas, Hoy <i>et al.</i> , 2008; Srajer <i>et al.</i> , 2001; Hersleth, 2006.
Proteínas con centros [Fe-S]	ver Tabla 2	
Proteínas con hierro mononuclear	lipoxigenasa, rubredoxinas	Andreou <i>et al.</i> , 2009; Chen <i>et al.</i> , 2006.
Proteínas con hierro oxodinuclear	hemeritrina, monooxigenasa, reductasa, ferritina	metano ribonucleótido Nordlund <i>et al.</i> , 1995

Tabla 2. Proteínas con centros [Fe-S]

Tipo de centro [Fe-S]	Ejemplo	Referencia
2Fe-2S	ferredoxina; monóxido de carbono deshidrogenasa	Kurusu <i>et al.</i> , 2001; Meyer <i>et al.</i> , 2000.
3Fe-4S; 4Fe-3S	hidrogenasa	Shomura <i>et al.</i> , 2011.
4Fe-4S	aconitasa; hidrogenasas; nitrato reductasa; sulfito reductasa; acetil coA sintasa;	Artymiuk <i>et al.</i> , 2006; Mulder <i>et al.</i> , 2011; Moura <i>et al.</i> , 2001; Crane <i>et al.</i> , 1996; Liu <i>et al.</i> , 2011
8Fe-8S; 8Fe-7S	nitrogenasa	Kim <i>et al.</i> , 1992.

El requerimiento de hierro es especialmente elevado en mitocondrias y cloroplastos donde muchas funciones dependientes de proteínas que unen centros [Fe-S] son llevadas a cabo; entre ellas, la fotosíntesis, la respiración, la asimilación de azufre y nitrógeno, por mencionar algunas (Rohuier *et al.*, 2009).

1.6. Centros [Fe-S]

1.6.1. Tipos de centro [Fe-S]

Los centros [Fe-S] pueden desempeñar múltiples funciones, como ser la transferencia de electrones, reacciones de (des)hidratación, generación de radicales, clivaje de enlaces disulfuro, entre otras reacciones relevantes en la señalización y metabolismo redox intracelular. También pueden cumplir funciones meramente estructurales en las proteínas que los contienen. Su capacidad para deslocalizar electrones sobre los átomos de hierro y azufre hace que los centros [Fe-S] sean cofactores ideales para realizar transferencia de electrones en los sistemas biológicos (Rohuier *et al.*, 2009).

Existen varios tipos de centros [Fe-S]. Los centros más comunes y simples son los romboides de [2Fe-2S] y los cúbicos de [4Fe-4S]. Muchas veces, un átomo de hierro de un centro [4Fe-4S] se pierde, para dar un centro de [3Fe-4S] el cual adopta una conformación distorsionada. El hierro puede alternar entre los estados de oxidación +2 y +3 y suele estar coordinado tetraédricamente con sulfuro (siempre presente en estado de oxidación -2). A partir de estos bloques sencillos pueden generarse centros [Fe-S] más complejos, por ejemplo, dos centros de tipo [4Fe-4S] pueden acoplarse, originando centros de tipo [8Fe-8S] o [7Fe-8S]. Usualmente, esta clase de complejo contiene otro tipo de ion metálico coordinado al S^{2-} como ser molibdeno, níquel o vanadio. En las proteínas, el hierro es coordinado generalmente por el grupo tiolato de la cadena lateral del aminoácido Cys, pero también puede hacerlo la His, Arg, Ser o moléculas pequeñas (CN^- , homocitrato). No existen motivos de unión a centro [Fe-S] que estén muy conservados, aunque algunas secuencias consenso se han reconocido, incluyendo el motivo $CX_4CX_2CX_{\sim 30}C$ y el motivo $CX_2CX_2CX_{20-30}C$. Los centros [Fe-S] suelen donar los electrones de a uno, pero los centros [7Fe-8S] (presente en nitrogenasas únicamente) puede darlos de a dos (Lill *et al.*, 2008).

1.6.2. Sistemas que participan en el ensamblaje de centros [Fe-S]

Más de veinte proteínas están involucradas en la síntesis de centros [Fe-S]. En procariotas se han identificado tres sistemas para el ensamblaje de proteínas con centros [Fe-S]: el sistema NIF (*nitrogen fixation*) es específico de bacterias azotólicas y es utilizado para la generación de estos complejos en proteínas relacionadas con la fijación de nitrógeno; los sistemas SUF (*sulfur mobilization*) e ISC (*iron-sulfur cluster*) son los responsables de la biogénesis constitutiva de centros [Fe-S] en la mayoría de los organismos y pueden presentarse de manera independiente o conjunta. En eucariotas, el sistema ISC funciona en la mitocondria, en tanto que el SUF lo hace en los plástidos de organismos fotosintéticos. Mientras que el sistema ISC es fundamental para la biogénesis de todos los centros [Fe-S] celulares, los eucariotas tienen además una maquinaria que se encarga de la maduración de proteínas ferrosulfuradas citosólicas y nucleares, que comprende el aparato de exportación de los centros [Fe-S] mitocondriales y el sistema CIA (*cytosolic iron-sulfur cluster assembly*) (Lill *et al.*, 2008). Más allá de las diferencias específicas, los tres sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] funcionan con una lógica similar que incluye el ensamblaje de centros [2Fe-2S] o [4Fe-4S] sobre proteínas de andamiaje clasificadas en tipo U (IscU, SufU y dominio N-terminal de NifU), tipo A (IscA, SufA o ^{nif}iscA) y tipo Nuf (dominio C-terminal de NifU), mediado por una cisteína desulfurilasa (IscS, SufS y NifS), con la posterior transferencia a su aceptor final, proceso que involucra chaperonas y co-chaperonas adicionales (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Lill *et al.*, 2008; Rohuier *et al.*, 2009). Sumado a esto, el proceso depende del potencial de membrana mitocondrial así como de la presencia de Cys, ATP y NADH (ver detalles en Figura 5; Mühlenhoff *et al.*, 2002, 2003).

El ensamblaje de centros [4Fe-4S] sobre IscU dimérica ocurre en la interface del dímero por acoplamiento reductivo de dos centros [2Fe-2S] (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rohuier *et al.*, 2009).

Existe evidencia de que algunas Grxs participan en la biogénesis y transferencia de estos cofactores así como en la homeóstasis del hierro siendo la Grx5 de levadura junto con sus ortólogos en otros organismos el ejemplo más representativo (Lill *et al.*, 2012).

Con respecto a la biosíntesis de centros [Fe-S] en tripanosomátidos, dos componentes del sistema ISC fueron identificados en *T. brucei*: la desulfurasa de cisteína Tb IscS2 y la proteína de andamiaje Tb IscU (Smid *et al.*, 2006).

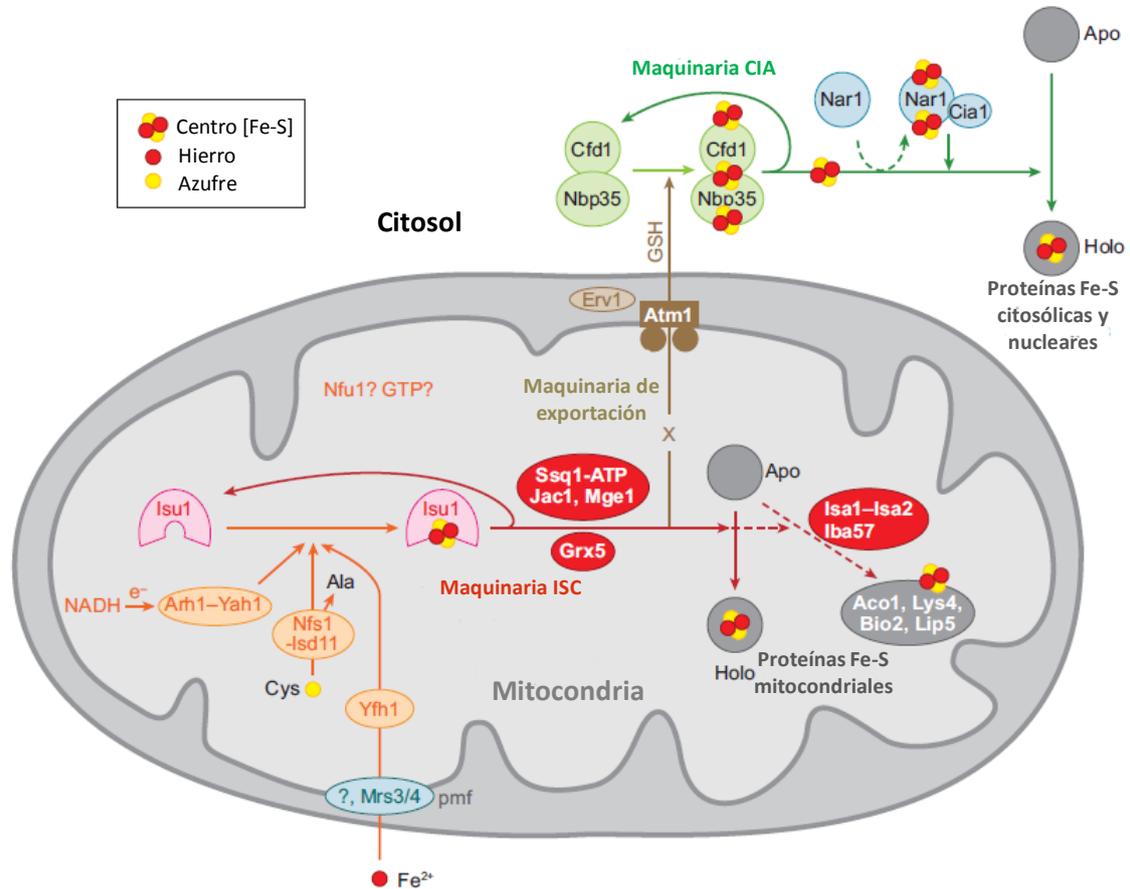


Figura 5. Esquema representativo de la biogénesis de centros [Fe-S] en células eucariotas. (Tomada y modificada de Lill, 2008) El sistema ISC mitocondrial es fundamental para la biogénesis de todos los centros [Fe-S] celulares. **Síntesis de novo de centros [Fe-S] (flechas naranjas)** El Fe²⁺ es importado a la mitocondria en un mecanismo que depende del potencial de membrana y que es facilitado por las proteínas de membrana Mrs3 y Mrs4, entre otras. La síntesis del centro [Fe-S] sobre Isu1 (e Isu2 en levadura) implica la participación de un complejo Cys-desulfurilasa Nfs1-Isd11, que cataliza la remoción de azufre elemental desde el aminoácido Cys, de la proteína de unión a hierro Yfh (frataxina) como dador putativo de Fe²⁺ y de un par Yah1 (ferredoxina)/Arh1 (ferredoxin-reductasa) que transfiere electrones desde el NADH. El poder reductor se requiere para reducir S⁰ a S²⁻, aunque no se descarta que pueda precisarse para otros pasos. **Transferencia de centros preformados a apo-proteínas (flechas rojas)** En esta etapa participan la chaperona Ssq1 (homóloga de HSP70), que interactúa con Isu1 facilitando la disociación del centro [Fe-S] y la co-chaperona Jak1 (homóloga de HSP40) que junto con el factor intercambiador de nucleótido Mge1 promueven y asisten la función ATP-dependiente de Ssq1. La Grx5 también participa en esta etapa de transferencia del centro [Fe-S] preformado hacia apo-proteínas (Apo). **Biogénesis de centros [Fe-S] extra-mitocondrial (flechas marrones)** El transportador ABC Atm1 de la membrana interna mitocondrial exporta el complejo desconocido (X), que contiene el centro [Fe-S], hacia el citosol. Otros componentes de este sistema de

exportación son la proteína Erv1, que oxida grupos tiól, y GSH (**flechas marrones**). En el citosol el sistema CIA cataliza la maduración de proteínas [Fe-S]. Primero, el centro [Fe-S] es montado sobre un P-loop de las NTPasas Cfd1 y Nbp35 que forman un complejo heterotetramérico, a partir del cual el complejo es transferido a la proteína Nar1. La proteína Cia1 asiste a Nar1 en la incorporación del centro [Fe-S] a proteínas citosólicas y nucleares (**Flechas verdes**).

1.7. Rol de las glutarredoxinas en la coordinación de centros [Fe-S] y en la homeóstasis del hierro; antecedentes en el estudio del rol de las glutarredoxinas en la coordinación de centros [Fe-S]

Los primeros estudios describiendo la coordinación de centros [Fe-S] por Grxs tuvieron a las proteínas de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y mamíferos como principales modelos de estudio, aunque también en plantas ha habido avances relevantes.

La primera Grx en la que la capacidad de unión de centros [Fe-S] fue caracterizada fue la Grx2 humana (Lillig *et al.*, 2005). Esta Grx, cuyo sitio activo presenta la secuencia CSYC, es capaz de coordinar un centro [Fe-S] del tipo $[2Fe-2S]^{2+}$ mediante el cual la proteína dimeriza. La coordinación del centro está dada por los residuos de Cys N-terminales del sitio activo de dos monómeros de Grx y por dos grupos tiol adicionales aportados por dos moléculas de GSH las cuales ocultan al hierro del solvente (Figura 6; Johansson *et al.*, 2006). Aunque con una arquitectura diferente, también para la Grx-1-C de álamo (*Populus tremula*) se ha descrito la formación de un complejo de características similares al de la Grx2 (Feng *et al.*, 2006). En su forma apo (monomérica), ambas proteínas presentan actividad oxidoreductasa así como capacidad de coordinar centros [Fe-S] (Feng *et al.*, 2006; Rouhier *et al.*, 2007), mientras que en el estado holo las enzimas carecen de actividad dado que la Cys de los sitios activos se comprometen en la unión del centro [Fe-S]. Dado que la unión de estos complejos Fe-S a las 2-C-Grxs es influenciada por la proporción GSH/GSSG (*e.g.* una tasa GSH/GSSG elevada estabiliza el holo complejo, mientras que sucede lo opuesto cuando la proporción se invierte), se ha propuesto que los mismos cumplen una función regulatoria sobre la actividad, actuando como sensores de estrés oxidativo (Berndt *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2006; Lillig *et al.*, 2005).

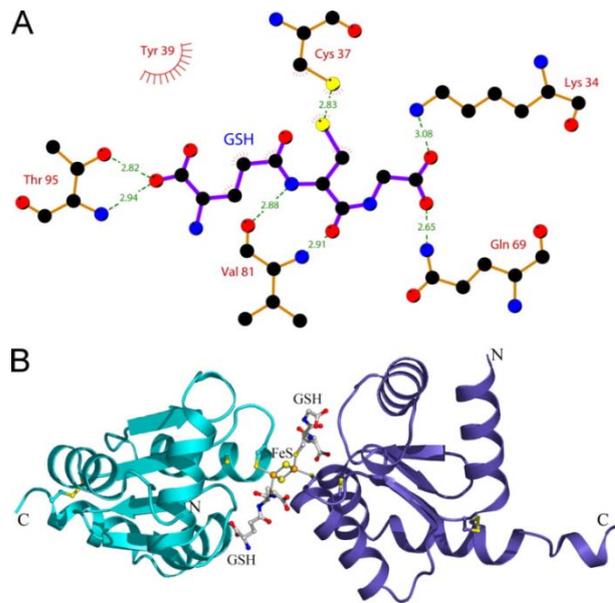


Figura 6. Unión de glutatión a la Grx2. (Tomada de Johanson, 2006) **A.** Unión de GSH al sitio activo de la Grx. Las interacciones polares se muestran como líneas verdes punteadas; las interacciones hidrofóbicas en rayas rojas. **B.** Estructura terciaria de la Grx2 dimérica. Los monómeros A y B se muestran en turquesa y azul, respectivamente. El dímero está acoplado por un cluster 2Fe-2S (ver detalle en el texto).

También se ha incursionado en el estudio de la coordinación de centros [Fe-S] por parte de las 1-C-Grxs, con interesantes hallazgos. Estudios pioneros con cepas de *S. cerevisiae* mutantes para la Grx5 mitocondrial brindaron los primeros indicios sobre la participación de las 1-C-Grxs en la homeóstasis del hierro celular. Por ejemplo, se ha visto que levaduras deficientes en Grx5 presentan altos niveles de hierro intracelular y una baja actividad de proteínas cuya función depende de centros [Fe-S] (como ser la aconitasa y la succinato deshidrogenasa). En consecuencia, estas células no son capaces de crecer en presencia de fuentes de carbono que deban ser metabolizados por vía aeróbica (fosforilación oxidativa) y son, por otro lado, más sensibles a agentes oxidantes. Luego, numerosos estudios pusieron en evidencia el rol de estas proteínas en el metabolismo del hierro, particularmente como componentes de la maquinaria de ensamblaje de centros [Fe-S] (sea como proteínas de andamiaje o en la transferencia de centros preformados) en eucariotas inferiores (Kim *et al.*, 2010; Rodríguez-Menazque *et al.*, 2002) y superiores, incluyendo vertebrados (Camaschella *et al.*, 2007; Wingert *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2010) y plantas. Incluso se ha observado la interacción *in vivo* de la Grx5 con otras proteínas ya caracterizadas dentro de la ruta de biosíntesis de centros [Fe-S] (Kim *et al.*, 2010).

Sumado a esto, aunque las 1-C-Grxs de diferentes especies comparten sólo un 20-30 % de identidad de secuencia (Filser *et al.*, 2008), homólogos de la Grx5 de bacteria, vertebrados y plantas logran revertir eficientemente el fenotipo del mutante de Grx5 en levaduras

(Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Molina-Navarro *et al.*, 2006), lo que habla de una conservación funcional de estas proteínas a lo largo de la evolución (Viella *et al.*, 2004).

Todavía no está claro en qué radican las diferencias bioquímicas observadas entre 1-C-Grx y 2-C-Grx cuando ambas clases presentan similitud estructural en la coordinación de centros [Fe-S]: utilizan la Cys N-terminal de su sitio activo y GSH como ligando. La idea general es que en tanto que las 1-C-Grxs funcionarían almacenando, transportando y entregando centros [Fe-S], la coordinación por parte de las 2-C-Grxs funcionaría como un sensor del estado redox al secuestrar la forma monomérica activa de la Grx y liberarla ante condiciones oxidativas por ruptura del holo-complejo. Las 1-C-Grxs atraviesan cambios conformacionales importantes al pasar del estado dimérico al monomérico, lo que llevó a proponer que el mecanismo que permitiría la entrega de centros [Fe-S] sería la inducción de la monomerización disparada por proteínasceptoras y/o chaperonas. Por el contrario, las 2-C-Grxs no sufren tales cambios (Iwema *et al.*, 2009).

1.8. Metabolismo del hierro

1.8.1. Metabolismo del hierro en el huésped mamífero

En los mamíferos, prácticamente no existe hierro libre disponible en la sangre o en los fluidos extracelulares, sino que éste se encuentra unido a la transferrina o a la hemoglobina en los eritrocitos. Si bien el hierro se mantiene dentro de un sistema cuasi-cerrado siendo los macrófagos las principales células encargadas de reciclarlo, la pérdida de este metal es compensado por su incorporación desde los alimentos. Éste suele encontrarse como Fe^{3+} y debe ser reducido a Fe^{2+} para su absorción, evento que ocurre en la membrana del enterocito (Cheraylil *et al.*, 2010).

En el plasma, el hierro es transportado como Fe^{2+} unido a la glicoproteína plasmática transferrina (Tf), principal fuente de hierro en el torrente vascular y líquido extracelular. Para poder utilizar esta fuente las células poseen receptores endocíticos para Tf. La acidificación del endosoma produce la liberación del hierro unido a la Tf. Tanto el receptor de Tf como la Tf son reciclados por las células. El primero es retornado a la superficie celular y la segunda al plasma. El hierro liberado es reducido por una reductasa férrica y transportado al citosol mediante un transportador de iones divalentes (Sutak *et al.*, 2008). Cuando los niveles de

hierro intracelular son elevados, el mismo es almacenado por un polímero de 24 subunidades capaz de contener hasta 4500 átomos de hierro, la proteína ferritina (Ft).

El metabolismo del hierro se encuentra regulado por dos proteínas IRP (*Iron response elements [IRE]-binding proteins*), IRP1 e IRP2, que se unen a los mRNAs de proteínas relacionadas a la captación, utilización, almacenamiento y eliminación del hierro, aumentando o disminuyendo su traducción según se requiera (Sutak *et al.*, 2008). Al poseer un centro [Fe-S] necesario para su actividad aconitasa, IRP1 actúa como censor del nivel de hierro. Cuando éste desciende, un cambio conformacional producido por el desensamblaje del centro [Fe-S] induce la exposición del dominio de unión a regiones de respuesta a hierro (IREs) permitiendo su unión al mRNA blanco. IRP2 es regulada por ubiquitinación dependiente de hierro (y concomitante degradación proteasómica) (Kelly *et al.*, 2010).

1.8.2. Metabolismo del hierro en tripanosomátidos

En los tripanosomátidos, la maquinaria de utilización del hierro se relaciona estrechamente con el estadio del ciclo de vida. En la etapa sanguínea *T. brucei* utiliza la Tf como fuente de hierro mediante un receptor heterodimérico (ESAG6:ESAG7) de alta afinidad para dicha proteína, que se localiza en su bolsillo flagelar, única región con capacidad endocítica en condiciones de estrés. Los genes codificantes para las proteínas ESAG forman parte de unidades de transcripción policistrónica denominadas sitios de expresión para glicoproteína variable de superficie (VSG, *variable surface glycoprotein*) y son co-transcritas junto con un gen codificante para VSG. El parásito presenta alrededor de veinte sitios de expresión de VSG y cada uno contiene copias funcionales para ESAG6 y ESAG7. El recambio de la cubierta de glicoproteínas es un mecanismo de evasión de la respuesta inmune explotado por *T. brucei* durante la etapa crónica de la infección y cada receptor de Tf codificado por sitios de expresión para VSG diferentes varía en su afinidad por la Tf de distintas especies. Por tanto, el cambio en los sitios de expresión posiblemente le permita al tripanosoma adaptarse a Tfs de distintos huéspedes (Sutak *et al.*, 2008).

Tal vez como consecuencia de gran disponibilidad de glucosa, lo cual le permite prescindir del metabolismo mitocondrial para la obtención de energía y de la anemia producida como parte de la respuesta inmune, *T. brucei* ha evolucionado para requerir relativamente poca cantidad de este micronutriente. Sumado a esto, el parásito es capaz de sobrerregular la

expresión de ESAGs al caer el nivel de hierro en el huésped. Al acidificarse el endosoma, el hierro es liberado y ESAG6:ESAG7 pierde afinidad por la Tf, que es degradada, mientras que sólo el receptor es reciclado a la superficie celular. Aún se desconoce cómo llega el hierro al citosol, pero se presume un mecanismo similar al mencionado para mamíferos en vistas de que existen reductasas férricas putativas, una flavoproteína NADPH-dependiente que podría también efectuar la misma función y varios transportadores de iones divalentes putativos (Kelly *et al.*, 2010).

En la etapa procíclica (aquella presente en el insecto) el parásito requiere la activación óptima de su metabolismo mitocondrial, hecho que implica la producción de una cadena respiratoria completa y de las enzimas del ciclo de los ácidos ticarboxílicos. El cambio metabólico descrito implica la producción de enzimas que contienen centros [Fe-S], como la citocromo c reductasa (complejo III).

En el caso de *Leishmania*, se trata de un parásito intracelular que reside en un fagolisosoma de macrófagos. En ese compartimento puede tomar el hierro directamente de la Tf que ingresa a la vía endocítica, no requiriendo un receptor propio, aunque sí una reductasa férrica y un transportador de iones divalentes. *L. amazoniensis* tiene la habilidad de redirigir el endosoma conteniendo Tf hacia la vacuola parasítica garantizando un suministro constante de hierro a los amastigotas replicativos (Kelly *et al.*, 2010). En respuesta, la célula emplea para extraer los iones divalentes del fagolisosoma el transportador Nramp1. El rol de Nramp1 en el control de infecciones por patógenos intracelulares es ampliamente reconocido (McDermid y Prentice, 2006). En definitiva, podría especularse que en el estadio amastigote *Leishmania* poseería un sistema efectivo de captación de hierro para sobrellevar la privación de hierro impuesta por el hospedero (Sutak *et al.*, 2008).

Poco se sabe en relación a la adquisición de hierro en *T. cruzi*, pero dado el amplio espectro de huéspedes y de células que es capaz de infectar es posible que utilice diversas estrategias. Además, al habitar en el citoplasma del huésped puede incluso recurrir a la Ft como suministro.

En cuanto a la utilización de grupo hemo, los tripanosomas lo incorporan directamente en sus apoproteínas en vistas de que carecen de proteínas homólogas a la hemo-oxigenasa y a la ferroquelatasa (Kelly *et al.*, 2010) y a que son parcial o totalmente deficientes en las

enzimas necesarias para la biosíntesis de esta molécula (la mayoría de los miembros del género *Trypanosoma* carecen de todas las enzimas, mientras que *Leishmania spp.* y *Crithidia spp.* tienen las enzimas que catalizan los tres últimos pasos de la ruta (Chang *et al.*, 1974, 1975; Salzman *et al.*, 1982). En *T. cruzi* se ha determinado la presencia de una ruta endocítica para su internalización, así como la presencia de transportadores de tipo ABC (aun escasamente caracterizados) que llevan a la acumulación de hemo dentro de organelos de reserva (reservosomas; Cupello *et al.*, 2011; Lara *et al.*, 2007). En *T. brucei* se ha demostrado la capacidad para endocitar hemoglobina, función que depende del receptor de haptoglobina-hemoglobina (HpHbR) localizado en el bolsillo flagelar en la forma sanguínea del parásito (Vanhollebeke *et al.*, 2008). Por otro lado en *L. major* se ha descrito la presencia de un transportador ABC (ABCG5) con la función de rescatar el hemo tras digestión lisosómica (Campos-Salinas *et al.*, 2011).

1.8.3. Rol del hierro en la infección

El metabolismo del hierro cumple un rol protagónico en el transcurso de una infección, existiendo una competencia por los recursos entre el huésped y el hospedador. En el correr de la evolución, los microorganismos han generado varias estrategias para explotar las reservas nutricionales del hospedero, incluidas las de hierro. Entre ellas se encuentra: la ya mencionada expresión de receptores que interactúan con proteínas de unión a hierro del mamífero (siendo la Tf la principal) o la expresión de reductasas que liberan el hierro unido a las mismas; la producción de sideróforos; la utilización de hemolisinas (como la hemo-oxigenasa), por mencionar algunas. Asimismo, muchos microorganismos utilizan varias de estas estrategias simultáneamente, generando sistemas robustos de captación de hierro (Cheraylil *et al.*, 2010; Sutak *et al.*, 2008).

En respuesta, el hospedero ha desarrollado mecanismos para limitar su disponibilidad al patógeno. El ejemplo más evidente es mediado por la hormona hepcidina (Hc), que regula el metabolismo del hierro a nivel sistémico, favoreciendo una condición de anemia transitoria al promover el secuestro del hierro dentro de los macrófagos y enterocitos (Cheraylil *et al.*, 2010). Esta estrategia puede resultar útil en el caso de infecciones por organismos extracelulares (por ejemplo, en el caso de *T. brucei*), pero en el caso de patógenos

intracelulares (tal como *T. cruzi* o *Leishmania*) podría, por el contrario, resultar contraproducente.

Asimismo, en el hospedador, la homeóstasis del hierro es relevante en los mecanismos efectores de la respuesta innata y adaptativa, afectando procesos microbicidas de la inmunidad celular y la humoral dependientes de hierro, tales como el funcionamiento de la óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) y la fagocito oxidasa o bien la linfopoyesis (Cheraylil *et al.*, 2010; Kaufmann *et al.*, 2004).

En vistas del diálogo existente entre el hospedador y el patógeno con respecto al balance del hierro, el estudio de las bases bioquímicas de la homeóstasis del mismo puede proporcionar nuevas estrategias para el combate de enfermedades.

Experiencias previas han demostrado que el tratamiento con quelantes de hierro como la desferroxamina son útiles para el combate de algunos patógenos. En estudios con *T. cruzi* fue demostrado que ratones tratados con desferroxamina o sometidos a una dieta deficiente en hierro presentan una menor parasitemia y mortalidad al ser infectados, y que tratamientos conjuntos con benznidazol y desferroxamina potencian la actividad quimioterapéutica del primero. Esto demuestra la relevancia del hierro en la virulencia de estos parásitos (Arantes *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2008).

El efecto observado se debería a que la sustracción de hierro afecta varias funciones celulares esenciales las cuales dependen de proteínas que utilizan hierro o centros [Fe-S] como cofactor. Altera por ejemplo la síntesis de DNA por déficit en ribonucleótido reductasa, aumenta el estrés oxidativo por pérdida de las superóxido dismutasas (SOD) y la peroxidasa ascorbato-dependiente (APX, aunque habitual de plantas, se presenta en *T. cruzi* y en *Leishmania*), bloquea la síntesis de la base J (-D-hidroximetiluridina) y detiene la transferencia de electrones a través de la oxidasa alternativa (TAO, una oxidasa de ubiquinol que cataliza la reducción del oxígeno a agua sin generar un gradiente de protones, funcionando como una oxidasa terminal citocromo-independiente que es fundamental para la supervivencia en el huésped mamífero; Kido *et al.*, 2010).

1.9. Las glutarredoxinas de los tripanosomas

1.9.1. Glutarredoxinas ditiólicas

En el genoma de los tripanosomas existen dos genes codificantes para 2-C-Grxs (Grx1 y Grx2). Las 2-C-Grxs se encuentran estrechamente relacionadas al metabolismo redox dependiente de T(SH)₂ de estos parásitos.

En *T. brucei* la Grx1 es una proteína citosólica mientras que la Grx2 es una proteína mitocondrial probablemente localizada en el espacio intermembrana. Ambas Grxs son de expresión constitutiva en los distintos estadios de tripanosomas Africanos y tienen actividad reductasa de disulfuros mixtos (aunque la actividad deglutationilasa de la Grx2 es baja) y disulfuros proteicos (caso en que la actividad de la Grx1 es comparativamente menor a la de la Grx2). Ambas proteínas son reducidas por T(SH)₂ con una eficiencia aproximadamente tres órdenes de magnitud superior a la exhibida por el GSH. La mayor capacidad reductora del T(SH)₂ se debería a su carácter ditiólico, a su pK cercano al pH fisiológico (7,4) y a que las proteínas blanco presentan afinidad específica por este ditiol.

La Grx1 puede coordinar un centro [Fe-S] utilizando T(SH)₂ como ligando no proteico (y también Gsp o GSH), lo que induce la dimerización de la proteína. Presenta la particularidad de tener en su sitio activo la secuencia CPYC, cuando la sustitución de Pro por Ser o Gly se creía indispensable para la coordinación de centros [Fe-S] por 2-C-Grxs, como fue observado para la Grx2 humana y Grx1C de álamo. Asimismo, la reconstrucción del centro [Fe-S] sobre la Grx1 provoca la pérdida parcial de la actividad en el ensayo de HED, lo cual sugiere que el centro [Fe-S] podría cumplir un rol regulatorio en la función de la proteína, como se planteó para otras 2-C-Grxs (Feng *et al.*, 2006; Johansson *et al.*, 2007; Lillig *et al.*, 2005; Riondet *et al.*, 2012). Por otro lado, la Grx1, a diferencia de la Grx2, cede electrones eficientemente a la ribonucleótido reductasa, siendo posiblemente un sistema de respaldo para la triparredoxina. La Grx1 también cataliza eficientemente el intercambio tiol-disulfuro entre el T(SH)₂ y el GSSG. Esta reacción podría aportar control catalítico a la reducción de GSSG dada la ausencia de genes para la glutatión reductasa en los tripanosomátidos. Estos hallazgos ponen en evidencia que las 2-C-Grxs de *T. brucei* presentan actividades no redundantes (Ceylan *et al.*, 2010).

1.9.2. Las glutarredoxinas monoti6licas y el rol primordial de la 1-C-Grx1

Los tripanosomas Africanos poseen tres genes que codifican para 1-C-Grxs (1-C-Grx1, 1-C-Grx2, y 1-C-Grx3). Las 1-C-Grx1 y 1-C-Grx2 son prote6nas de dominio 6nico y presentan una secuencia putativa de localizaci6n mitocondrial, mientras que la 1-C-Grx3 se compone de un dominio 1-C-Grx unido por su extremo N-terminal a uno de Trx y carece de secuencia de localizaci6n subcelular (Figura 7; *Comini et al., 2008*).

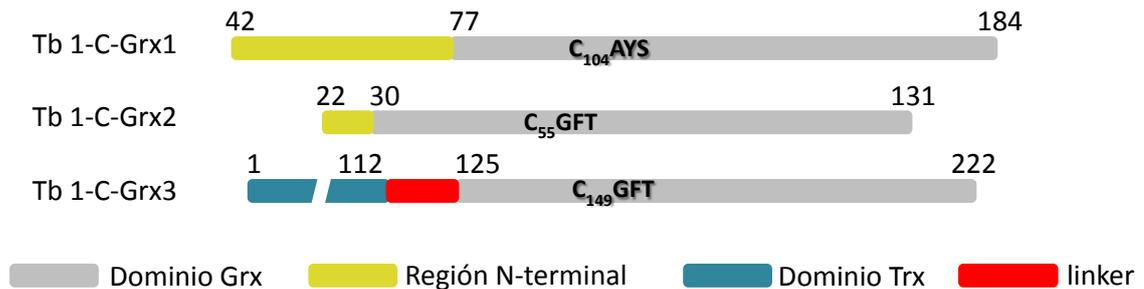


Figura 7. Organizaci6n modular de las glutarredoxinas monoti6licas de *T. brucei*. Se indican los dominios estructurales y funcionales de las 1-C-Grx1, 1-C-Grx2 y 1-C-Grx3 as6 como los motivos de sus sitios activos putativos.

La 1-C-Grx1 de *T. brucei* es una prote6na con una masa te6rica de 15,9 KDa que forma hom6meros no covalentes. La 1-C-Grx2 y la 1-C-Grx3 son prote6nas monom6ricas con masas te6ricas de 12,6 y 24,6 KDa, respectivamente, aunque sus propiedades hidrodin6micas (analizadas por cromatograf6a de exclusi6n molecular) indicar6an una conformaci6n no del todo globular ya que muestran pesos moleculares aparentes mayores. En la 1-C-Grx1 una extensi6n N-terminal de 34 amino6cidos que no pertenece al dominio Grx es responsable de la dimerizaci6n de la prote6na (*Manta et al., 2012*).

El estado oligom6rico de la 1-C-Grx1 es influenciado por el estado redox de sus Cys. 6sta prote6na presenta dos grupos tiol en su secuencia: la Cys¹⁰⁴ (que pertenece al sitio activo putativo CAYS) y la Cys¹⁸¹, de localizaci6n pr6xima al carboxilo terminal. Al ser oxidada con GSSG o H₂O₂ la prote6na forma especies con masas aparentes de 32 y 44 o 48 KDa as6 como pol6meros covalentes de alto peso molecular. La especie de 32 KDa se corresponde con una mezcla de la prote6na reducida, mono y di-glutationilada y sobreoxidada (a 6cido sulf6nico). Los picos a 44 o 48 KDa se componen de especies proteicas dim6ricas unidas por enlaces disulfuro intramoleculares que provocan un cambio conformacional sustancial elevando su peso molecular aparente. Al tratarse de un estado reversible, la formaci6n de este enlace

disulfuro protegería principalmente a la Cys¹⁰⁴ de la sobreoxidación. El mecanismo que da lugar a la formación del disulfuro intramolecular involucraría la generación de un disulfuro mixto entre la Cys¹⁸¹ y GSH o un ácido sulfénico cuando el oxidante es GSSG o H₂O₂, respectivamente; seguidamente el tiol del sitio activo realizaría un ataque nucleofílico sobre la Cys¹⁸¹ oxidada dando lugar a la formación del enlace disulfuro y la concomitante liberación de GSH y H₂O, respectivamente (Comini *et al.*, 2008; Filser *et al.*, 2008; Melchers *et al.*, 2007). La Cys¹⁸¹ también puede ser S-(glutathionil)espermidinilada (Melchers *et al.*, 2007). Si bien la proteína reacciona con T(SH)₂ (Filser *et al.*, 2008), la naturaleza ditiólica de este compuesto impide que éste forme disulfuros mixtos estables con esta o alguna otra proteína blanco (Melchers *et al.*, 2007). La proteína ortóloga en otros tripanosomátidos, *e.g.* *T. cruzi*, sólo presenta una única Cys en su secuencia, la correspondiente al sitio activo, lo que plantea que de existir *in vivo* dicho mecanismo de regulación redox de la actividad, sólo sería factible para la 1-C-Grx de parásitos del complejo *brucei* (Comini *et al.*, 2008).

Asimismo, todas las especies oxidadas pueden ser reducidas por la triparredoxina así como por elevadas concentraciones de T(SH)₂. El tratamiento con GSH, por el contrario, logra reducir el disulfuro intramolecular pero no el disulfuro mixto formado sobre la Cys¹⁸¹. El par T(SH)₂/triparredoxina es probablemente el responsable de mantener a la proteína en su estado reducido a nivel fisiológico (Filser *et al.*, 2008).

Estudios llevados a cabo con la proteína recombinante verificaron que *in vitro* la 1-C-Grx1 es capaz de coordinar un centro del tipo [2Fe-2S] (con picos de absorción característicos a 320 y 420 nm) utilizando GSH como ligando no proteico, estructura que es destruída por H₂O₂. No obstante, a diferencia de lo observado para la mayoría de las 1-C-Grxs que oligomerizan en torno al centro [Fe-S], la holo-forma de la 1-C-Grx1 de *T. brucei* es dimérica (Comini *et al.*, 2008).

La 1-C-Grx1 cumpliría un rol esencial en la homeóstasis redox y en el metabolismo del hierro. En experimentos con *T. brucei*, no fue posible obtener parásitos en los que se silenciara completamente la expresión de la 1-C-Grx1. Asimismo, una disminución del 70 % del contenido de la 1-C-Grx1 no fue acompañada por un aumento en la expresión de la 1-C-Grx2 (también mitocondrial) lo que indica que no existe solapamiento funcional entre las 1-C-Grxs del parásito (Comini *et al.*, 2008). Sumado a esto, la 1-C-Grx1 fue la única 1-C-Grx del parásito capaz de revertir parcialmente el fenotipo del mutante Grx5 de *S. cerevisiae* en

ensayos de complementación. Estas dos proteínas comparten un 29 % de identidad de secuencia, lo que en principio podría explicar la incapacidad de la 1-C-Grx1 para sustituir completamente a la proteína auténtica. No obstante, la Grx3 de levadura (un híbrido de 1-C-Grx/Trx de localización nuclear) con un 28 % de identidad de secuencia a la Grx5, logra reemplazar la función de esta última cuando es sobreexpresada en la mitocondria, hecho que habla de una clara divergencia funcional y/o estructural de las 1-C-Grxs de los tripanosomátidos (Filser *et al.*, 2008). Estos hallazgos parecen involucrar a las 1-C-Grxs como componentes de esta maquinaria de biogénesis y en particular a la 1-C-Grx1 como un componente esencial en la síntesis mitocondrial de centros [Fe-S].

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Caracterizar bioquímicamente la glutarredoxina monotiólica 1 de *T. cruzi* (Tc1-C-Grx1), de manera de evaluar su posible relevancia en el metabolismo de centros ferrosulfurados en el parásito y generar las bases para futuros proyectos de perspectiva biológica y farmacológica.

2.2. Objetivos específicos

- 1.** Clonado de la Tc1-C-Grx1 de la cepa Tulahen 2 sin secuencia de localización mitocondrial. Generación de mutantes de delección ($\Delta 77$) y puntuales (C105S) y subclonado en vectores para expresión en procariontes.
- 2.** Optimización de las condiciones de expresión y purificación de la proteína recombinante silvestre y mutantes.
- 3.** Caracterización bioquímica de la proteína en cuanto a su estado oligomérico, pKa de cisteína de sitio activo y actividad oxidorreductasa.
- 4.** Ensayos de cristalogénesis y optimización de condiciones de cristalización.
- 5.** Ensayos *in vitro* de coordinación de centros ferrosulfurados con la proteína recombinante.
- 6.** Evaluación de la expresión de la proteína en los diferentes estadios del ciclo de vida de parásitos en cultivo.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Todas las enzimas utilizadas para clonados y subclonados fueron adquiridas en Invitrogen, Fermentas o Roche. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT o Eurofins (ver Tabla 1). Los kits para extracción y purificación de ADN fueron de Sigma-Aldrich, Macherey Nagel, General-Electric (GE) o Vivo. La secuenciación de DNA fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Los reactivos ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol (β -ME), glutatión reducido (GSH), mono(glutationil)espermidina (Gsp), cloruro férrico (FeCl_3), sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico) (DTNB), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) así como los inhibidores de proteasas pepstatina A, el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y *N*- α -tosil-L-lisilclorometilcetona (TLCK) se compraron a Sigma-Aldrich, mientras que el monobromobimano (mBBBr) (Kosower *et al.*, 1987) en Molecular Probes, Invitrogen. El tripanotión reducido ($\text{T}(\text{SH})_2$) se produjo y purificó acorde a lo descrito previamente (Comini *et al.*, 2009). Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica.

3.2. Producción de proteínas recombinantes

3.2.1. Clonado de *Tc 1-C-Grx1* y generación de versiones mutantes

El marco abierto de lectura correspondiente al gen de *Tc 1-C-Grx1* fue amplificado a partir de ADN genómico de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* utilizando los oligonucleótidos A y B que presentan sitios de restricción para las endonucleasas *NcoI* y *KpnI*, respectivamente (Tabla 3). El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia putativa de la proteína de interés identificada en el genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener (El-Sayed *et al.*, 2005) por homología de secuencia con la ortóloga en *T. brucei* (Filser *et al.*, 2008) incluyendo, en una primera instancia, la secuencia de localización mitocondrial (MTS) predicha (residuos 1 a 27). El gen amplificado fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y utilizado para producir la versión completa sin MTS (*full length*, FL) empleando los oligonucleótidos C y B. La secuencia que codifica para el dominio 1-C-Grx de la proteína, denominada forma corta o $\Delta 77$, se obtuvo mediante digestión de la secuencia FL con las enzimas *NcoI* y *KpnI*. Esta estrategia

saca ventaja de la presencia de un sitio de corte *Nco*I intrínseco a la secuencia de *Tc* 1-C-Grx1 que precede a la región con alta identidad de secuencia para el dominio 1-C-Grx.

Los sitios de restricción para las enzimas *Nco*I y *Kpn*I introducidos por los oligonucleótidos o presentes en las secuencias fueron utilizados para el posterior subclonado de las mismas dentro del vector de expresión para procariontes pET-Trx-1b (EMBL Heidelberg, Gunter Stier, no publicado, ver más adelante). Para la generación del mutante C105S se realizó mutagénesis sitio-dirigida mediante el método del *megaprimer*, utilizando como molde el vector conteniendo la forma FL y los oligonucleótidos D y B, resultando en el reemplazo de la Cys105 (numeración correspondiente a la secuencia completa de la proteína) por Ser (ver más adelante).

La amplificación de las diferentes secuencias de interés se realizó por PCR utilizando, en general, 50 ng de ADN molde, 0,4 µg de los oligonucleótidos específicos (ver Tabla 3) y 0,2 µM de cada uno de los desoxinucleótidos (dNTA, dNTT, dNTG, dNTC) y 5 U de la polimerasa Platinum Taq (Invitrogen) en el amortiguador optimizado correspondiente en un volumen final de 50 µL. La reacción se realizó en un termociclador utilizando un programa de tres pasos: 1) desnaturalización: 94 °C por 2 minutos; 2) extensión: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, 1 minuto de hibridación a la temperatura adecuada dependiendo de los oligonucleótidos utilizados, usualmente entre 55 y 65 °C, y elongación a 72 °C durante 1 minuto; y 3) elongación final: a 72 °C por 10 minutos. Los amplicones se separaron en un gel de agarosa 1,2-2 % p/v dependiendo del peso del producto esperado y luego se purificaron ya sea desde la reacción de PCR o desde la banda del gel utilizando *kits* comerciales.

Los productos de PCR fueron ligados directamente en el vector pCR2.1-TOPO que presenta desoxitimidinas complementarias con las desoxiadenasinas de los extremos 3' generados por acción de la polimerasa. La ligación procedió a temperatura ambiente y por 16-20 horas (ON) en presencia de la T4 ADN ligasa (Roche) que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los grupos OH en 3' y los fosfato en 5'. La reacción se realizó utilizando 50 ng de vector y 250 ng del producto de PCR junto con 1 U de ligasa en amortiguador correspondiente y en un volumen final de 10 µL. El vector ligado y su control correspondiente se transformaron por *shock* térmico en células *E. coli* cepa DH5α quimiocompetentes (Invitrogen) de acuerdo al siguiente protocolo: se agrega 1-5 µL de la reacción de ligación a 50 µL de bacterias competentes, se mezcla suavemente y se incuba en

hielo por 30 minutos. Pasado este tiempo se incubaba a 42 °C durante 30 segundos y se transfirió a hielo por 5 minutos adicionales. Se agregan 300 µL de medio SOC (detallado como tryptona 2 % p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 8,6 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) y se incuban los tubos a 37 °C por 1 hora a 220 rpm. Pasado ese tiempo se siembran 100 µL de la transformación en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y X-gal 40 µg/mL las cuales se incuban ON a 37 °C.

En general, tres colonias recombinantes blancas fueron seleccionadas para su posterior análisis de restricción. Para ello, las colonias se subcultivaron en LB líquido (detallado como 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 10 g/L de NaCl) agregado de ampicilina a 100 µg/mL durante 16 horas y el ADN plasmídico se purificó mediante *kit* para minipreparación. La presencia del inserto en el vector se confirmó mediante digestión con *EcoRI* (Invitrogen), cuyas secuencias de restricción flanquean el sitio de inserción del producto de interés. Para la reacción se utilizó 1µg de plásmido, junto con 10 U de enzima, en amortiguador apropiado (*React 3*) y un volumen final de 20 µL, durante 6 horas a 37°C y su resultado se visualizó en un gel de agarosa 1-1,2 % p/v teñido con bromuro de etidio. Los vectores confirmados como positivos fueron secuenciados usando los oligonucleótidos genéricos para el promotor y el terminador del fago T7 (UBM, IPMont) cuyas secuencias complementarias se encuentran flanqueando el MCS (*multiple cloning site*) en el vector pCR2.1.

El subclonado de los genes de interés en el vector de expresión pET-Trx 1b se realizó mediante el uso de enzimas de restricción específicas. Brevemente 1-2 µg del vector pCR2.1 conteniendo el inserto secuenciado o bien el vector pET-Trx 1b fueron digeridos con 10 U de las enzimas de restricción *KpnI* (Invitrogen) y *NcoI* (Roche) en amortiguador *React 4* a 37 °C durante la noche. Los productos digeridos se purificaron a partir de un gel de agarosa 1 % p/v con *kits* comerciales. 50 ng del vector pET-Trx 1b linealizado y 250 ng de inserto se ligaron con 1 U de T4 ADN ligasa en las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente se transformaron bacterias *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS de acuerdo al protocolo descrito en la sección 3.2.2.

Para la generación del mutante C105S se procedió de la siguiente manera. En la primera PCR se preparó un tubo conteniendo 10 ng de pET-Trx-Tc 1-C-Grx1 FL, 0,4 µM de cada primer, 0,2 µM de cada dNTP y 2 U de la polimerasa Phusion Taq (Thermo; que no adenila los productos de PCR) en el amortiguador optimizado correspondiente y agregado de agua

hasta un volumen final de 50 μ L. El programa utilizado de este es: 1) desnaturalización a 98 $^{\circ}$ C por 2 minutos; 2) 30 ciclos de 98 $^{\circ}$ C por 10 segundos, 65 $^{\circ}$ C durante 30 segundos y 72 $^{\circ}$ C durante 45 segundos; 3) extensión final a 72 $^{\circ}$ C por 5 minutos.

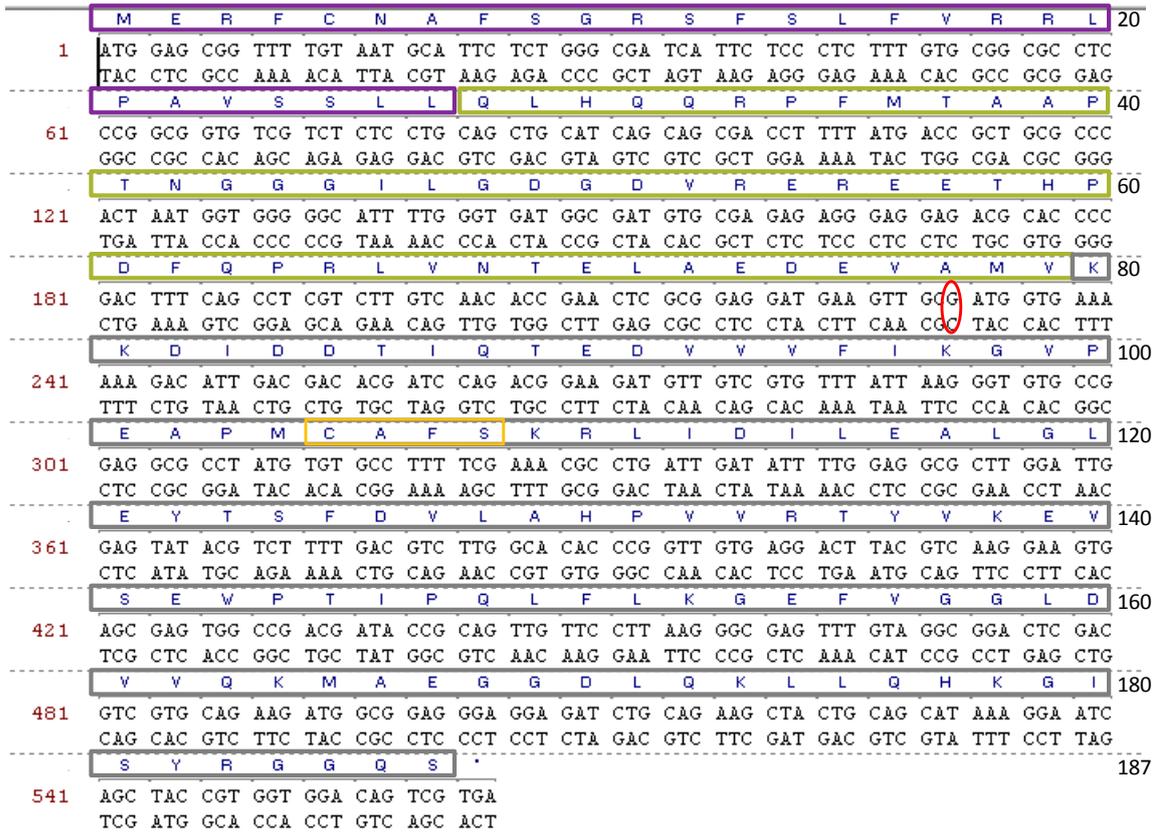
El producto de interés se separó en un gel de agarosa 2 % p/v y se purificó mediante un *kit* comercial. Este amplicon fue utilizado como oligonucleótido reverso en la segunda etapa de PCR que incluyó el oligo C para generar la proteína completa mutada. En esta oportunidad se utilizó la polimerasa Platinum Taq (Invitrogen) y el siguiente programa de amplificación: 30 ciclos de desnaturalización a 94 $^{\circ}$ C por 30 segundos, hibridación a 68 $^{\circ}$ C por 1 minuto y extensión a 68 $^{\circ}$ C por 2 minutos; incluyendo una extensión final de 10 minutos a 68 $^{\circ}$ C.

El producto de PCR obtenido fue purificado desde la reacción, ligado en el vector pGEM-T easy (Promega) y posteriormente insertado en el vector pET-Trx 1b de igual manera que en el caso de la forma FL WT (ver más adelante). Las secuencias de las nuevas construcciones fueron confirmadas por secuenciación (UBM, IPMont).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el clonado de las diferentes formas de la Tc 1-C-Grx1

Nombre	Ref.	Secuencia	Sitio de restricción	Tm ($^{\circ}$ C)	Origen
Fo Tc1CGrx1+MTS	A	5'- <u>CCATGG</u> AGCGGTTTTGTAATGCATTC-3'	NcoI	63,1	
Re T1CGrx1+stop	B	5'- <u>GGTACC</u> TCACGACTGTCCACCACGGTAG-3'	KpnI	65,2	Eurofins
Fo Tc1CGrx1-MTS	C	5'-T <u>ACCATGGG</u> GACAGCTGCATCAGCAGCGACCT-3'	NcoI	68,6	IDT
Fo Tc1CGrx1C105S	D	5'-CCGGAGGCGCCTATGTCTGCCTTTTCGAAAC-3'	-	72,1	Eurofins

A



B

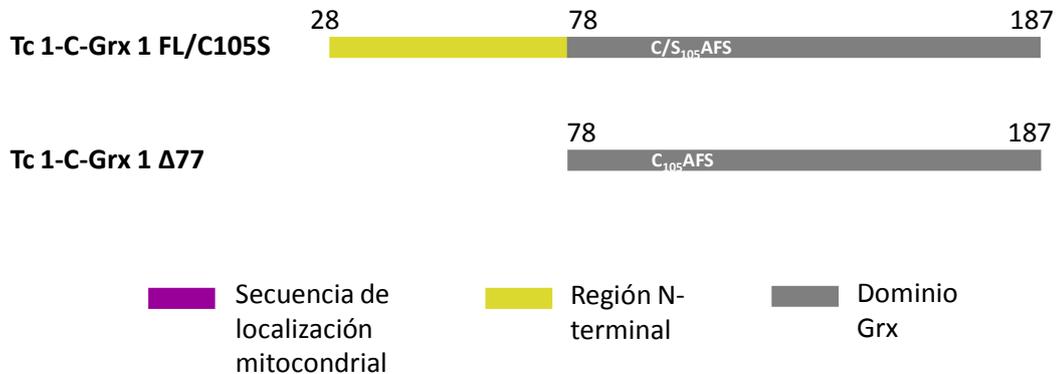


Figura 8. A. Gen de la 1-C-Grx1 de *T. cruzi* cepa CL Brener. Sobre la secuencia de ADN se indica la correspondencia aminoacídica. La elipse roja señala el sitio mutado para eliminar el sitio de restricción *Nco*I (CCATGG). A la izquierda de la secuencia se indica la numeración de la secuencia nucleotídica. A la derecha, la numeración de la secuencia polipeptídica. **B. Esquemas de las proteínas expresadas.** Las construcciones para expresión en *E. coli* no contienen la secuencia de localización mitocondrial. La proteína *full length* (FL) presenta un dominio Grx (gris) y una región N-terminal conservada en 1-C-Grxs de tripanosomátidos. La proteína Δ 77 comienza en la Met78, careciendo de los primeros 77 aminoácidos correspondientes a la secuencia de localización mitocondrial y a la región N-terminal no-Grx. En violeta se resalta la secuencia de localización mitocondrial, en verde la región N-terminal y en gris el dominio Grx.

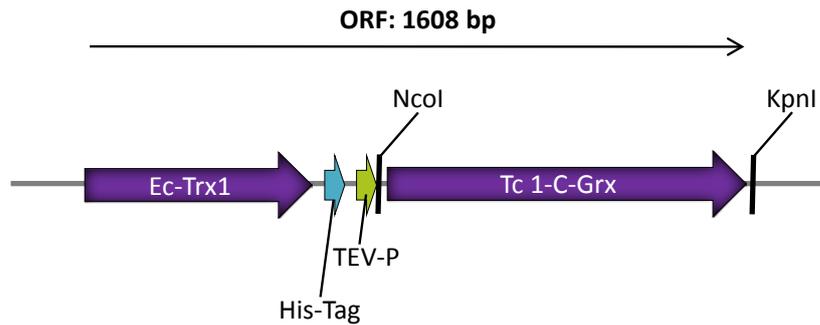


Figura 9. Construcción en vector de expresión pET-Trx. La secuencia de la Tc 1-C-Grx1 está inserta entre los sitios de restricción para *NcoI* y *KpnI*. El producto de expresión consiste en la proteína de interés fusionada

a la tiorredoxina 1 de *E. coli* (Ec-Trx1). Una cola de 6 histidinas (His-Tag) y un sitio de corte para la proteasa del virus del gravado del tabaco (TEV-P). ORF: marco abierto de lectura del híbrido Ec-Trx1/Tc 1-C-Grx1 expresada por el vector pET-Trx.

3.2.2. Preparación y transformación de *E. coli* BL21(DE3) competentes

Las bacterias a transformar fueron crecidas en 5 mL de medio LB, a 37 °C y 220 rpm, durante la noche en ausencia de antibiótico. En algunos casos se trabajó con la cepa BL21(DE3)pLysS para lo cual se agregó cloranfenicol 34 µg/mL al medio. Las bacterias crecidas ON fueron inoculadas a 50 mL del mismo medio en una relación 1:50 y este cultivo se incubó a 37 °C y 220 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (A_{600}) de 0,4. A continuación las células se incubaron 20 minutos en hielo, se recuperaron por centrifugación a 3000 x g y 4 °C por 10 minutos y se resuspendieron en 5 mL de CaCl₂ 0,1 M a 4 °C y estéril. Luego de incubar la suspensión celular por 30 minutos en hielo, se centrifugó a 1000 x g y a 4 °C por otros 10 minutos y finalmente las células se resuspendieron en 1 mL CaCl₂ 0,1 M en baño de hielo. 250 µL de la suspensión celular fueron transferidos a un tubo plástico (ependorf) e incubados 30 minutos en hielo con 1-5 µL del plásmido de interés. Cumplido este tiempo, las células se transformaron por *shock* térmico a 42 °C por 2 minutos, seguido de 5 minutos de incubación en hielo. Inmediatamente, se agregaron 500 µL de medio LB a temperatura ambiente y se incubó por un lapso de 1 hora a 37 °C y 220 rpm. Finalmente el total de células transformadas se plaquearon en LB-agar con agregado de ampicilina (100 µg/mL) o kanamicina (50 µg/mL) según la resistencia conferida por el vector. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Como control de viabilidad, se realizó siembra en placas de LB-agar sin antibiótico.

3.2.3. Expresión y purificación de distintas variantes de la Tc 1-C-Grx1 recombinante

Las proteínas Tc 1-C-Grx1 FL Δ 77 y FL C105S fueron expresadas a partir de las construcciones en pET-Trx 1b y empleando bacterias *E. coli* de la cepa BL21(DE3). El vector pET-Trx 1b permite la expresión de la proteína de interés como un producto fusionado en posición C-terminal a tiorredoxina (Trx1) y separado de ésta por una secuencia de 26 aminoácidos que incluye una secuencia de 6 histidinas seguida de un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV-P) (ver figura 9), lo que facilita su posterior purificación por cromatografía de afinidad por metales (IMAC; ver Figura 10). La expresión se realizó según lo reportado para el ortólogo de *T. brucei* (Comini *et al.*, 2008), con algunas modificaciones. Brevemente, las células fueron crecidas en medio 2YT (detallado como 20 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptosa y 5 g/L de NaCl) con 50 μ g/mL de kanamicina a 37 °C con agitación orbital a 220 rpm hasta una A_{600} de 0,6-0,8. En este punto se realizó la inducción con 200 μ M IPTG y se cultivó durante ON manteniendo con agitación (220 rpm) y a una temperatura de 20 °C. Al cabo de este tiempo, las células fueron cosechadas por centrifugación (10 min, 4000 x g, 4 °C), resuspendidas en amortiguador de lisis (amortiguador fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8 suplementado con 1 mg/mL de lisozima (AppliChem), 1 mM PMSF, 40 μ g/mL TLCK, 150 nM pepstatina y 4 nM cistatina) en una relación de 5 mL de amortiguador por gramo de *pellet* húmedo. Las suspensiones fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Las bacterias fueron desintegradas por sonicado y la fracción soluble separada de los detritos celulares por centrifugación a 20000 x g y 4 °C por 1 hora y clarificada por filtración con filtro de 0.45 μ m. Las proteínas se purificaron según protocolo estándar para proteínas con cola de histidinas (Figura 10). La fracción soluble se sembró en una columna HisTrap (GE Healthcare), previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,8 (amortiguador A). La columna se lavó con cinco volúmenes del mismo amortiguador con agregado de 20 mM imidazol. Para el mutante C105S el lavado se realizó sin imidazol en vistas de su afinidad reducida por la matriz cromatográfica en comparación con las otras formas de la proteína recombinante. Las proteínas unidas a la resina de níquel fueron eluidas con amortiguador A con agregado de 500 mM imidazol (amortiguador B).

La fracción correspondiente al eluido conteniendo la proteína de fusión fue sometida a proteólisis con TEV-P recombinante (1 mg por cada 35-70 mg de proteína total) en presencia

de 2 mM EDTA y 5 mM DTT. Esta proteasa es producida en nuestro laboratorio (como se detalla en la sección 3.2.4). El proteolizado fue dializado extensamente contra amortiguador A de manera de eliminar el imidazol presente en el eluido, permitiendo un segundo paso de purificación por IMAC en donde se retiene la Trx de fusión y contaminantes menores. La fracción no unida en esta segunda IMAC, que posee a la proteína de interés, fue concentrada y sometida a una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna HiLoad Superdex 75 16/60 (GE) previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM pH 7.4 (amortiguador SEC), acoplada a un equipo de cromatografía líquida de baja presión (ÄKTA, GE, Unidad de Proteínas Recombinantes, IPMont). Las diferentes fracciones de los distintos pasos cromatográficos fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con geles de 15 (para las formas largas) o de 17 % p/v acrilamida (para las formas cortas) teñidos con azul de coomasie.

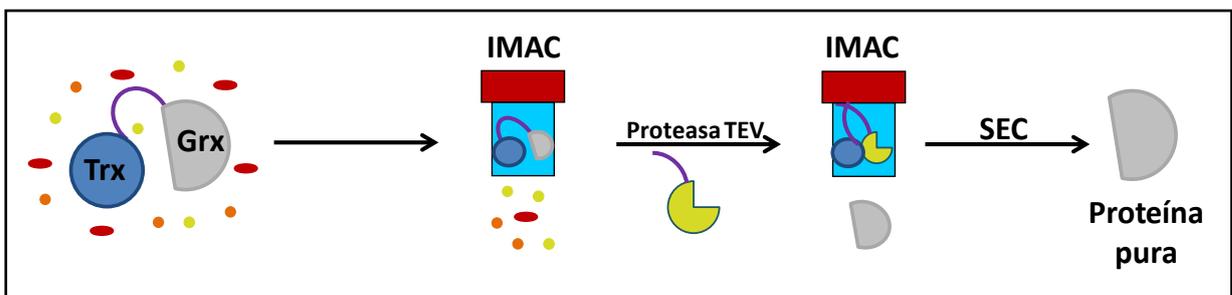


Figura 10. Purificación de Tc 1-C-Grx1. La proteína se obtiene con alto grado de pureza tras dos pasos de cromatografía de afinidad por metales (IMAC), un paso intermedio de proteólisis con TEV-P y un paso final de *polishing* por filtración en gel (SEC).

3.2.4. Expresión y purificación de la Proteasa del Virus del Gravado del Tabaco

El vector pTH24 con el gen de la proteasa del virus TEV fue gentilmente cedido por el Dr. Trajtenberg (van der Berg *et al.*, 2006) y usado para transformar *E. coli* cepa Rosseta(DE3)pLysS. La expresión de la proteína se realizó según el siguiente protocolo. Las células transformadas fueron crecidas en medio 2YT con 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol, a 37 °C con agitación orbital a 220 rpm hasta una A_{600} de 0,6-0,8. En este punto se realizó la inducción con IPTG 1 mM ON en condiciones de temperatura y agitación de 25 °C y 220 rpm, respectivamente. Al finalizar la inducción las células fueron cosechadas y resuspendidas en amortiguador de lisis tal como se describió previamente. Las suspensiones fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización. Para la purificación de la proteasa la suspensión celular se sonicó y clarificó en condiciones idénticas a las especificadas para la Tc

1-C-Grx1. El extracto clarificado se sembró en una columna HisTrap (GE), previamente equilibrada con amortiguador A acoplada a un equipo de cromatografía líquida de baja presión. El eluido de la proteína se realizó con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM en amortiguador A. El proceso se analizó por SDS-PAGE 12 % y, finalmente, las fracciones enriquecidas en la proteasa se concentraron por ultrafiltración (Millipore, 30 MWCO) y se guardaron a -80 °C en amortiguador B con 10 % v/v de glicerol a una concentración final de aproximadamente 1 mg/mL. En estas condiciones la proteasa es estable y activa hasta un año después de su producción.

3.2.5. Expresión y purificación de la desulfurilasa de cisteína de *E. coli*

El vector pET28a con el gen de la desulfurilasa de cisteína de *E. coli* fue gentilmente cedido por el Dr. Carsten Berndt (Berndt *et al.*, 2006) y usado para transformar células BL21(DE3)pLysS. Para la expresión de la proteína recombinante, las células fueron crecidas en medio Terrific Broth (TB, detallado como 24 g/L extracto de levadura, 12 g/L triptona, 4 mL/L glicerol, 17 mM KH₂PO₄ y K₂HPO₄, pH 7,4) con agregado de kanamicina 50 µg/mL y crecido a 37 °C y 220 rpm hasta una A₆₀₀ de 0,6-0,8. Previo a la inducción, el cultivo se dejó reposar a 4 °C por 30 minutos y el medio se suplementó con 100 µM piridoxal fosfato (PLP, Sigma-Aldrich) y 100 µM FeCl₃. La inducción se realizó con agregado de 100 µM IPTG e incubación a 15 °C y a 180 rpm, ON. Las células se cosecharon como fue descrito (sección 3.2.3.) y se almacenaron a -80 °C. La disrupción de las células y la clarificación del lisado se efectuaron tal como se comentó anteriormente. La purificación de la proteína se realizó por IMAC (sección 3.2.3). En este caso el lavado y el eluido se realizaron con amortiguador A con agregado de imidazol 20 mM y 500 mM, respectivamente. La proteína se incubó con 100 µM PLP durante 1 hora a temperatura ambiente de manera de asegurar que no quede proteína carente de su cofactor. Posteriormente, se dializó contra amortiguador A durante la noche a 4 °C en una membrana de diálisis de 12.400 MWCO (Sigma). Finalmente, la proteína se concentró y su concentración se determinó por medida de absorbancia a 280 nm ($\epsilon = 39700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Berndt *et al.*, 2006). La proteína se almacenó a una concentración de 570 µM a -80 °C en amortiguador A con 10 % de glicerol.

3.3. Técnicas analíticas

3.3.1. Cuantificación de proteína

Las diferentes versiones de Tc 1-C-Grx1 recombinante purificadas fueron cuantificadas espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorptividad a 280 nm determinado experimentalmente. Brevemente, se midió por triplicado la absorbancia a 280 nm para una concentración de proteína de aproximadamente 50 μM con o sin agregado de cloruro de guanidinio a una concentración final de 6 M en amortiguador A. La concentración aproximada de la proteína fue calculada a partir de su valor de absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de absorptividad teórico provisto por el servicio ProtParam (ExpASy). El valor teórico de ϵ_{280} para la proteína desnaturalizada se calculó de acuerdo a Pace (1995):

$$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] = 5500 \times n_W + 1490 \times n_Y + 125 \times n_{SS}$$

donde n_W , n_Y y n_{SS} son el número de triptófanos, tirosinas y disulfuros en la estructura primaria. El valor de ϵ_{280} para la proteína nativa (ϵ_N) en el amortiguador A se determina de acuerdo a la relación:

$$A_N/A_D = \epsilon_N/\epsilon_D$$

Donde A_N es la absorbancia de la proteína nativa, A_D de la proteína desnaturalizada y ϵ_D es el coeficiente de absorptividad de la proteína desnaturalizada calculado a partir de la secuencia peptídica (ProtParam).

3.3.2 Cuantificación de grupos tiol

La determinación de tioles se realizó mediante el método de Ellman. Este método se basa en la reacción del anión tiolato (R-S^-) con el ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB^{2-}). Esto origina un disulfuro mixto (R-S-TNB^-) y un equivalente de tionitrobenzoato (TNB^{2-}), el cual presenta absorción en el visible con un coeficiente de absorptividad molar a 412 nm de $14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a pH por encima de 7,3 (Riddles *et al.*, 1979; Reiner *et al.*, 2002).

3.3.3. Determinación del pKa de la cisteína del sitio activo putativo

La determinación del pKa de la cisteína del sitio activo (única Cys de la proteína) se realizó a través de la reacción específica del tiolato con el electrófilo mBBBr de acuerdo al

procedimiento desarrollado por el Dr. Ferrer-Sueta (Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República) y colaboradores (Sardi *et al.*, no publicado). La alquilación de tioles con mBBr determina la formación de un compuesto fluorescente con emisión máxima característica a 482 nm cuando es excitado a 396 nm. El procedimiento experimental fue el siguiente: las proteínas se redujeron con DTT 5 mM por 1 hora y se separaron por gel filtración en una columna PD10 (GE). En una microplaca para fluorescencia de 384 pocillos (Fluotrack, Greiner Bio One) 2-4 μ M de proteína fue incubada con 1-5 μ M mBBr en un buffer Tris-MES-Acético (TMA) conteniendo 15 mM Tris, 7,5 mM MES, 7,5 mM acetato y 135 mM NaCl. Se lograron diferentes pHs en el rango de 2 a 9 mediante el agregado de cantidades discretas de HCl 15 mM o de NaOH 15 mM. El buffer TMA permite mantener la fuerza iónica constante (0,15 M) a lo largo de todo el intervalo de pH. La reacción fue comenzada por la adición del mBBr utilizando el dispensador automático del lector de microplacas (Varioskan, Thermo-Fisher Scientific) y los cambios temporales de fluorescencia fueron registrados en las 16 condiciones de pH con un lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific) a temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Las pendientes de los gráficos de intensidad de emisión a 482 nm en función del tiempo son proporcionales a las velocidades iniciales (v_0) de la reacción. Las curvas de v_0 en función de pH fueron ajustadas a un modelo conteniendo tres procesos de ionización (ver al final de esta sección). De manera de utilizar valores comparables entre experimentos, el valor de la pendiente fue normalizado por las concentraciones iniciales de tiol y de mBBr.

$$\text{Función de tres pK: } v = \frac{\frac{R}{10^{pK1+pK2+pK3}} + \frac{RH}{10^{x+pK1+pK2}} + \frac{RH2}{10^{pK1+2x}} + \frac{RH3}{10^{3x}}}{10^{-(3x)} + 10^{-(x+x+pK1)} + 10^{-(x+pK1+pK2)} + 10^{-(pK1+pK2+pK3)}}$$

3.4. Ensayos de reconstitución de centros [Fe-S]

La reconstrucción de centros [Fe-S] se realizó como fue reportado por Berndt *et al.*, 2007 con pequeñas modificaciones, usando la forma recombinante de la IscS de *E. coli* (*Ec* IscS), producida como se comentó anteriormente (sección 3.2.5.). En la mezcla de la reacción se agrega cisteína como dador de sulfuro, sulfato ferroso amoniacal como dador de hierro y GSH, Gsp or T(SH)₂ como ligando tiolico adicional para el Fe²⁺. Bajo atmósfera de argón, se incubó *Tc* 1-C-Grx1 en una concentración 100-200 μ M con 5 mM DTT, 10 μ M PLP y 500 μ M

de los respectivos tioles de bajo peso molecular (GSH, Gsp or T(SH)₂) en amortiguador SEC durante 10 min a temperatura ambiente. Acto seguido, se incorporó 200 μM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, 200 μM cisteína y 2-5 μM *Ec* IscS, y la reacción se dejó transcurrir por 1 hora a temperatura ambiente bajo flujo continuo de argón. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron por 5 minutos a $\geq 14.000 \times g$ y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y degaseado. Inmediatamente, se sometió el complejo reconstruido a gel filtración en una columna Superdex 75 10/300 (GE, Healthcare), equilibrada en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0 con agregado de 200 mM NaCl y acoplada a un ÄKTA FPLC. La elución fue seguida mediante el registro de la absorbancia a 280, 320 y 420 nm.

3.5. Ensayo de reducción de la insulina

La actividad oxidoreductasa de disulfuros fue evaluada mediante el ensayo de reducción de la insulina (Holmgren, 1979). En este ensayo se mide la turbidez causada por la precipitación de la cadena B de la insulina, tras la reducción de los disulfuros intermoleculares que la asocian a la cadena A en la forma nativa de la proteína. La reacción fue llevada a cabo en amortiguador fosfato de potasio 100 mM, 2 mM EDTA, pH 7, con una concentración final de insulina de 130 μM (0,75 mg/mL), 1,5 mM DTT en placa de 96 posillos en un volumen final de 200 μL. Tc 1-C-Grx1 Δ77 y FL fueron ensayadas a concentraciones 20 y 150 μM mientras que como control de actividad oxidoreductasa se utilizó la *Ec* Trx1 en dos variantes, con y sin cola de histidinas, en concentraciones 10 y 20 μM. El desarrollo de turbidez se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 620 nm en un lector de placas Multiscan FC (Thermo). La cinética de la reacción fue analizada a partir de los gráficos de absorbancia en función del tiempo para cada condición ensayada.

3.6. Ensayos de cristalogénesis

Los ensayos de cristalización para la proteína recombinante FL así como para el mutante trunco Δ77 se realizaron en colaboración con la Unidad de Cristalografía de Proteínas del IPMont. En todos los casos las proteínas empleadas presentaron un alto grado de pureza (tras purificación por dos pasos de IMAC y uno de SEC, verificado por SDS-PAGE) y los ensayos de cristalización se realizaron empleando proteína fresca (almacenada a 4 °C por no más de 2 semanas). Para este tipo de ensayo es importante que la proteína se encuentre en

un amortiguador sin sales, las cuales también pueden cristalizar. En este caso las proteínas fueron sometidas a cambio de amortiguador utilizando Amicon Ultra 10 MWCO (Millipore). Para ello, 0,5 mL de proteína concentrada fue diluída 5 veces en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8 y concentrada tres veces por centrifugación a 5000 x g y 4 °C. Las proteínas se concentraron adicionalmente utilizando Vivaspín de 10 MWCO hasta una concentración final de 100 mg/mL aproximadamente. Con asistencia de una unidad robótica (Honeybee 963, Digilab) y utilizando métodos aleatorios se ensayaron diferentes condiciones de cristalogénesis. El barrido inicial se realizó utilizando una estrategia de gota sentada (*sitting drop*) en placas de 96 pocillos. En total se ensayaron 396 condiciones (3 gotas por pocillo). Las placas se incubaron a 20 °C y fueron analizadas periódicamente empleando un microscopio estereoscópico trinocular SZX-16 (Olympus). En el caso de la forma $\Delta 77$, tres condiciones, que en el tamizado inicial resultaron promisorias, fueron elegidas para su optimización manual: Li_2SO_4 0,2 M, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 40 % PEG 400; MgCl_2 0,2 M, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 3,4 M 1,6-hexanediol; MgCl_2 0,2 M, 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 25 % (v/v) propanediol, 10 % (v/v) glicerol. En este caso, se utilizó la estrategia de gota pendiente (*hanging drop*) en volúmenes de 1 mL de “licor madre” y gotas de 1 μL del mismo más 1 μL de proteína. En general, se probaron tres concentraciones de proteína: 50, 75 y 100 mg/mL, y se ensayaron diversas condiciones de pH y amortiguador (Tris 0,1 M pH 8-9, Heppes 0,1 M pH 7-8, Bicina 0,1 M pH 8,4-9), precipitante (PEG4000 20-40 % v/v, PEG6000 10-30 % v/v) y sales (LiSO_4 , MgCl_2 , LiCl). Asimismo se analizó el efecto de la presencia/ausencia de DTT en las muestras. Las placas se incubaron a 20 °C y fueron observadas cada dos semanas aproximadamente.

3.7. Cultivos celulares

En este trabajo se utilizaron parásitos de las líneas CL Brener y DM28 de *T. cruzi*. Los parásitos en el estadio epimastigota fueron cultivados en medio BHI completo (detallado como *brain hart infusión* 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0,4 g/L, Na_2HPO_4 4 g/L o $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,02 g/L con agregado de hemina 0,02 g/L, glucosa 0,2 g/L, penicilina 200.000 U/L) con agregado de 10 % v/v suero fetal bovino (SFB) y mantenidos en estufa a 28 °C con atmósfera de 5 % CO_2 .

Para la generación de los estadios infectivos se realizaron infecciones de células Vero. Las mismas fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, GIBCO) con agregado de 10 % SFB v/v y mantenidas en estufa a 37 °C gaseada con 5 % CO₂. La infección se realizó sobre monocapas de células que alcanzaron un 30 % de confluencia. Los cultivos de *T. cruzi* se dejaron crecer hasta fase estacionaria, se centrifugaron a 1000 x g por 10 minutos, se resuspendieron en medio DMEM sin SFB y los parásitos se dejaron en contacto con las células Vero durante 24 horas en estufa a 37 °C. Pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante del medio conteniendo parásitos (mayoritariamente epimastigotas no infectivos), se lavó la monocapa con PBS y se agregó a las células medio DMEM sin SFB. Los cultivos se observaron diariamente y los parásitos en estadio tripomastigota liberados de las células Vero fueron cosechados por centrifugación del sobrenadante del medio de cultivo (en las mismas condiciones antes mencionadas). La obtención de los parásitos en estadio amastigota se obtuvieron tras cosechar las células Vero infectadas (amastigotas+vero) o bien se obtuvieron axénicos a partir del estadio trypomastigota, tras dejar el sobrenadante con parásitos en este estadio en estufa a 37 °C completamente sellados de manera de evitar el intercambio de gases. En todos los casos, la densidad celular fue determinada por recuento en cámara de Neubauer para lo cual se preparó una dilución adecuada de los parásitos y/o células en p-formaldehído (4 % p/v en PBS), de manera de fijarlos.

3.8. Inmunoensayos

3.8.1 Protocolo de inmunización de ratones para la generación de anticuerpos anti-Tc 1-C-Grx1

Para la generación de anticuerpos específicos anti-Tc 1-C-Grx1 se inmunizaron dos ratones hembra de la cepa BalbC/J de aproximadamente diez semanas de vida (servicio de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, IPMont). El protocolo de inmunización constó de una sensibilización inicial con 100 µg de antígeno (Tc 1C-Grx1 FL) utilizando el adyuvante completo de Freund en una relación 1:1 respecto a la solución del antígeno, y de dos refuerzos a las semanas 3 y 6 utilizando 100 µg de antígeno en conjunto con adyuvante incompleto de Freund en igual relación volumétrica. En la semana 4 se evaluó el título de anticuerpos mediante ensayo de Western blot contra la proteína recombinante FL y

extractos de parásitos. En la semana 8 se realizó el sangrado final de los ratones por punción en seno submandibular de animales previamente anestesiados. El suero se separó de la fracción celular por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.8.2. Ensayo de Western Blot

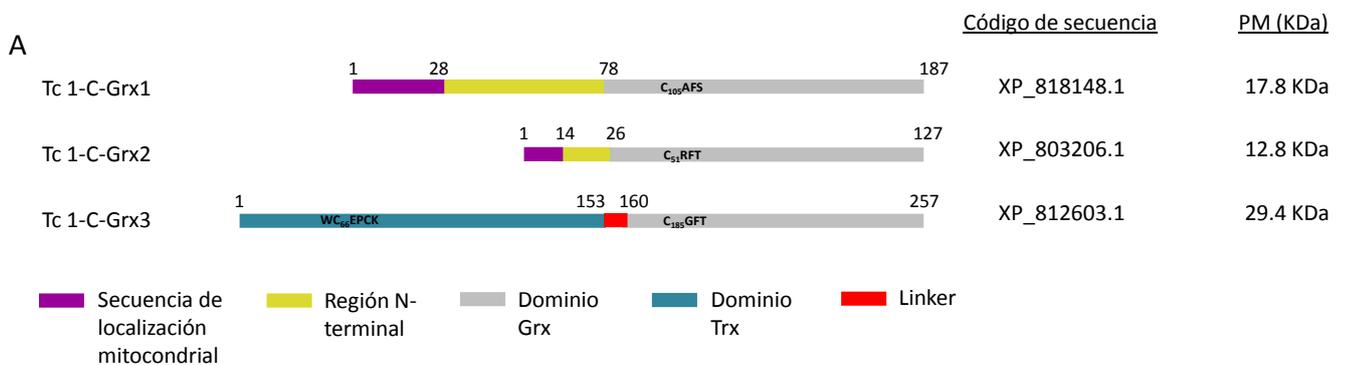
Para verificar la presencia de la forma salvaje de la 1-C-Grx1 en extractos totales de *T. cruzi* correspondientes a diferentes estadios del ciclo de vida (epimastigota, tripomastigota y amastigota) se realizaron ensayos de inmunodetección usando anticuerpos específicos.

Los parásitos fueron crecidos y/o diferenciados como se especifica en la sección 3.7. Luego de su recuento, las suspensiones celulares se centrifugaron a 4000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en solución de lisis (detallado como urea 8 M, 3-[[3-cloroamidopropil]dimetilamonio]-1-propanensulfonato] (CHAPS) 4 % v/v, y DTT 40 mM), se dejó actuar durante 30 minutos en hielo, y finalmente se adicionó amortiguador de carga para electroforesis (Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, glicerol 20 % v/v, SDS 1 % p/v y azul de bromofenol 0,05 % p/v con β -ME 5 % v/v) hasta una densidad de 1×10^6 parásitos/ μ L. Se cargaron 20 μ L (*i.e.* 2×10^7 parásitos) por carril y, una vez completa la electroforesis (40 mA por 90 minutos aproximadamente), el gel fue electrotransferido a una membrana de PVDF (80 V por 2 horas en amortiguador Tris 25 mM, glicina 193 mM pH 8,3). Luego de la transferencia la membrana se bloqueó incubándola en amortiguador PBS (detallado como NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7,4) con 5 % p/v de leche en polvo descremada (Conaprole; PBS-L) durante la noche a 4 °C con agitación orbital a 70 rpm. La incubación con el anticuerpo primario anti-*Tb* 1-C-Grx1 (generado en cobayo) se realizó en PBS-L-Tween 20 al 0,2 % en una dilución 1:500, en tanto que la incubación con el anticuerpo específico anti-*Tc* 1-C-Grx1 (generado en ratón, sección 3.8.1) se realizó en PBS-L sin detergente en una dilución 1:400. Por otro lado, la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de cobayo conjugado a peroxidasa se realizó en PBS-L a una dilución 1:8000 en tanto que el anticuerpo secundario anti-ratón se utilizó en una dilución 1:10000. Todos los lavados se realizaron con PBS. Finalmente se realizó la reacción quimioluminiscente utilizando los reactivos *Pierce ECL Western Blotting Substrate* o *Amersham ECL reagents* (Thermo o GE, respectivamente).

4. Resultados y discusión

4.1. Glutarredoxinas monoti6licas de *T. cruzi*

Al igual que *T. brucei*, el genoma de *T. cruzi* presenta tres secuencias codificantes para 1-C-Grxs (El Sayed *et al.*, 2005; TriTryp DB: <http://tritrypdb.org/tritrypdb>) que en este trabajo denominamos 1-C-Grx1 a 3, en analogía a las descritas anteriormente para el tripanosoma Africano (Comini *et al.*, 2008; Filser *et al.*, 2008). Los genes se encuentran distribuidos cada uno en distintos cromosomas de la cepa CL Brener (cromosomas 33, 37 y 38, respectivamente). Tanto 1-C-Grx1 como 1-C-Grx2 presentan secuencias de localización mitocondrial (MTS por sus siglas en inglés, *mitochondrial targeting sequence*; Figura 11) mientras que 1-C-Grx3 no, y por tanto es probable que presente una localización citos6lica, si bien esto no ha sido demostrado específicamente ni para esta proteína ni para el ort6logo en *T. brucei*.



B

Proteína	Péptido señal	Localización	P	Servidor	link
Tc 1-C-Grx1	MKRFCNAFSGQSFSFLFVRRRLPAVSSLL	Mitocondrial	0,9944	Mitoprot	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html
	MKRFCNAFSGQSFSFLFVRRRLPAVSSLLQL	Mitocondrial	0,894	TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
	HQQRLFMTAAPT HQQRL	Mitocondrial	-	Psort	http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp
Tc 1-C-Grx2	No predecible	No predecible	0,1800	Mitoprot	
	MFASRLLLLRLTRASHGPEKVAPALAASI KDIILKDRVVIFLTGTPEEPRCRF	Mitocondrial	0,701	TargetP	
	MFASRLLLLRLTRA	Mitocondrial	-	Psort	

Figura 11. A) Organización modular de las glutarredoxinas monoti6licas de *T. cruzi*. Se indican los dominios estructurales y funcionales de la 1-C-Grx1, 1-C-Grx2 y 1-C-Grx3 así como los motivos de sus sitios activos putativos, el código de acceso a la secuencia y el peso molecular (PM) de la subunidad. **B) Localización subcelular predicha mediante diversos servidores.** P, probabilidad.

La 1-C-Grx2 posee una secuencia clásica de Grx, que guarda casi un 70 % de identidad de secuencia con su hom6logo de *T. brucei*. La conservaci6n es elevada fundamentalmente a nivel del dominio Grx. Presenta asimismo una regi6n N-terminal corta (residuos 14-26),

donde la conservación de aminoácidos es menor. Si bien al igual que para la proteína de *T. brucei* la Tc 1-C-Grx2 presentaría una localización mitocondrial tentativa, los servidores empleados no predicen esta ubicación con el mismo grado de confianza (el servidor Mitoprot otorga una probabilidad 0.9333 para la Tb 1-C-Grx2 frente a 0.1800 para la Tc 1-C-Grx2).

La 1-C-Grx3 es una 1-C-Grx que presenta una secuencia N-terminal tipo Trx, con un sitio activo con un motivo WCPECK, reminiscente al de Trxs (WCGPCK; Collet *et al.*, 2010). En otras Grxs con una estructura de este tipo (Sc Grx4; Hoffman *et al.*, 2011), se ha visto que el dominio Trx es fundamental para el correcto desempeño de las funciones de la proteína, en vistas de que las 1-C-Grxs de dominio simple no logran sustituirla. Asimismo, como las Trxs interactúan con múltiples proteínas (Berndt *et al.*, 2008; Lindahl *et al.*, 2009) es probable que el dominio Trx sirva como sitio de *docking* para interactores, como ser proteínas que participan en el ensamblaje de centros [Fe-S].

La secuencia de la 1-C-Grx1, por su parte, presenta tres regiones claramente distinguibles, cada una con roles diferentes: un péptido señal comprendido entre los residuos Met1 y Leu27; una región N-terminal comprendida entre Gln28 y Ala77 y un dominio Grx C-terminal comprendido entre Met78 y Ser187 (Figura 11). Tc 1-C-Grx1 comparte aproximadamente el 70% de identidad de secuencia con su equivalente en el parásito *T. brucei*, mientras que la conservación respecto a otros ortólogos de kinetoplástidos es considerablemente menor. Es interesante destacar que el mayor grado de identidad entre ambas proteínas se da en el dominio Grx, mientras que ésta es menor en la primera porción del dominio N-terminal (residuos 1 a 49, donde la identidad ronda el 50 %). Distintos servidores predicen con alto nivel de confianza la presencia en esta región de una secuencia de localización mitocondrial. Mitoprot, el programa que predice esta secuencia con mayor probabilidad, indica que la misma cubre hasta el aminoácido Gln28. Entre el final de dicha secuencia y el comienzo del dominio Grx hay una extensión de 51 aminoácidos, conservada en otras 1-C-Grx1 de kinetoplástidos (Figura 11). Esta región presenta un ordenamiento de aminoácidos muy característica. Tanto es así que al realizar una búsqueda BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando dicha secuencia sólo se recuperan proteínas ortólogas de otros tripanosomátidos. En la Figura 12 se muestra un logo realizado utilizando el recurso WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) en el cual puede apreciarse el nivel de representación aminoacídica para esta región a partir de trece secuencias alineadas. Claramente la secuencia presenta una conservación de aminoácidos importante (cercana al

60 %), sobre todo en la región más cercana al dominio Grx, donde existe predominancia de residuos cargados, fundamentalmente ácidos. Como se verá más adelante, esta región cumple un rol estructural importante determinando la estructura cuaternaria de la proteína.

Es interesante notar que la Tc 1-C-Grx1 presenta una única Cys en su secuencia (C105 en el sitio activo putativo) mientras que la Tb 1-C-Grx1 contiene dos grupos tiol; C104, análogo a C105 en la proteína de *T. cruzi*, y C181 ubicada en el extremo Grx C-terminal (Figura 13). Se ha sugerido que el residuo C181 en la proteína de *T. brucei* juega un rol regulatorio en la proteína visto que se ha observado su unión covalente a GSH y a Gsp. También se la ha involucrado en la formación de enlaces intramoleculares y agregados intermoleculares, como se comentó en la introducción (Comini *et al.*, 2008; Filser *et al.*, 2008; Melchers *et al.*, 2007). La proteína de *T. cruzi* posiblemente prescindiera de este tipo de regulación. En otras glutarredoxinas monotiólicas que tienen capacidad de deglutationilar proteínas o reducir disulfuros proteicos intramoleculares, puntualmente la Grx5 de levadura, se ha propuesto que la presencia de una segunda Cys más C-terminal es fundamental para que la 1-C-Grx pueda desempeñar su función (Tamarit *et al.*, 2011). Es decir, la Cys externa al sitio activo participa en la resolución del disulfuro Grx5-SG o Grx5-proteína blanco. Este es un ejemplo claro sobre cómo un único cambio de aminoácido puede modular y/o modificar la actividad de una proteína permitiéndole cumplir actividades nuevas y específicas dentro del metabolismo celular. Por lo tanto, si bien *a priori* podría pensarse que la 1-C-Grx1 de *T. cruzi* y *T. brucei* poseen funciones similares, esto podría no ser correcto.

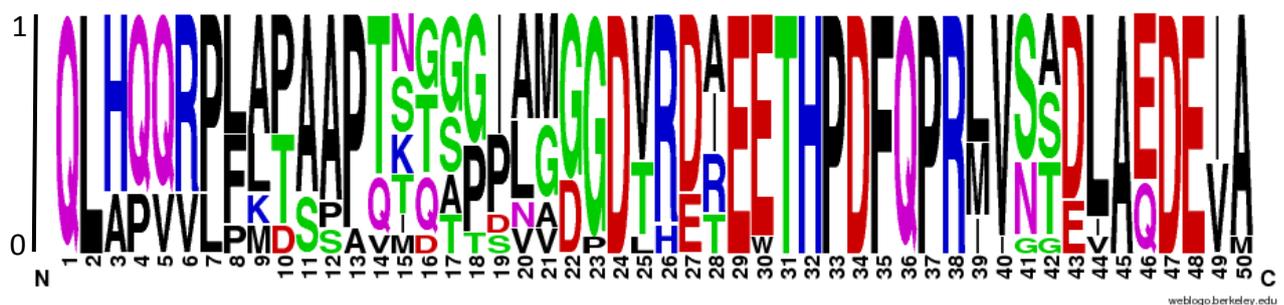


Figura 12. Logo del péptido N-terminal. El tamaño de la letra indica la frecuencia de cada residuo. Se realizó un BLAST con la secuencia de Tc 1-C-Grx1 CL Brener como molde de búsqueda, obteniendo 13 secuencias no redundantes de proteínas ortólogas de kinetoplastidos (*T. cruzi* CL Brener, Q4DOD1, O4DOD1; *T. cruzi* sylvio, E7L9V5; *T. congolense*, F9W4P2; *T. brucei*, Q2UZM9; *T. brucei brucei* 927, Q38FH2; *T. brucei gambiense*, C97XG5; *T. vivax*, GOU1Z2; *L. mexicana*, E9AJ97; *L. major*, E9ACOO, *L. infantum*, A4HRD2; *L. donovani*, E9B775; *L. brasiliensis*, A4H326). Las regiones correspondientes a los péptidos de señalización se predijeron utilizando Mitoprot (en todos los casos se obtuvieron resultados positivos) y no fueron tomadas en cuenta para la construcción del logo.

Esto suma complejidad a la diversidad inherente al grupo de los kinetoplástidos, proporcionando un grado adicional de variabilidad a las ya existentes divergencias bioquímicas no sólo entre cepas, sino además dentro de una misma cepa.

La primera de las formas de la proteína en ser expresada fue el mutante $\Delta 77$. Como se menciona en materiales y métodos, la secuencia nucleotídica codificante para la proteína salvaje contiene entre los dominios N-terminal y Grx un sitio de restricción para *NcoI* lo cual simplificó la estrategia de clonado de la forma corta de la proteína. La expresión y purificación de esta forma pudo realizarse sin inconvenientes, obteniendo cantidades elevadas de proteína en forma soluble y con alto grado de pureza (rendimiento mayor a 30 mg de proteína por litro de cultivo, presentando >95 % homogeneidad por SDS-PAGE).

Por el contrario, la expresión de las construcciones para la FL resultó problemática. Se realizaron pruebas de inducción para dos clones de una construcción que en teoría codificaban la proteína completa sin su secuencia de localización mitocondrial. Las mismas se llevaron a cabo con cultivos de 5 mL en medio 2YT crecidos hasta una DO_{600} en torno a 2 e inducidos durante la noche con 200 μ M IPTG a 20 °C y 220 rpm. El resultado obtenido de las pruebas de inducción se muestra en la Figura 14.A. El producto de expresión mayoritario presentó un peso molecular cercano a lo estimado para la fusión Tc 1-C-Grx1:Ec Trx1 (32.3 KDa).

Asimismo, el intento de purificación de la proteína expresada por estos clones resultó infructuoso (Figura 14.B.). Gran parte de la proteína recombinante no se unió a la resina de purificación (Figura 14.B, FNU) y fue refractaria a proteólisis con TEV-P (Figura 14.B, +TEV-P). Luego de la digestión con TEV-P se esperaba obtener una banda en torno a los 18 kDa (peso molecular estimado para la Tc 1-C-Grx1 FL) y otra de aproximadamente 13 KDa perteneciente a la EcTrx1-His₆.

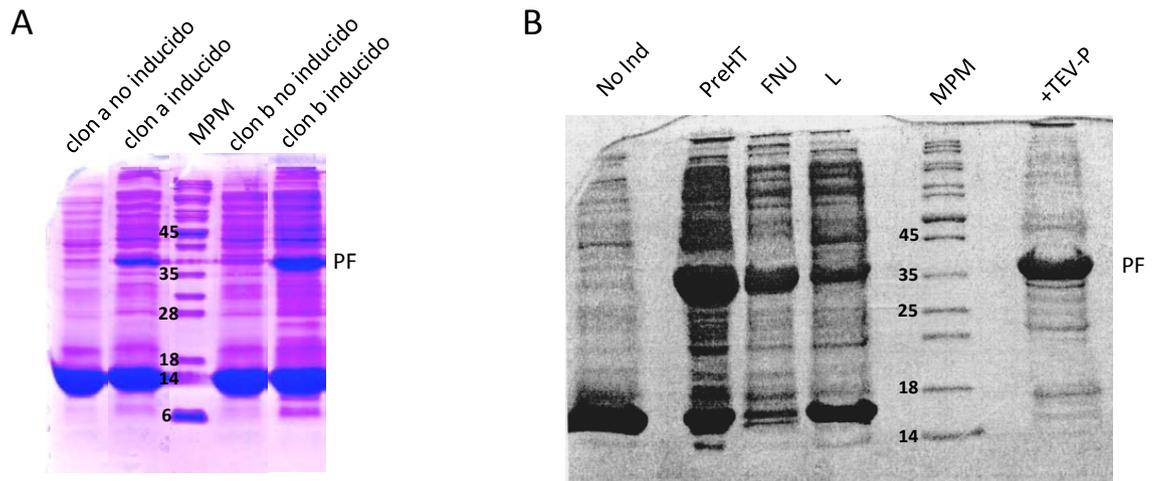


Figura 14. A. Pruebas de inducción. PF: Proteína de Fusión. **B. Purificación por IMAC.** No ind: cultivo no inducido; preHT: pre-Histrap; FNU: fracción no unida; L: lavado; +TEV-P: eluido proteolisado con TEV-P. Estos resultados corresponden al clon a. MWM: Marcador de peso molecular.

Sumado a esto, La secuencia expresada presentaba una mutación en la posición 125 (Phe por Ile), la cual, como se verá más adelante (análisis del modelo estructural), probablemente desestabilice la estructura de la proteína o bien no permita se correcto plegamiento.

Estas anomalías forzaron a proceder nuevamente con el aislamiento y el clonado de la forma FL del gen, como se describe en materiales y métodos (sección 3.2.1). La secuencia del producto amplificado y ligado al vector pCR 2.1 fue verificada por secuenciación (Unidad de Biología Molecular, IPMont) de sus dos hebras para confirmar la ausencia de mutaciones inespecíficas teniendo como referencia la secuencia XP_807837.1 depositada en el GenBank. La expresión de esta construcción fue exitosa, obteniéndose un rendimiento y calidad de proteína recombinante similares a los de la forma $\Delta 77$ luego de dos pasos de cromatografía de afinidad por metales y purificación final por filtración en gel. La Figura 15 muestra los resultados de expresión y purificación de la Tc 1-C-Grx1.

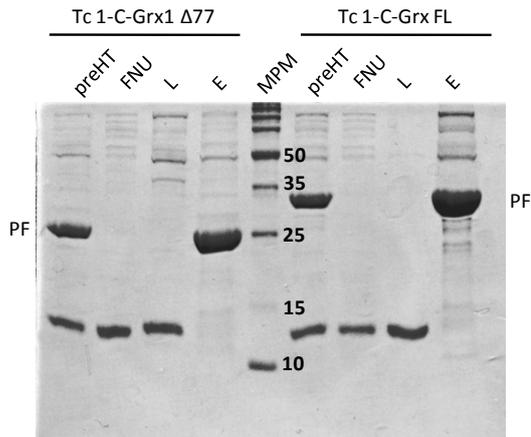
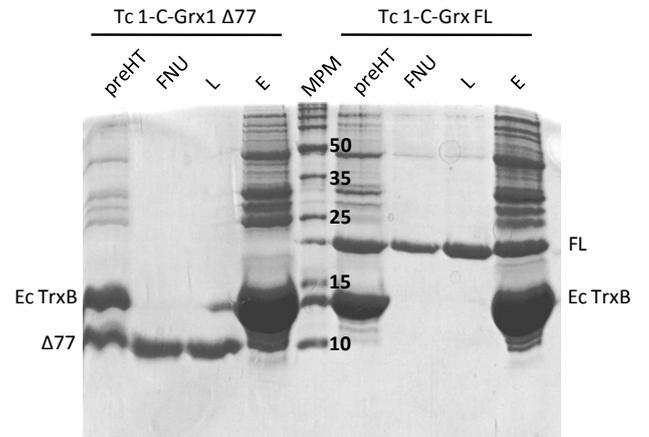
A**B**

Figura 15. Purificación de Tc 1-C-Grx1 Δ 77 y FL. A. Primera IMAC. Carriles 1 a 4 corresponden a Tc 1-C-Grx1 Δ 77 y carriles 6 a 9 corresponden a Tc 1-C-Grx1 FL; preHT: pre-histrap; FNU: fracción no unida; L: lavado; E: eluido, MWM, marcador de peso molecular (kDa). **B. Segunda IMAC (tras proteólisis con TEV-P).** Carriles 1 a 4 corresponden a Tc 1-C-Grx1 Δ 77 y carriles 6 a 9 corresponden a Tc 1-C-Grx1 FL. PF: proteína de fusión.

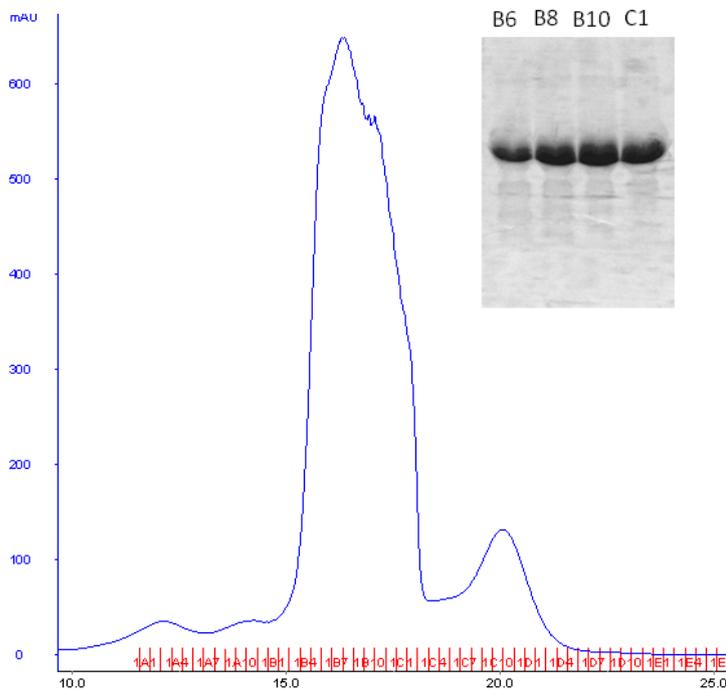


Figura 16. Cromatografía de exclusión molecular. Perfil de elución para la Tc 1-C-Grx1 FL en una columna Superdex G200 10/300 (GE) y análisis por SDS-PAGE en gel de acrilamida 15% p/v de las fracciones B6, B8, B10 y C1.

Por otro lado, la construcción conteniendo la forma FL de la proteína fue utilizada como molde para generar el mutante C105S (sección 3.2.1). De igual manera, la secuencia del mutante fue confirmada por secuenciación y las condiciones de expresión utilizadas para las anteriores proteínas también resultaron favorables en este caso.

4.3. Ensayos de cristalogénesis

Como se comentó en la introducción, las 1-C-Grxs de trypanosomátidos son consideradas proteínas funcionalmente divergentes respecto a las 1-C-Grxs de otros organismos y en el caso de la 1-C-Grx1 con indispensabilidad demostrada en tripanosomas Africanos (Comini *et al.*, 2008; Manta *et al.*, no publicado). En este sentido es importante investigar las diferencias estructurales que puedan existir entre las Grxs de tripanosomas y las de otros organismos, como por ejemplo aquellas que hayan surgido por el hecho de utilizar un tiol de bajo peso molecular distinto de GSH. De existir, estas y otras características moleculares de estas proteínas pueden potencialmente ser utilizadas como blancos para la generación de drogas que interfieran con su función. Por ello, consideramos interesante intentar cristalizar la Tc 1-C-Grx1, en vistas de que no existen estructuras cristalográficas reportadas para Grxs de Tripanosomátidos.

Los ensayos de cristalogénesis se realizaron utilizando la forma $\Delta 77$ de la proteína. Además de ser útil para estudiar la relevancia del estado oligomérico en la función, se pensó que la forma $\Delta 77$ simplificaría el proceso de cristalogénesis al carecer del dominio N-terminal, el cual, en el caso de la proteína de *T. brucei* (cuya estructura fue resuelta por RMN por nuestro grupo, Manta *et al.*, no publicado), se ha visto que confiere movilidad a la proteína. En la Figura 17, pueden apreciarse imágenes de los cristales obtenidos en el *screening* robótico. De 384 condiciones ensayadas sólo 3 arrojaron formas cristalinas. Los cristales obtenidos del *screening* no suelen ser adecuados para su difracción (y esta no fue la excepción) no sólo por lo pequeños sino además por tratarse de cristales tipo esferulita o de múltiples capas.

Por este motivo, se intentó la optimización manual de estas tres condiciones promisorias. Se ensayaron 240 condiciones con pequeñas variaciones de pH, precipitante (polietilenglicol, hexanediol, propanediol y/o glicerol), y sales pero en ningún caso se obtuvieron cristales. En muchas condiciones la proteína precipitó o bien nunca llegó a formar agregados cristalinos.

Más recientemente se realizó un nuevo *screening* pero utilizando la proteína FL. Esta nueva especie proteica tampoco logró cristalizar. La elevada reticencia a la cristalización podría deberse por una lado a la presencia del antedicho dominio flexible (si bien su eliminación no aumentó sustancialmente las condiciones en las que se obtuvieron cristales) sumado a la altísima solubilidad de estas proteínas (alcanzan fácilmente una concentración de 150 mg/mL).

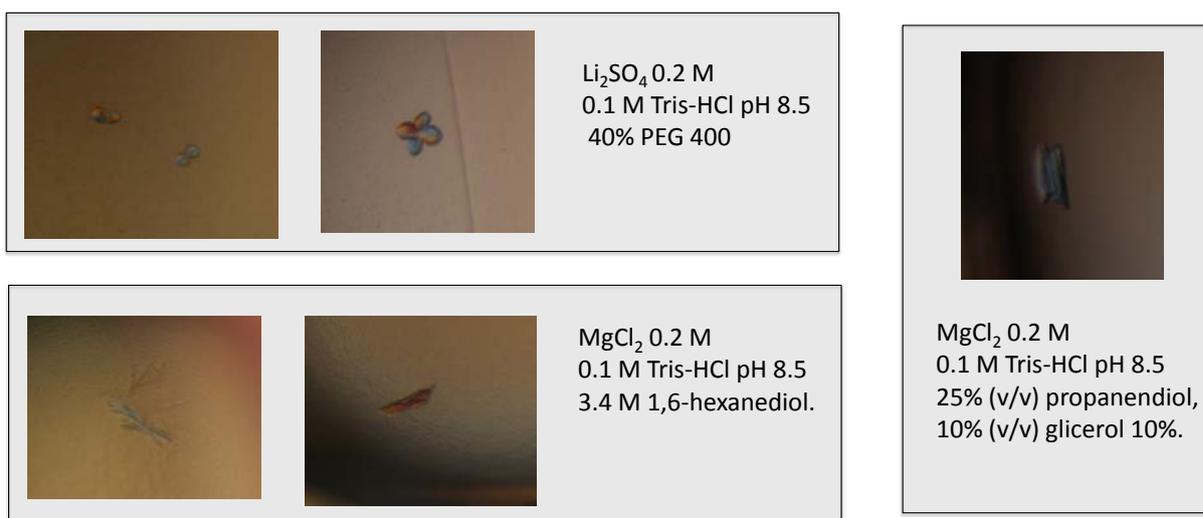


Figura 17. Ensayo de cristalogenésis. De 384 condiciones evaluadas sólo 3 resultados promisorias.

Ante esta situación, se procedió a realizar un modelo *in silico* de la proteína, puesto que éste resultaría útil para entender algunos de los resultados obtenidos. El modelo estructural se generó utilizando el servidor Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína $\Delta 77$ y utilizando como molde el pdb para la proteína Tb 1-C-Grx1 $\Delta 77$ (PDB2LTK; Manta *et al.*, no publicado). El modelo obtenido presenta muy buena confiabilidad (valor de QMEAN4 de 0.823 [rango 0-1]) considerando que la identidad de secuencia entre los dominios Grx es de un 81 %.

En la Figura 18, puede apreciarse el modelo de la Tc 1-C-Grx1 $\Delta 77$. Según este modelo la proteína presenta un plegamiento conservado de Trx con elementos secundarios adicionales respecto a la estructura típica de Grx (*i.e.* $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 3$). En este sentido, se destaca la presencia de tres hélices α adicionales en la estructura de la Tc 1-C-Grx1 $\Delta 77$, una de ellas ubicada en el extremo N-terminal ($\alpha 1$), y las otras dos dispuestas consecutivamente en el extremo C-terminal ($\alpha 4$ y $\alpha 5$). Varios residuos que estarían involucrados en la formación de un surco de unión a GSH se hallan estructuralmente conservados.

Otro dominio estructural conservado lo constituye el *core* hidrofóbico de la proteína. En esta región dos Phe (F95 y F125) interactúan manteniendo efectos de *stacking* mediante el cual fijan las hojas β_1 y β_2 . Es interesante notar que la Phe125 es la que se encontraba mutada en los clones que presentaron anomalías en su purificación y proteólisis. Es probable que la pérdida de esa interacción producto de la mutación haya provocado importantes cambios conformacionales (derivando en un plegamiento incorrecto) al menos en la región N-terminal de la proteína y su región adyacente donde se encuentra el sitio de corte para TEV-P y la cola de His, lo cual podría explicar los problemas comentados anteriormente. En resumen, esto confirma un rol estructural clave para este residuo.

MVKKDIDDTIQTEDVVAFIKGVPEAPMCAF^{SKRL}IDILEALGLE^{YTS}FDVLAHPV^{VRTY}KEVSEWPTIPQLFLKGEFVGG^{LDVV}QKMAEGGDLQ^{LLQHK}GISYRGGQS

α_1 β_1 α_2 β_2 α_3 α_4 β_3 β_4 α_5 α_6

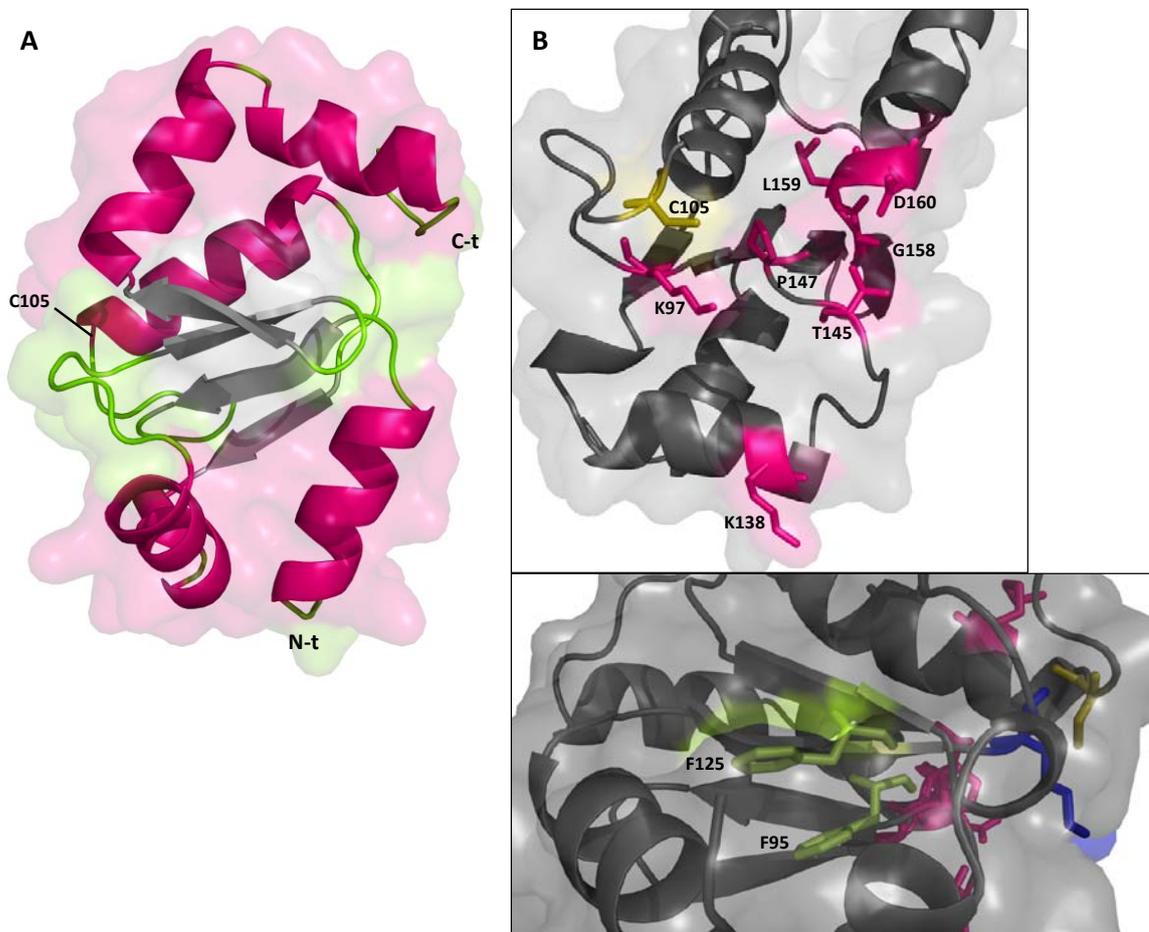


Figura 18. Modelo *in silico* de la Tc 1-C-Grx1 $\Delta 77$. **A. Plegamiento de dominio Grx.** En rosado se muestran las hélices α , en gris las hojas β y en verde los *loops*. En el encabezado de la figura se muestra la correspondencia en colores sobre la secuencia aminoacídica y la numeración de los elementos de estructura secundaria. **B. Residuos involucrados en la unión de GSH.** En rosado se indican los residuos que estarían comprometidos en la unión no covalente de GSH; en amarillo la Cys del sitio activo putativo. **C. Core hidrofóbico.** En verde se señalan las Phe que interactuarían fijando las posiciones de las hojas β_1 y β_2 .

4.4. Caracterización bioquímica de la Tc 1-C-Grx1

4.4.1. Determinación de la masa molecular

Las masas de las proteínas purificadas fueron determinadas por espectrometría de masa (MALDI-TOF, Unidad de Bioquímica Analítica y Proteómica, IPMont; Figura 19). Para la forma reducida de la 1-C-Grx1 FL (Figura 19.A) y $\Delta 77$ (Figura 19.B) se observaron valores de masas de 18067 y 12351 Da, respectivamente, las cuales coinciden con las estimadas a partir de la secuencia aminoacídica (17877 y 12351 Da) agregadas del dipéptido GA introducido en el producto de clonado. El análisis de las muestras no tratadas con agente reductor (DTT) reveló que a diferencia de la FL, la cual se detecta fundamentalmente como una especie monomérica de 18064 Da (Figura 19.C), la forma $\Delta 77$ aparece mayoritariamente con la masa correspondiente a un dímero de 24655 Da (Figura 19.D) y en menor medida por aquella representativa de la forma monomérica (12319 Da). La propensión de la forma $\Delta 77$ a oxidarse espontáneamente está de acuerdo con lo evidenciado en el modelo estructural que posiciona la Cys105 en una zona de marcada accesibilidad al solvente (Figura 18.A., B.). Evidentemente la situación es diferente en la forma FL donde seguramente la estructura cuaternaria de la proteína (ver próxima sección) contribuya a ocultar el tiol del solvente y en consecuencia torne a la proteína menos proclive a oxidarse en su única Cys. En el caso de la forma FL reducida también puede apreciarse un pico a 9034 correspondiente al ion dicargado. La pequeña diferencia de m/z entre el monómero reducido y oxidado de la FL podría deberse a pérdida de protones en algún residuo. Por otro lado, la diferencia observada entre las formas $\Delta 77$ monoméricas (+35) podría atribuirse a la oxidación a ácido sulfínico de la Cys105 o a sulfóxido de un par de residuos de Met.

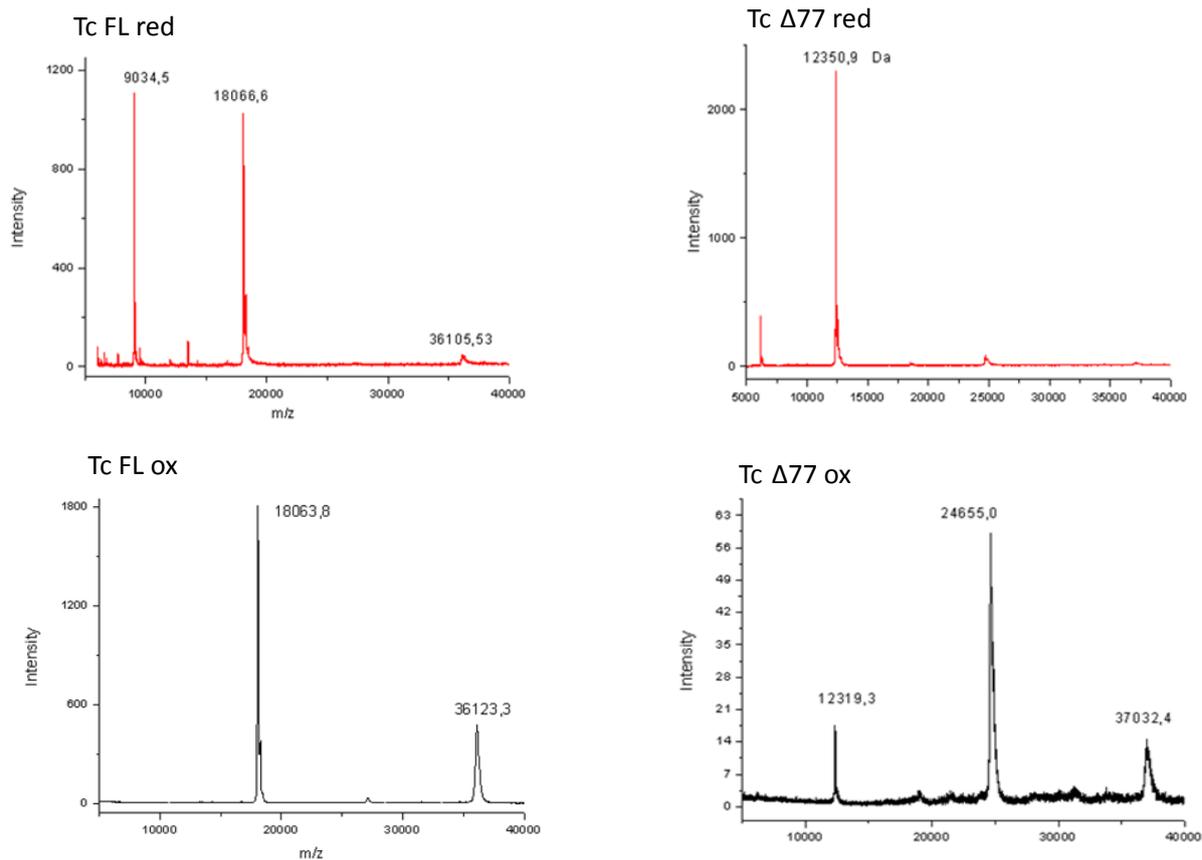


Figura 19. Espectro de masa de las 1-C-Grx1 FL y $\Delta 77$ en presencia (red) y ausencia (ox) de agente reductor.

4.4.2. Determinación del estado oligomérico

El estado oligomérico de la proteína en solución fue determinado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna Superdex G75 10/300 (GE) (Figura 20) y mediante dispersión dinámica de luz (DLS, Unidad de Biofísica de Proteínas, IPMont; Tabla 4). La columna fue previamente calibrada en las mismas condiciones de amortiguador y temperatura usando proteínas globulares de masa molecular conocida (Figura 20).

La Tc 1-C-Grx1 FL eluye de la SEC con un volumen de retención equivalente a una proteína globular de aproximadamente 32.4 kDa, de acuerdo a la calibración interna. Esto sugiere que en solución la proteína se comporta como un dímero no covalente. En concordancia con este resultado, el volumen hidrodinámico de la proteína determinado por dispersión dinámica de luz (DLS) corresponde al de una proteína de masa molecular de 33.8 kDa (Tabla 4). La forma corta, en cambio, eluye con un volumen de retención correspondiente a una especie con masa molecular aparente de 15,8 kDa muy debajo de lo esperado para un dímero de $\Delta 77$

(24.6 KDa) y próximo a la de una especie monomérica (12.3 KDa). Esto indica que al eliminar el dominio N-terminal la proteína pierde su estado oligomérico original. Al igual que lo reportado para la Tb 1-C-Grx1, estos resultados destacan el rol estructural del extremo N-terminal en la dimerización de la proteína.

Asimismo, con el fin de aproximar el mecanismo de dimerización se corrió una mezcla equimolar de las proteínas FL y la Δ 77, observando que no hay formación de especies de masa molecular intermedia. Esto refuerza la idea de que la especie homodimérica es muy estable (presenta baja disociación) y sugiere, si bien no lo demuestra, que la dimerización es mediada por la interacción recíproca de las regiones N-terminales de cada subunidad. Estos resultados coinciden con lo determinado para la proteína homóloga de *T. brucei*.

Este estado oligomérico dimérico no es una característica exclusiva de las 1-C-Grxs de tripanosomátidos. Se ha demostrado que también las 1-C-Grxs Grx6 y Grx7 de las vías secretorias de levadura pueden formar dímeros no asociados por centros [Fe-S]. En el caso de la Grx6 se ha determinado la presencia de un péptido N-terminal que resulta determinante en la estabilización de esta asociación no covalente (Luo *et al.*, 2010). La Grx7 también presenta un péptido N-terminal con una composición aminoacídica muy diferente, y si bien se ha observado la formación de dímeros y de especies de peso molecular semejante a tetrámeros, no se ha analizado si esta asociación ocurre a través del mismo (Izquierdo *et al.*, 2008; Meseke *et al.*, 2008). En resumen, la composición aminoacídica del péptido N-terminal de la 1-C-Grx1 de tripanosomas es singular y diferente de aquella presente en las proteínas de levadura.

Es interesante notar que la masa aparente en solución del dímero de la FL (en torno a 32-34 KDa) es similar a la masa teórica que correspondería a un dímero de la forma Δ 77 en solución (32-35 KDa), si bien esta última es una proteína comparativamente más pequeña (12 KDa frente a 18 KDa de la forma FL). Esto podría indicar que la dimerización confiere a la proteína una estructura más compacta y/o globular.

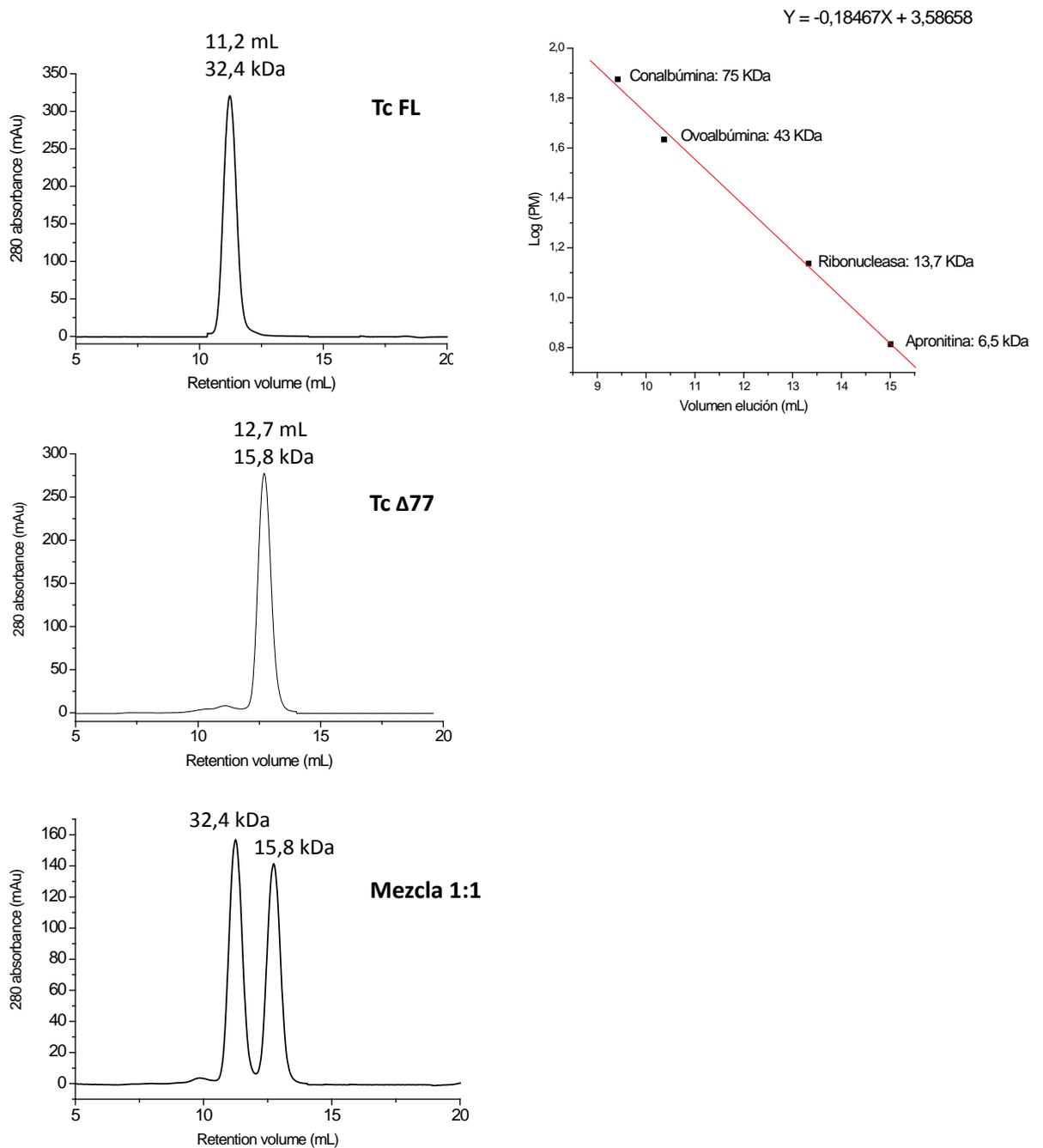


Figura 20. A. Cromatografía de exclusión molecular para las 1-C-Grx1 FL y Δ 77. Sobre los picos se indica el volumen de retención y el peso molecular calculado a partir de una curva de calibración de proteínas estándar. **B. Calibración de la columna G75 10/300.**

Tabla 4. Radio hidrodinámico (rH) de la 1-C-Grx1 FL y Δ 77 y peso molecular calculado

Muestra	rH (nm)	PM _{calc} (kDa)
Tc 1-C-Grx1 FL	2,680	33,8
Tc 1-C-Grx1 Δ 77	2,031	17,7

4.4.3. Ensayos de coordinación de centros [Fe-S]

Para la realización de estos ensayos fue fundamental obtener la proteína sin cola de histidinas de manera que este aminoácido, como buena base de Lewis que es, no interfiriera con la coordinación de hierro. Por tanto, el método de expresión y purificación se vio condicionado en buena parte por este objetivo particular.

La reconstrucción se realizó utilizando como tiol de bajo peso molecular GSH, Gsp o T(SH)₂ en las condiciones mencionadas en materiales y métodos y el estado oligomérico se evaluó mediante filtración en gel. Lo que ocurre en la mayoría de los ejemplos estudiados es que las Grxs que tienen la capacidad de coordinar centros [Fe-S] son monoméricas y dimerizan al unir un centro [Fe-S]. Esto se ha observado tanto para Grxs monotiólicas como ditiólicas, como ser la GrxC4 de álamo (Noguera *et al.*, 2005), las GrxS14 y S16 cloroplásticas (Bandyopadhyay *et al.*, 2008), las Grx1 (Kelly *et al.*, 1997) y Grx4 de *E. coli* (Iwema *et al.*, 2009), la Grx SyGrx3p de *cyanobacterium Synechocystis* (Picciocchi *et al.*, 2007), las Grxs humanas Grx2 (Johansson *et al.*, 2006) y Grx3/PICOT (Haunhorst *et al.*, 2010), por mencionar algunas. En algún caso particular la coordinación de centros [Fe-S] induce la tetramerización de una proteína monomérica, como ocurre para la Grx5 humana (Johansson *et al.*, 2011) o la tetramerización de una proteína dimérica, como se observa para la Grx6 de levadura (Luo *et al.*, 2010).

Por el contrario, para la Tb 1-C-Grx1 se ha reportado que la proteína no cambia su estado oligomérico (no tetrameriza) al coordinar un centro [Fe-S], sino que se comporta como un dímero expandido con picos de absorción a 320 y 412 nm, correspondientes a la presencia de un *cluster* de tipo [2Fe-2S] (Manta *et al.*, 2012). En el caso de la proteína de *T. cruzi* el resultado no fue tan evidente (Figura 21). Bajo las condiciones ensayadas no se detectó la aparición de nuevas especies proteicas que presentaran absorción a 412 nm, sino sólo la presencia de apo proteína monomérica con un volumen de elución de 11.2 mL. El cambio en el volumen de retención no fue en absoluto sustancial con ninguno de los tioles de bajo peso molecular estudiados. El aumento en la absorción a 412 nm tampoco fue importante. Por otro lado, es interesante notar la formación de una especie de bajo peso molecular con absorción a 320 y 420 que es especialmente abundante en el caso de la reconstrucción realizada con T(SH)₂. La generación de un centro [Fe-S] coordinado exclusivamente con T(SH)₂ ya ha sido reportada (Manta *et al.*, 2012).

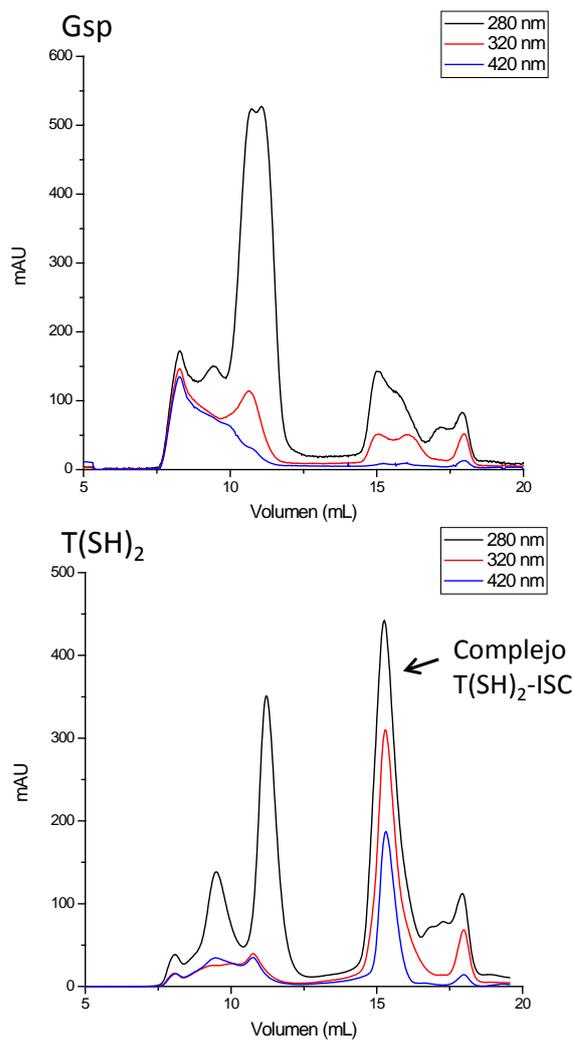


Figura 21. Reconstrucción de centro [Fe-S] y SEC.

Cabe notar que si bien esta técnica de reconstrucción ha sido ampliamente utilizada, la reacción favorece la generación espontánea de un centro [Fe-S], ofreciendo las condiciones y sustratos óptimos para que tenga lugar la asociación de especies sumamente reactivas (hierro, sulfuro y tioles).

Asimismo, la baja eficiencia en la reconstrucción de la holo-proteína podría deberse a que la 1-C-Grx1 no sería un andamiaje primario para la síntesis de centros [Fe-S], sino que participaría en el pasaje de centros preformados hacia otras proteínas aceptoras. Tal vez si se lograra generar el *cluster* sobre otra proteína que sí fuera un andamiaje primario (por ejemplo, una tipo IscU, ya descrita para *T. brucei*; Smíd *et al.*, 2006) esta podría eventualmente transferirlo hacia la 1-C-Grx1 aumentando la eficiencia de la unión.

Por otro lado, esto no quita que pueda hacerse una distinción en el mecanismo de unión de centros [Fe-S] entre las 1-C-Grxs que son monoméricas y las que son diméricas (Figura 22). En el primero de los casos, la proteína monomérica dimeriza en torno al centro comprometiendo las Cys de su sitio activo putativo y utilizando algún tiol de bajo peso molecular para completar la esfera de coordinación del hierro. En el caso de las 1-C-Grx1 el estado oligomérico *a priori* no cambiaría y habría una expansión del dímero.

También es interesante internarse en la estequiometría del *cluster*. En la mayoría de los organismos hasta ahora estudiados el tiol de bajo peso molecular por excelencia utilizado es el GSH. Por lo tanto se requieren dos moléculas de GSH para unir el centro [Fe-S]. En cambio, los tripanosomas utilizan fundamentalmente T(SH)₂ como tiol de bajo peso molecular (Figura 22). Al tratarse de un ditiol probablemente una única molécula alcance (y sea más favorable en términos de entropía) para unir el *cluster*. Cuántas moléculas de T(SH)₂ son utilizadas para coordinar un centro [Fe-S] es una pregunta que aún no ha sido respondida.

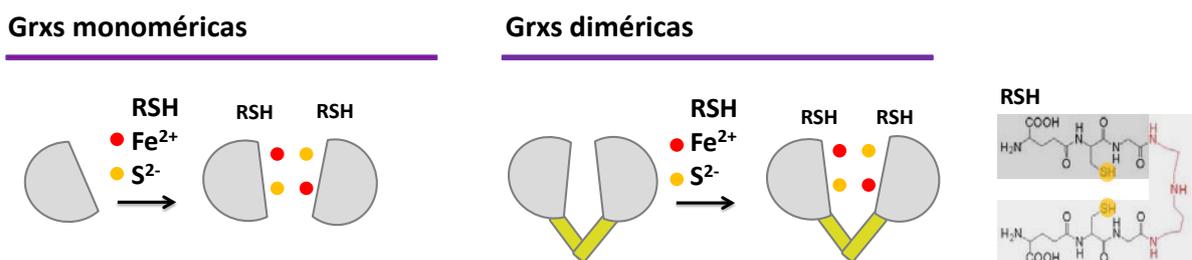


Figura 22. Modelos de unión de centros [Fe-S] por 1-C-Grxs monoméricas y diméricas. Las monoméricas dimerizan mientras que las diméricas incrementan su volumen hidrodinámico, sin modificar su estado oligomérico. A la derecha se muestra la estructura del T(SH)₂.

4.4.4. Determinación del pKa de la Cys del sitio activo putativo

El pKa de la C105 fue determinado mediante medida de la velocidad de reacción del tiolato con el fluoróforo monobromobimano (Sardi *et al.*, no publicado) (Figura 23). Para las proteínas FL y Δ77 los valores fueron ajustados a una función con tres pKa hallando que la FL sufriría eventos de ionización a pH 4,5, 5,0 y 8,0 y la Δ77 a pH 4,0, 6,0 y 7,8.

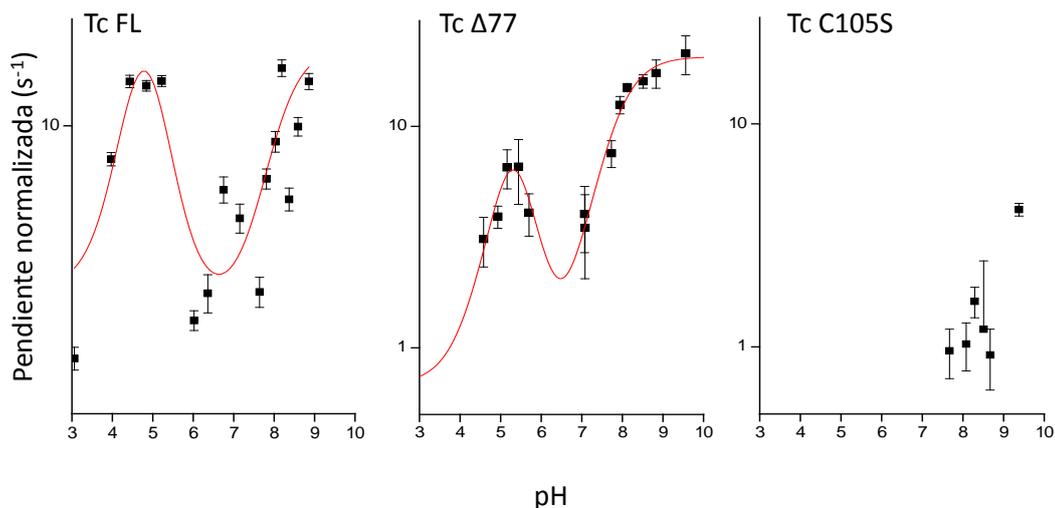


Figura 23. Determinación del pKa del sitio activo putativo. En el eje de las ordenadas se grafica en escala logarítmica la velocidad de la reacción con el fluoróforo mBBr normalizada por la concentración de proteína y la de mBBr empleadas en cada caso y multiplicada por 1×10^6 . La FL presenta pKas de 4.5, 5.0 y 8.0 y la $\Delta 77$ de 4.0, 6.0 y 7.8.

Un pKa a pH cercano a 8 es llamativamente elevado en comparación a los valores reportados para glutarredoxinas de tipo ditiólicas, generalmente cercano a 4 (Foloppe *et al.*, Gan *et al.*, 1990). Asimismo, el ensayo realizado con el mutante C105 confirmó la especificidad del resultado observado. No obstante, considerando que el pH mitocondrial es relativamente alcalino (aproximadamente pH 8; Llopis *et al.*, 1998; Nolan *et al.*, 2000) es probable que una fracción considerable de la proteína (la mitad si $\text{pH} = \text{pKa}$) se encuentre bajo la forma desprotonada y por lo tanto en la forma iónica adecuada (tiolato) para desempeñar su función.

Por otro lado, este tipo de comportamiento de tres pKa no es comúnmente exhibido. El mismo podría deberse a la presencia de un residuo ácido estructuralmente próximo como ser el Glu101, que podría compartir un protón con la C105 o bien la presencia de un parche ácido formado por los residuos de Asp113 y Glu116 (Figura 24). Así, a pHs ácidos (>5.0), la reactividad de la Cys aumentaría gracias a su desprotonación por sustracción de su protón por parte del grupo carboxilato del residuo de Glu; a medida que el pH aumenta, el residuo Lys97 (Figura 24) cedería su protón al tiolato, formando un enlace de hidrógeno con el tiol y produciendo el descenso de la reactividad; y finalmente a $\text{pH} > 6$ la Cys se comportaría como un tiol normal, desprotonándose, lo que corresponde con un nuevo aumento de la reactividad. Es posible que los pKas más ácidos también sean relevantes para la actividad de

la proteína. Este punto resulta particularmente interesante puesto que suma complejidad a los procesos fisiológicos y podría estar dando idea de los mecanismos que participan en la exportación de los centros [Fe-S] hacia el citosol.

Lo que podría denominarse *switch* por pH fue descrito para otras proteínas. Un ejemplo interesante dada su posible conexión con este trabajo es el de la proteína MitoNEET, la cual se presenta en la membrana externa mitocondrial. Inicialmente esta proteína fue identificada como blanco para la pioglitazona, una droga utilizada para tratar la diabetes de tipo 2. MitoNEET presenta un *cluster* [2Fe-2S] muy particular, coordinado por tres ligandos Cys y uno His, que es sumamente sensible al pH. La protonación de la His sería la responsable de la labilidad de este *cluster*. Esta tendencia a liberar su centro [Fe-S] llevó a que MitoNEET fuera postulada como un eslabón adicional en la síntesis de centros [Fe-S] citosólicos y/o exportación de centros preformados en la mitocondria. En el caso de MitoNEET se supone que la protonación de la His estaría mediada por otra proteína o cofactor (Wiley *et al.*, 2012), pero algo similar podría imaginarse para la 1-C-Grx1. Teniendo en cuenta que la 1-C-Grx1 participaría en la transferencia de centros [Fe-S] hacia otras proteínas, tal como ya se ha propuesto para sus ortólogas (ver introducción), podría especularse que la disociación pH-dependiente de la Cys de su sitio activo permitiría dicha función. Por ejemplo, en la matriz mitocondrial (pH aproximadamente 8), la Cys se encontraría en su estado desprotonado coordinando un centro [Fe-S], mientras que el acercamiento a la periferia mitocondrial podría resultar en la protonación de las Cys por efecto del gradiente de pH o tal vez mediado por otras proteínas lo que provocaría la liberación del *cluster* hacia las proteínas de exportación (Erv1, Atm1, MitoNEET; ninguna de ellas descrita para tripanosomas).

Sería interesante poder elucidar qué residuos se encuentran efectivamente participando de este mecanismo de *switch* por pH. Por un lado, la cercanía de la Lys97 a la Cys105 hace que su participación en este mecanismo sea bastante clara. Por otro lado, qué componente es el responsable del comportamiento a pH ácido no es evidente. Podría ser que el Glu101 localizado sobre un *loop* flexible adquiriera una posición más cercana al residuo de Cys a $\text{pH} < 6$, de manera de poder compartir un protón con el tiolato de la Cys105. En este caso habría que pensar que un cambio conformacional en el *loop* que contiene a las Cys105 y el Glu101 es responsable del comportamiento observado. Asimismo la hélice $\alpha 2$ contiene a los residuos Asp113 y Glu116 que podrían también estar siendo responsables de este efecto.

Otro punto interesante de notar es la diferencia de pKa observado entre las formas $\Delta 77$ y FL de la proteína, llegando a ser de una unidad de pH en el caso del segundo pKa. Esta disminución del pKa podría ser causado por efecto de la interacción proteína-proteína en el caso de la proteína FL. Esto muestra cómo cambios en el entorno proteico pueden generar un impacto en el entorno local, pudiendo determinar en algunas condiciones la funcionalidad de la proteína (en este caso una disminución del pKa podría determinar la capacidad de la proteína para liberar su centro [Fe-S]).

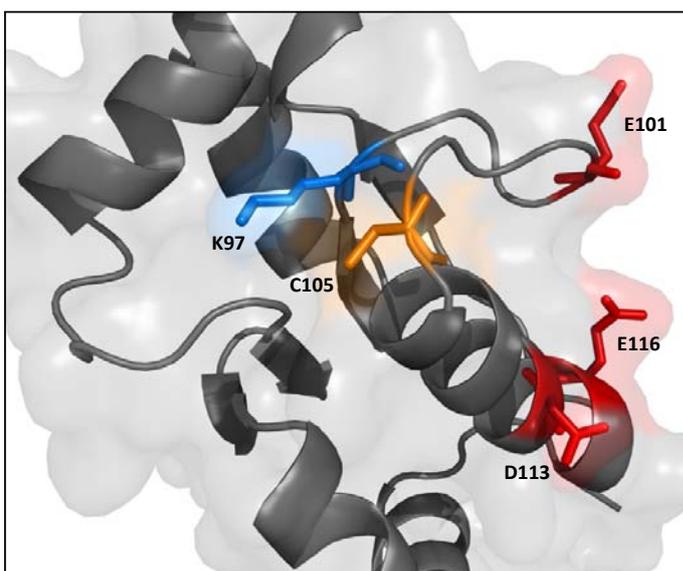


Figura 24. Residuos involucrados en comportamiento de tres pKa. En amarillo se muestra la Cys del sitio activo putativo, C105. En rojo, posibles residuos ácidos, Glu101 (E101) localizado sobre un *loop* flexible, o bien el parche ácido Glu 116/Asp113 (E116/D113) localizados sobre la hélice $\alpha 2$ (que es antecedida por C105). En azul, el residuo básico Lys 97 (K97) con el cual la C105 presentaría una interacción bastante clara.

4.4.5. Actividad reductora de insulina

Con el fin de evaluar la actividad oxidorreductasa se empleó el ensayo de reducción de insulina. La inespecificidad de este ensayo es a la vez su mayor desventaja y su mayor virtud. El hecho de ser tan inespecífico permite que pueda utilizarse para comparar a grandes rasgos la actividad de enzimas que pueden tener especificidad de sustrato totalmente diferente. Como datos importantes debe prestarse atención a la fase *lag*, previa a la aparición de turbidez, y a las pendientes de cada curva. En la Figura 25 puede observarse las curvas obtenidas para la Tc 1-C-Grx1 en sus formas FL y $\Delta 77$ y los respectivos controles con Trx de *E. coli*. Como puede apreciarse, la 1-C-Grx1 en una concentración 20 μM se comporta como el control con DTT solo. Esto indica que la reducción de la insulina observada en estas condiciones se debe a la reacción espontánea con DTT. A una concentración mucho más elevada de proteína pareciera haber algo de catálisis, pero difícilmente puede decirse que 150 μM es una concentración catalítica.

Estos resultados son coincidentes con lo observado para otras 1-C-Grxs, que tampoco son activas en ensayos típicos para Grxs. Puntualmente para la 1-C-Grx1 de *T. brucei* no se ha detectado capacidad para reducir el disulfuro de la insulina (Filser *et al.*, 2008). En el caso de Grx5 de levadura se ha determinado que la misma es reducida por GSH muy lentamente (20 veces más lento que la 2-C-Grx Grx1 de *E. coli*). Por tanto, la reducción por GSH puede ser un factor adicional que contribuye a la ya de por sí baja actividad reductasa. En este sentido, es posible que otros reductores mitocondriales puedan reducir con mayor eficiencia estas proteínas (*e.g.* la Grx5 es eficientemente reducida por la tioredoxina reductasa; Tamarit *et al.*, 2011).

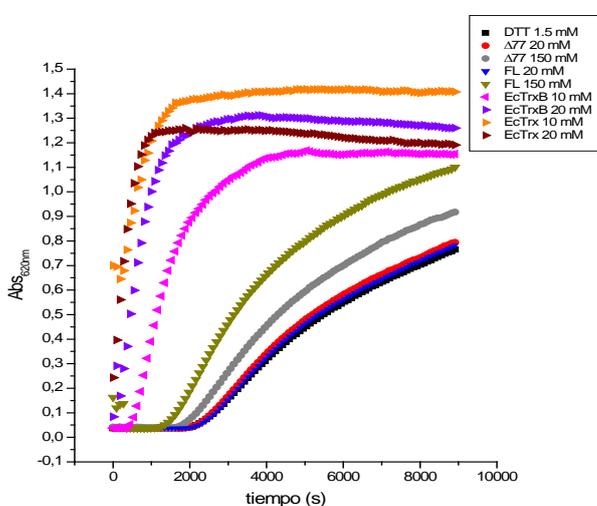


Figura 25. Ensayo de reducción de la insulina. La actividad reductora de insulina se midió utilizando Tc 1-C-Grx1 FL y $\Delta 77$ en concentraciones 20 y 150 μM , Ec Trx1 con y sin cola de His en concentraciones 10 y 20 μM , insulina 130 μM , DTT 1.5 mM, a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

4.4.6. Estudio de la expresión de la proteína por ensayos de Western blot

El objetivo inicial era evaluar mediante ensayos de *Western blot* si la proteína es expresada por los distintos estadios del ciclo de vida del parásito y cuantificar dicha expresión con el fin de estimar la concentración intracelular de la 1-C-Grx1.

Se comenzó por comprobar si anticuerpos anti-Tb 1-C-Grx1 generados en conejo de indias y purificados por afinidad presentaban reactividad cruzada frente a la proteína homóloga de *T. cruzi*. En aquel momento todavía no se contaba con la forma FL de la proteína, motivo por el cual se utilizó la forma $\Delta 77$ para realizar una curva de calibración y como control se utilizó la proteína recombinante $\Delta 77$ de *T. brucei*. En este caso, el anticuerpo reconoció la proteína de *T. brucei* pero no hubo reconocimiento de la forma $\Delta 77$ de la proteína de *T. cruzi*.

Una vez que se obtuvo proteína recombinante en su forma FL, se procedió a realizar nuevamente el ensayo. En esta oportunidad se analizaron extractos de parásitos *T. cruzi* cepa

CL Brener en diferentes estadios del ciclo celular (Figura 26). El anticuerpo anti-TbGrx1 tuvo reactividad cruzada frente a la forma FL, pero nuevamente no hubo señal detectada para de la forma $\Delta 77$. Este resultado es muy interesante puesto que estaría indicando que los epítopes del dominio N-terminal de las 1-C-Grx1 son altamente conservados para las proteínas de *T. cruzi* y *T. brucei*, mientras que no sucede lo mismo para aquellos epítopes presentes en el dominio Grx, los cuales parecen presentar especificidad de especie. Asimismo, el hecho de presentar alto grado de identidad de secuencia entre ambas ortólogas podría indicar que los epítopes son conformacionales. A pesar de reconocer la forma FL de la Tc 1-C-Grx1 estos anticuerpos no indicaron la presencia de proteína en extractos de parásitos.

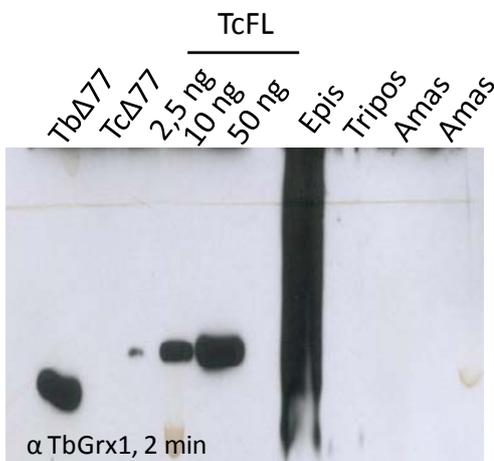


Figura 26. Ensayo de Western blot. Se sembraron 2×10^7 parásitos de *T. cruzi* CL Brener por carril. Incubación con anti-Tb 1-C-Grx1 en una dilución 1:400 en PBS-L durante 2 horas seguido de anti-igG de conejo de indias 1:8000 en PBS-L durante 45 minutos. 2 minutos de exposición.

Ante esta situación, se procedió a generar anticuerpos específicos contra la proteína de *T. cruzi* en ratones Balb C (sección 3.8.1). En la Figura 27 puede apreciarse la evaluación de este antisuero. A pesar del buen título y especificidad de estos anticuerpos, no fue posible detectar la proteína en extractos de parásitos de la cepa CL Brener (Figura 27.A.). Esta ausencia de detección llevó a probar otra cepa de *T. cruzi*: DM28. En este caso tampoco hubo señal apreciable (figura 27.B.).

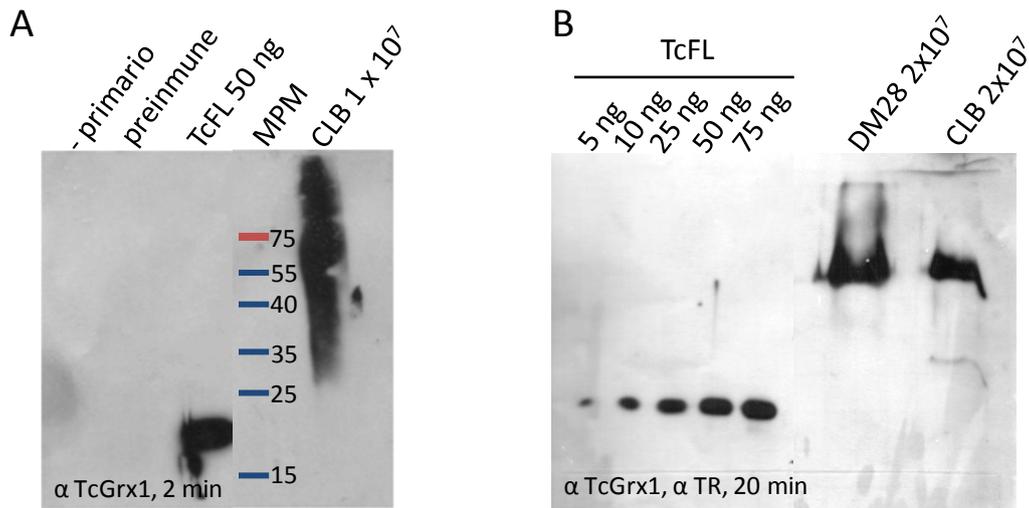


Figura 27. Ensayo de *Western blot*. El número de parásitos y la masa de proteína recombinante sembrados se indican sobre cada carril. Incubación con anti-Tc 1-C-Grx1 en una dilución 1:400 en PBS-L durante 2 horas seguido de anti-igG de ratón 1:10000 en PBS-L durante 45 minutos. En el caso del anticuerpo anti-TR se utilizó una dilución 1:1000 y para el anticuerpo secundario anti-igG de conejo una dilución 1:10000.

Ante la sospecha de una baja expresión de la proteína y teniendo en cuenta su potencial localización en la mitocondria del parásito (sección 4.1, Figura 28) se realizó el ensayo de *Western blot* empleando un extracto enriquecido en mitocondrias de *T. cruzi* cepa CL Brener en estadio epimastigota. En la Figura 28 puede apreciarse cómo hay detección de hasta 1 ng de la proteína recombinante, pero no se aprecia señal en los extractos enriquecidos en mitocondria ni en los correspondientes a parásitos totales, mientras que sí fue posible detectar la expresión de lipoamida deshidrogenasa, utilizada como control de organelo y de carga.

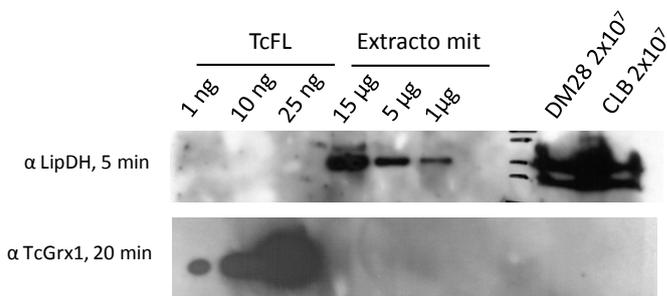


Figura 28. Ensayo de *Western blot*. La masa de proteína recombinante y de extracto mitocondrial así como el número de parásitos sembrados se indica sobre cada carril. Incubación con anti-Tc 1-C-Grx1 y anti-igG de ratón en iguales

condiciones que Figura 26. Incubación con anticuerpo anti-Tb lipoamida deshidrogenasa 1:500 en PBS-L durante 2 horas seguido de anti-igG de conejo en una dilución 1:10000 en PBS-L durante 45 minutos.

En resumen, a pesar de que los anticuerpos reconocen específicamente hasta 1 ng de proteína recombinante, no fue posible detectar la expresión de la Tc 1-C-Grx1 *in vivo*.

Por otro lado, se incubó la membrana conteniendo los extractos mitocondriales con anticuerpo anti-Tb 1-C-Grx2. En este caso sí se observó una banda específica por debajo de 15 KDa, lo que correspondería con el peso molecular de la Tc 1-C-Grx2 (Figura 29).

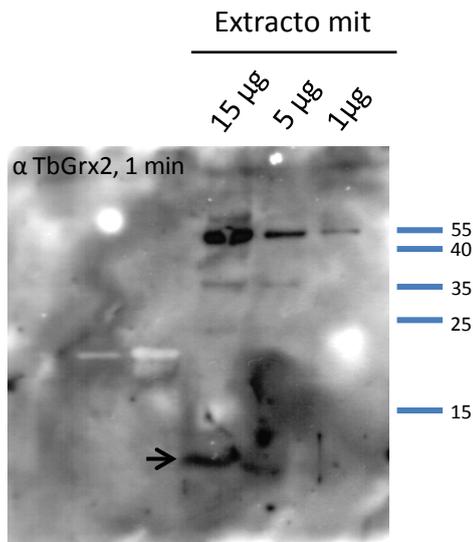


Figura 29. Ensayo de Western blot. Incubación con anti-Tb 1-C-Grx2 1:500 en PBS-L durante 2 horas seguido de anti-igG de conejo de indias 1:8000 durante 45 minutos. La flecha indica la banda específica que coincide con el PM de la 1-C-Grx2

Si bien los resultados de este ensayo no fueron alentadores, puesto que no se pudo detectar la presencia de la proteína en estudio poniendo en duda su relevancia para el parásito *T. cruzi*, el haber detectado al menos una 1-C-Grx es un resultado positivo. Resultaría difícil pensar el funcionamiento de una mitocondria y puntualmente de la maquinaria de ensamblaje de centros [Fe-S] sin la participación de este tipo de proteínas, teniendo en cuenta la conservación de su función en la escala evolutiva y considerando la relevancia demostrada para el parásito *T. brucei*. *A priori* podría especularse que es la 1-C-Grx2 la proteína que cobra relevancia en *T. cruzi*.

5. Conclusiones y perspectivas

Entre tantas peculiaridades, los tripanosomátidos son organismos que presentan un metabolismo redox muy particular que depende de T(SH)₂. El T(SH)₂ es el principal amortiguador redox intracelular, es fundamental para la proliferación celular, para la eliminación de especies oxidantes, entre tantas otras funciones. Dentro de las rutas T(SH)₂-dependientes se encuentran aquellas que tienen a las glutarredoxinas como proteínas centrales. Las Grxs participan en una extensa lista de funciones celulares, fundamentalmente catalizando reacciones de intercambio tiol-disulfuro dentro de proteínas o entre proteínas y tioles de bajo peso molecular. Por otro lado, están las glutarredoxinas monotiólicas, Grxs que poco honor le hacen a su nombre. Sobre todo en el caso de los tripanosomas en los cuales ni “gluta” ni “redoxina” son sustantivos adecuados.

Retomando el concepto de drogabilidad, las 1-C-Grxs de tripanosomátidos son proteínas con características funcionales diferentes a las de otros organismos y, como fue recientemente observado la 1-C-Grx1 es indispensable para el tripanosoma Africano (Comini *et al.*, 2008; Manta *et al.*, no publicado) y presenta características estructurales y bioquímicas diferentes respecto de aquellas presentes en proteínas ortólogas de eucariotas (Manta *et al.*, no publicado) lo cual posiciona a esta proteína como un potencial blanco de fármacos tripanocidas. En este trabajo se procuró estudiar la 1-C-Grx1 de *T. cruzi*, intentando extrapolar algunas de las observaciones realizadas para su ortóloga en *T. brucei* (Comini *et al.*, 2008; Filser *et al.*, 2008; Manta *et al.*, 2012, no publicado).

Mediante técnicas de biología molecular fue posible aislar secuencias putativas para la 1-C-Grx1 e identificar la existencia de microheterogeneidad en ellas, lo cual, si bien requiere de validación bioquímica podría indicar la existencia de isoformas para esta proteína. Se lograron clonar distintas formas (FL, Δ77 C105S) de esta proteína dentro de un vector de expresión para *E. coli* (pET-Trx). Esta construcción permitió tras dos pasos de cromatografía de afinidad por metales con un paso intermedio de proteólisis con TEV-P y purificación subsiguiente mediante gel filtración, obtener la proteína con un alto grado de pureza y carente de la cola de histidinas, lo que es fundamental para los ensayos de coordinación de centros ferrosulfurados. La identificación de la región de dimerización se realizó mediante alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos correspondientes a 1-C-Grxs de diferentes tripanosomátidos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la variante monomérica de la proteína homóloga de *T. brucei* (Manta *et al.*, 2012).

Se obtuvieron condiciones de expresión óptimas para las tres variantes de la Tc 1-C-Grx1, lo que permitió contar con cantidades elevadas de proteína en forma soluble. Los resultados de las purificaciones fueron en todos los casos satisfactorios alcanzándose un rendimiento promedio de >30 mg proteína pura (>95 % homogeneidad por SDS-PAGE) por litro de cultivo.

Se realizaron análisis de cromatografía de exclusión molecular (SEC), espectrometría de masa y dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el estado oligomérico de las formas FL y $\Delta 77$. Los resultados de SEC y DLS permiten afirmar que la proteína FL es un dímero no covalente en solución cuya formación depende exclusivamente de la región N-terminal (residuos Gln28 a Val79). Como se describió en la sección anterior, esto representa una característica estructural particular de la 1-C-Grx1 de tripanosomátidos. Si bien hasta el momento esto fue únicamente demostrado para *T. brucei* y *T. cruzi*, el alto grado de conservación de esta región en secuencias homólogas de otros kinetoplastidos nos permite especular sobre la función universal para la misma en esta clase de proteínas.

También se realizaron ensayos de coordinación de centros [Fe-S], sin resultados evidentes. No obstante, estudios paralelos a esta tesis permitieron establecer un nuevo mecanismo de coordinación de centros [Fe-S] para las Grxs diméricas, en el que se utiliza T(SH)₂ como ligando no protéico. La capacidad para unir centros [Fe-S] es uno de los ensayos que habrá que repetir de manera de confirmar si la proteína de *T. cruzi* es capaz de ensamblar en centro [Fe-S] como lo hace la 1-C-Grx1 de *T. brucei*, y si la formación del holocomplejo conlleva cambios conformacionales en la estructura oligomérica. Como fue discutido, esta actividad podría ser difícil de evaluar sobre todo si quisiera estudiarse la transferencia de centro [Fe-S] más que la reconstrucción “forzada” sobre la proteína y requeriría de la incorporación en el ensayo de otra proteína que participe como receptor primario del centro [Fe-S].

También sería interesante poder verificar la estequiometría del centro [Fe-S] por alguna técnica cuantitativa que diera sustento a las predicciones espectroscópicas, hecho que también puede dificultarse. Para esto sería necesaria una eficiencia de reconstrucción del centro [Fe-S] cercana al 100% o bien que hubiera una separación sustancial entre el dímero expandido y el dímero en ausencia de centro [Fe-S] de manera de no subestimar la proporción hierro:azufre inorgánico:tioles, opciones que no parecen ocurrir.

Otro factor a considerar es la estabilidad del *cluster*. En el caso de la proteína de *T. brucei* se ha visto que hay reconstrucción del centro [Fe-S] tanto con T(SH)₂ como con Gsp o GSH pero el centro producido con T(SH)₂ es menos susceptible a descomponerse en presencia de

H₂O₂ (Manta, no publicado). Verificar esto en la proteína de *T. cruzi* contribuiría no sólo a elucidar el mecanismo de coordinación por parte de las 1-C-Grxs de tripanosomas sino también a determinar la especificidad que han desarrollado las 1-C-Grx1 de estos organismos por emplear tioles de bajo PM parásito específicos.

Se verificó que la Tc 1-C-Grx1 no presenta actividad en el ensayo de reducción de la insulina y se determinó el pKa para la Cys del sitio activo putativo para las formas FL y Δ77 (colaboración con el Dr. G Ferrer-Sueta, Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias). En ambos casos se detectó un comportamiento de tres pKas, con un pKa llamativamente elevado en aproximadamente 8.0 y otros dos puntos de ionización a pH más ácido cuya relevancia fue anteriormente discutida. Ensayos control realizados con el mutante C105S confirmaron la especificidad del resultado. El pH podría ser un factor adicional que podría influir en la estabilidad del centro [Fe-S], como fue descrito para la proteína MitoNEET. Esta es una posibilidad que aún no ha sido estudiada y que podría brindar información sobre el mecanismo mediante el cual las 1-C-Grxs incorporan y/o ceden su centro [Fe-S] a otras proteínas.

En cuanto a la elucidación de la estructura, se realizaron ensayos de cristalización para la forma Δ77 y FL. Para la Δ77 se obtuvieron tres condiciones promisorias. No obstante, la reproducción manual y optimización de dichas condiciones no fue exitosa y tampoco se han obtenidos resultados alentadores para la forma FL. La cristallogénesis presenta un componente de azar muy importante y es impredecible saber si se tendrá éxito. En este sentido, no sería cauteloso continuar ensayando nuevas condiciones sino que idealmente podría intentarse la generación de cristales a partir de una nueva especie proteica. Por ejemplo, podría intentarse la cristalización de la proteína en conjunto con anticuerpos o con otras proteínas que favorezcan la cristalización. En el caso de la proteína de *T. brucei*, la reticencia a cristalizar llevó a adoptar la resonancia magnética nuclear como técnica para resolver la estructura (Manta *et al.*, no publicado) y una estrategia semejante podría aplicarse para la Tc 1-C-Grx1.

El estudio de la expresión y de la localización subcelular de la proteína fue sin dudas lo más complejo e infructuoso y es en lo que se centran las mayores perspectivas. Se comprobó mediante técnica de *Western blot* que suero de conejo de indias anti-Tb 1-C-Grx1 presenta reactividad cruzada contra la proteína homóloga de *T. cruzi* en su forma FL. La ausencia de señal para reconocer la forma truncada de la proteína de *T. cruzi* sugiere que dichos

anticuerpos estarían reconociendo principalmente epítopes compartidos en la región N-terminal de la Tb y Tc 1-C-Grx1. Por otro lado, se llevó a cabo la inmunización de dos ratones hembra de la cepa BalbC obteniendo anticuerpos específicos contra la forma recombinante de la Tc 1-C-Grx1 FL. Ensayos preliminares de *Western blot* con dichos sueros mostraron muy buena especificidad y títulos satisfactorios de anticuerpos anti-Tc 1-C-Grx1, los cuales también fueron capaces de reconocer a la forma recombinante de la Tb1-C-Grx1 FL y $\Delta 77$. Sorprendentemente estos nuevos anticuerpos no lograron detectar la proteína en extractos de parásitos. Lamentablemente no se ha podido estimar la concentración intracelular de la proteína. Será necesario continuar trabajando para encontrar en qué condiciones metabólicas puede ponerse en evidencia la expresión de esta proteína lo que puede incluir someter a los parásitos a diferentes tipos de estrés (oxidativo, de hierro, etc.) y ver si dichos estímulos resultan en un aumento de la expresión de la 1-C-Grx1.

En caso de detectarse expresión de Tc 1-C-Grx1 bajo alguna de las condiciones propuestas anteriormente, las mismas servirían para investigar la localización subcelular de esta proteína, la cual por las mismas razones expuestas anteriormente resultó infructuosa. Una vez determinada la localización subcelular de esta proteína en *T. cruzi* se podrá especular con mayor fundamento sobre el rol funcional que podría tener un pKa alcalino en la Cys involucrada en la coordinación de centros ferrosulfurados.

Por otro lado, la detección de la 1-C-Grx2 en la mitocondria pone en duda el rol que la 1-C-Grx1 podría cumplir en *T. cruzi*. Esta diferencia respecto a *T. brucei* puede estar asociada a los ciclos de vida diferentes que presentan estos organismos.

Una parte importante de este trabajo implicaría la generación de líneas de *T. cruzi* sobre-expresantes de las proteínas FL y C105S. En *T. brucei* estudios anteriores muestran que la expresión de la 1-C-Grx1 es altamente refractaria a ser silenciada y no puede ser eliminada por completo mediante una estrategia de *knock-out* (Comini *et al.*, 2008). Esto reveló la esencialidad de la proteína para *T. brucei*. A su vez, llevó a adoptar una estrategia de dominante negativo, eso es, líneas que sobre-expresan el mutante C104S de manera de generar dímeros no funcionales de la proteína. Tanto la sobre-expresión del mutante como de la proteína salvaje produjeron un descenso de la infectividad de los parásitos en modelos de infección animal (Manta *et al.*, no publicado). En el caso de *T. cruzi* no es posible realizar RNA de interferencia para silenciar la expresión génica (Ullu *et al.*, 2004), por lo que una estrategia de dominante negativo parece la opción más adecuada. A su vez, en *T. brucei* la

sobre expresión de la 1-C-Grx1 produjo un aumento en la susceptibilidad frente a agentes oxidantes y frente a la presencia de quelantes de hierro (Comini *et al.*, 2008), lo que *a priori* podría resultar contra intuitivo. Esto indicaría que la sobre-expresión reduce la cantidad de hierro libre en la célula, secuestrándolo como centros [Fe-S] sobre la 1-C-Grx1 sobre-expresada. Esto evidencia que el hierro intracelular está altamente regulado y cualquier modificación de su metabolismo puede potencialmente afectar la viabilidad celular. Sería significativo extender algunas de estas observaciones a *T. cruzi*.

Finalmente, sería trascendente encontrar algún compuesto que pudiera interrumpir la función de la proteína. Evaluar esto es complejo, puesto que aún no se ha ideado un mecanismo para medir la “actividad” de estas proteínas. Por lo pronto, podría comenzarse utilizando los anticuerpos anti Tb 1-C-Grx1, los cuales en teoría se unirían a la región N-terminal, y ensayar si los mismos pueden impedir la coordinación de centros [Fe-S] o afectar su estabilidad. Obviamente no pensando en la generación de una vacuna contra esta proteína, sino como herramienta para evaluar si bloqueando esta región es posible afectar el estado oligomérico de la proteína y así su función. Por otro lado esto permitiría establecer de manera preliminar si el péptido N-terminal tan particular de las 1-C-Grxs de estos parásitos constituye un buen blanco molecular para luego avanzar sobre el diseño de compuestos químicos con alta afinidad y especificidad por esta región.

6. Referencias

1. Adachi, T., Pimentel, D. R., Heibeck, T., Hou, X., Lee Y. J., Jiang, B., Ido, Y., Cohen R. A. S-Glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* (2004), 279 (28), p. 29857–29862.
2. Andreou, A, Feussner, I. Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* (2009), 70 (13-14), p. 1504-1510.
3. Aparicio-Burgos, J. E., Ochoa-García, L., Zepeda-Escobar, J. A., Gupta, S., Dhiman, M., Martínez, J. S., Montes de Oca-Jiménez, R., Val Arreola, M., Barbabosa-Pliego, A., Vázquez-Chagoyán, J. C., Jain Garg, N. J. Testing the efficacy of a multi-component DNA-prime/DNA-boost vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2011), 5 (5), e1050.
4. Arantes, J. M., Pedrosa, M. L. Rodrigues Martins, H., Veloso, V. M., de Lana, M., Bahia, M. T., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. *Trypanosoma cruzi*: treatment with the iron chelator desferroxamine reduces parasitemia and mortality in experimental infected mice. *Exp. Parasitol.* (2007), 117, p. 43-50.
5. Artymiuk, P. J., Green, J. The double life of aconitase. *Cell Press* (2006), 14 (1), p. 2-4.
6. Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comp. Biol.* (2009), 5 (10), e1000541.
7. Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M. M., Gaulberto, J.M., Claxton, R., Naik, S. G., Huynh, B. H., Herrero, E., Jacquot, J. P., Johnson, M. K., Rohuier, N. Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO Journal* (2008), 27, p. 1122-1133.
8. Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E. M., Axelsson, R., Holmgren, A., Lillig, C. H. How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* (2007), 9 (1), p. 151-157.
9. Berndt, C., Lillig, C. H., Holmgren, A. Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta.* (2008), 1783 (4), p. 641-650.
10. Bick, J. A., Åslund, F., Chen, Y., Leustek, T. Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998), 95, p. 8404-8409

11. Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., Lolascon, A. The human counterpart of zebrafish *shiraz* shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* (2007), 110 (4), 1353-1358.
12. Campos-Salinas, J., Cabello-Donayre, M., García-Hernández, R., Pérez-Victoria, I., Castanys, S., Gamarro, F., Pérez-Victoria, J. M. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* (2011), 79 (6), p. 1430-1444.
13. Cavalli, A., Bolognesi, M. L. (2009) Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* (2009), 52, p. 7339-7359.
14. Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., Krauth-Siegel, R. L. The dithiol glutaredoxins of African trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothion metabolism. *J. Biol. Chem.* (2010), 285 (45), p. 35224-35237.
15. Cheraylil, B. J. Iron and immunity: Immunological consequences of iron deficiency and overload. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2010), 58, p. 407-415.
16. Chantzoura, E., Prinarakis, E., Panagopoulos, D., Mosialos, G., Spyrou, G. Glutaredoxin-1 regulates TRAF6 activation and the IL-1 receptor/TLR4 signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010), 403 (2010), p. 335–339.
17. Chen, C. J., Lin, Y. H., Huang, Y. C., Liu, M. Y. Crystal structure of rubredoxin from *Desulfovibrio gigas* to ultra-high 0.68 Å resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006), 349 (1), p. 79-90.
18. Chang, K. P., Trager W. Nutritional Significance of Symbiotic Bacteria in Two Species of Hemoflagellates. *Science* (1974), 183, p. 531-532.
19. Chang, K. P., Chang, C. S., Sassa, S. Heme biosynthesis in bacterium-protozoon symbioses: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiotes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1975), 72 (8), p. 2979-2983.
20. Comini, M., Menge, U., Flohé, L. Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* (2003), 384 (4), p. 653-656.
21. Comini, M. A., Menge, U., Wissing, J., Flohé, L. Trypanothione synthesis in *Crithidia* revisited. *J. Biol. Chem.* (2005), 280 (8), p. 6850–6860.

22. Comini, M. A., Rettig, J., Dirdjaja, N., Hanschmann, E-M., Berndt, C., Krauth-Siegel, R. L. Monothiol glutaredoxin 1 is an essential iron-sulfur protein in mitochondrion of African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* (2008), 283 (41), p. 27785-27798.
23. Comini, M. A., Dirdjaja, N., Kaschel, M., Krauth-Siegel, R. L. Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *Int. J. Parasitol.* (2009), 39 (10), p. 1059-1062.
24. Couturier, J., Koh, C., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J. P., Lemarie, S. D., Didierjean, C., Rohuier, N. Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J. Biol. Chem.* (2009), 284 (14), p. 9299-9310.
25. Collet, J-F., Messens, J., Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* (2010), 13 (8), p. 1205-1216.
26. Crane, B. R., Getzoff, E. D. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1996), 6 (6), p. 744-756.
27. Crichton, R. R., Pierre, J. L. Old iron, young copper: from mars to venus. *BioMetals* (2001), 14, p. 99–112.
28. Cupello, M. P., Souza, C. F., Buchensky, C., Soares, J. B., Laranja, G. A., Coelho, M. G., Cricco, J. A., Paes, M. C. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Tropica* (2011), 120 (3), p. 208-211.
29. Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., Cerami, A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* (1985), 227 (4693), p. 1485-1487.
30. Foloppe, N., Nilsson, L. Stabilization of the catalytic thiolate in a mammalian glutaredoxin: structure, dynamics and electrostatics of reduced pig glutaredoxin and its mutants. *J. Mol. Biol.* (2007), 372 (3) p. 798-816.
31. Dumonteil, E. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania species* in the post-genomic era. *Infection, Genetics and Evolution* (2009), 9, p. 1075–1082.
32. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC,

- Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. (2005), 309 (5733), p. 409-415.
33. Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Cerami, A. The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1986), 21 (3), p. 247-257.
34. Fairlamb, A. H., Cerami, A. Metabolism of trypanothion in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* (1992), 46, p. 695-729.
35. Feng, Y., Zhong, N., Rohuier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J. P., Jin, C., Xia, B. Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at active site. *Biochem. J.* (2006), 45 (26), p. 7998-8008.
36. Fernandes, A. P., Holmgren, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox. Signal.* (2004), 6 (1), p. 63-74.
37. Filser, M., Comini, M. A., Molina-Navarro, M., Dirdjaja, N., Herrero, E., Krauth-Siegel, R. L. Cloning, functional analysis and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biol. Chem.* (2008), 389, p. 21-32.
38. Francisco, A. F., Melo de Abreu Vieira, P., Arantes, J. M., Pedrosa, M. L., Rodrigues Martins, H., Silva, M., Veloso, V. M., de Lana, M., Bahia, M. T., Tafuri, W. L., Carneiro, C. M. *Trypanosoma cruzi*: effect of benznidazol therapy combined with the iron chelator desferroxamine in infected mice. *Exp. Parasitol.* (2008), 120, p. 314-319.
39. Flohé, L. The tripanothione system and the opportunities it offers to create drugs for neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol. Adv.* (2012), 30 (1), p. 294-301.

40. Fyfe, P. K., Oza, S. L., Fairlamb, A. H., Hunter, W. N. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* (2008), 283 (25), p. 17672–17680.
41. Gan, Z. R., Sardana, M. K., Jacobs, J. W., Polokoff, M. A. Yeast thioltransferase: the active site cysteines display differential reactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* (1990), 282 (1), p. 110-115.
42. Hanschmann, E. M., Lönn, M. E., Schütte, L. D., Funke, M., Godoy, J. R., Eitner, S., Hudemann, C., Lillig, C. H. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin Prx3. *J. Biol. Chem.* (2010), 285 (52), p. 40699–40705.
43. Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J. R., Lillig, C. H. Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem Biophys Res. Commun.* (2010), 394 (2), p. 372-376.
44. Hersleth, H-P., Ryde, U., Rydberg, P., Görbitz, C. H., Andersson, K. K. Structures of the high-valent metal-ion haem–oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem.* (2006), 100, p. 460-476.
45. Herrero, E., de la Torre-Ruiz M. A. Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* (2007), 64, p. 1518-1530.
46. Hoffmann, B., Uzarskan M.A., Berndt, C., Godoy, J.R., Haunhorst, P., Lillig, C.H., Lill, R., Mühlenhoff, U. The multidomain thioredoxin-monothiol glutaredoxins represent a distinct functional group. *Antioxid. Redox Signal.* (2011), 15 (1), p. 19-30.
47. Holmgren, A. Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1976), 73 (7), p. 2275-2279.
48. Holmgren, A., Söderberg, B. O., Eklund, H., Brändén, C. I. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1975), 72 (6), p. 2305-2309.
49. Holmgren, A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* (1979), 254 (19) p. 9627-9632.
50. Hong, S. K., Cha, M. K., Kim, I. H. A glutaredoxin-fused thiol peroxidase acts as an important player in hydrogen peroxide detoxification in late-phased growth of *Anabaena sp.* *Arch. Biochem. Biophys.* (2008), 475(1), p. 42-49.

51. Hovey, J. G., Watson, E. L., Langford, M. L., Hildebrandt, E., Bathala, S., Bolland, J. R., Spadafora, D., Mendz, G. L., McGee D. J. (2007) Genetic microheterogeneity and phenotypic variation of *Helicobacter pylori* arginase in clinical isolates. BMC Microbiol. 7 (26).
52. Hoy, J. A., Hargrove, M. S. The structure and function of plant hemoglobins. Plant Physiol. Biochem. (2008), 46, p. 371-379.
53. Hu, Z., Poulton, J. E. Molecular analysis of (R)-(1)-mandelonitrile lyase microheterogeneity in black cherry. Plant Physiology (1999), 119, p. 1535–1546
54. Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Folh , L., Radi, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. Free Rad. Biol. Med. (2008), 45 (6), p. 733-742.
55. Iwema. T., Picchiocchi. A., Traore D., Ferrer. J-L., Chauvat. F., Jacquamet. L. Structural basis for delivery of intact [Fe₂S₂] cluster by monothiol glutaredoxin. Biochemistry (2009), 48 (26), p. 6041-6043.
56. Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C. H., Herrero, E. *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. Eukaryotic Cell (2008), 7 (8), p. 1415–1426.
57. Jbel, M., Mercier, A., Labbe, S. Grx4 monothiol glutaredoxin is required for iron limitation-dependent inhibition of Fep1. Eukaryotic cell (2011), 10 (5), p. 629-645.
58. Johansson, C., Roos, A. K., Montano, S. J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., Kavanagh, K. L. (2011) The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. Biochem. J. 433 (2), p. 303-311.
59. Johansson, C., Kavanagh, K. L., Gileadi, O., Oppermann, U. Reversible Sequestration of Active Site Cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. J. Biol. Chem. (2006), 282 (5), p. 3077-3082.
60. Johansson, C., Lillig, C. H., Holmgren, A. Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. J. Biol. Chem. (2004), 279 (9), p. 7537–7543.
61. Kaufmann, S. H. E., Schaible, U. E. Iron and microbial infection. Nature (2004), 2, p. 946-954.

62. Kelly, J. M., Taylor, M. C. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitol.* (2010), 37 (6), p. 899-917.
63. Kelly, J. J., Caputo, T. M., Eaton, S. F., Laue, T. M., Bushweller, J. H. (1997) Comparison of backbone dynamics of reduced and oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin-1 using relaxation measurements. *Biochemistry* 36, p. 5029-5044
64. Kido Y, Shiba T, Inaoka DK, Sakamoto K, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Moore A, Harada S, Kita K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Cryst.* (2010), 66, p. 275-278.
65. Kim, J., Rees, D. C., Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science* (1992), 257 (5077), p. 1677-1682.
66. Kim, K-D., Chung, W-H., Kim, H-J., Lee, K-C., Roe, J-H. Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010), 392 (3), p. 467-472.
67. Kim, M. J., Lee, B. C., Jeong, J., Lee, K. J., Kwang Yeon Hwang, K. Y., Gladyshev, V. N., Kim H. Y. Tandem use of selenocysteine: adaptation of a selenoprotein glutaredoxin for reduction of selenoprotein methionine sulfoxide reductase. *Molec. Microbiol.* (2011), 79 (5), p. 1194–1203.
68. Kim, S. K., Rahman, A., Conover, R. C., Johnson, M. K., Mason, J. T., Gomes, V., Hirasawa, M., Moore, M. L., Leustek, T., Knaff, D. B. Properties of the cysteine residues and the iron-sulfur cluster of the assimilatory 5'-adenylyl sulfate reductase from *Enteromorpha intestinalis*. *Biochem. J.* (2006), 45, p. 5010-5018
69. Koenig, K., Menge, U., Kiess, M., Wray, V., Flohe, L. Convenient isolation and kinetic mechanism of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* (1997), 272 (18), p. 11908–11915.
70. Kosower, N. S., Kosower, E. M. Thiol labeling with bromobimanes. *Methods Enzymol.* (1987), 143, p. 76-84.
71. Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., Schmidt, H. The parasite-specific trypanothion metabolism of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Biol. Chem.* (2003), 384, p. 539-549.

72. Krauth-Siegel, R. L., Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with tripanothion-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* (2008), 1780, p. 1236-1248.
73. Krauth-Siegel, L., Leroux, A. E. Low Molecular Mass Antioxidants in Parasites. *Antioxid Redox Signal.* (2011), 17 (4), p. 583-607.
74. Kurisu, G., Kusunoki, M., Katoh, E, Yamazaki, T., Teshima, K., Onda, Y., Kimata-Ariga, Y., Hase, T. Structure of the electron transfer complex between ferredoxin and ferredoxin-NADP(+) reductase. *Nat. Struct. Biol.* (2001), 8 (2), p. 117-121.
75. LAFEPE, Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. En: <http://www.dndi.org/paediatricbenz/productprofile.html>
76. Landino, L. M., Robinson, S. H., Skreslet, T. E., Cabral D. M. Redox modulation of tau and microtubule-associated protein-2 y the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004), 323, p. 112-117.
77. Lara, F. A., Sant'Anna, C., Femos, D., Laranja, G. A. T., Coelho, M. G. P., Reis Salles, I., Michael, A., Oliveira, P. L., Cunha-e-Silva, N., Salmon, D., Paes, M. C. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2007), 355, p. 16-22.
78. Liao, B. C., Hsieh, C. W., Lin, Y. C., Wung B. S. The glutaredoxin/glutathione system modulates NF-κB activity by glutathionylation of p65 in cinnamaldehyde-treated endothelial cells. *Toxicol. Sci.* (2010), 116 (1), p. 151–163.
79. Lill, R., Mühlhoff, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* (2008), 77, p. 669-700.
80. Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A. J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M. A., Webert, H., Wilbrecht, C., Mühlhoff, U.. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* (2012), 1823 (9), p, 1491-1508.
81. Lillig, C. H., Berndt, C., Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochimica et Biophysica Acta* (2008), 1780, p. 1304-1317.
82. Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., Holmgren, A. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *PNAS.* (2005), 102 (23), p. 8168-8173.

83. Lindahl, M., Kieselbach, T. Disulphide proteomes and interactions with thioredoxin on the track towards understanding redox regulation in chloroplasts and cyanobacteria. *J. Proteomics.* (2009), 72 (3) p. 416-438.
84. Liu, Y., Wang, F., Tan, X. Insights into the mechanistic role of the [Fe₄S₄] cubane in the A-cluster {[Fe₄S₄]-[SR]-[NipNid]} of acetyl-coenzyme A synthase. *Chem. Biochem.* (2011), 12 (9), p. 1417-1421.
85. Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., Tsien, R. Y. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (1998), 95 (12), p. 6803-6808.
86. Luo, M., Jiang, Y-L., Ma, X-X., Tang, Y-J., He, Y-X., Yu, J., Zhang, R-G., Chen, Y., Zhou, C-Z. Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J. Mol. Biol.* (2010), 398, p. 614-622.
87. McMerid, J. M., Prentice, A. M. Iron and infection: effects of host iron status and the iron-regulatory genes haptoglobin and NRAMPI (SLCI IAI) on host-pathogen interactions in tuberculosis and HIV. *Clin. Sci.* (2006), 110, p. 503-524.
88. Melchers, J., Dirdjaja, N., Ruppert, T., Krauth-Siegel, R. L. Glutathionylation of trypanosomal thiol redox proteins. *J. Biol. Chem.* (2007), 282 (12), p. 8678-8694.
89. Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J. M., Deponte, M. Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* (2008), 47, p. 1452-1463.
90. Meyer, O., Gremer, L., Ferner, R., Ferner, M., Dobbek, H., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W., Huber, R. The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. *Biol. Chem.* (2000), 381 (9-10), p. 865-876.
91. Molina-Navarro, M. M., Casas, C., Piedrafita, L., Belli, G., Herrero, E. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe-S clusters in yeast mitochondria. *FEBS. Lett.* (2006), 580, p. 2273-2280.
92. Moura, I., Moura, J. J. Structural aspects of denitrifying enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2001), 2 (2), p. 168-175.

93. Mühlenhoff, U., Richhardt, N., Gerber, J., Lill, R. Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* (2002), 277 (33), p. 29810-29816.
94. Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., Lill, R. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO* (2003), 22 (18), p. 4815-4825.
95. Murta, S. M. F., Gazzinelli, R. T., Brener, Z., Romanha, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.* (1998), 93, p. 203–214.
96. Noguera, V., Walker, O., Rouhier, N., Jacquot, J-P., Krimm, I., Lancelin, J-M. NMR reveals a novel glutaredoxin-glutaredoxin interaction interface. *J. Mol. Biol.* (2005), 353, p. 629-641.
97. Nolan, D. P., Voorheis, H. P. Hydrogen ion gradients across the mitochondrial, endosomal and plasma membranes in the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* (2000), 267 (15), p. 4601-4614.
98. Nordlund, P., Eklund, H. Di-iron-carboxylate proteins. *Curr. Op in Struc. Biol.* (1995), 5, p. 758-766.
99. Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J. C., Roland Lill, R., R. Winge D. R. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomices cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* (2006), 281 (26), p. 17661–17669.
100. Oza, S. L., Tetaud, E., Ariyanayagam, M. R., Warnon, S. S., Fairlamb, A. H. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* (2002), 277 (39), p. 35853–35861.
101. Oza, S. L., Shaw, M. P., Wyllie, S., Fairlamb, A. H. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. *Molec. & Biochem. Parasitol.* (2005), 139, p. 107–116.
102. Pan American Health Organization. Chagas Disease. Actualizado Octubre, 2011. En: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3593&Itemid=3921&cat_id=143.
103. Perez Brandan, C., M. Padilla, A. M., Xu, D., Tarleton, R. L., Miguel A. Basombrio, M. A. Knockout of the dhfr-ts gene in *Trypanosoma cruzi* generates

- attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. *PloS Negl. Trop. Dis.* (2011), 5(12): e1418.
104. Picciocchi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., Chauvat, F. CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry.* (2007), 46 (51), p. 15018-15026.
 105. Reichheld, J-P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., Meyer, Y. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* (2007), 19, p. 1851–1865.
 106. Riener, C. K., Kada, G., Gruber, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4, 4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* (2002) 373, p. 266–276.
 107. Ren, G., Stephan, D., Xu, Z., Zheng, Y., Tang, D., Harrison, R. S., Kurz, M., Jarrott, R., Shouldice, S. R., Hiniker, A., Martin, J. L., Heras, B., Bardwell, J. C. A. Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* (2009), 284 (15), p. 10150–10159.
 108. Riddles, P. W., Blakeley, R. L., Zerner, B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): a reexamination. *Anal. Biochem.* (1979), 94 (1), p. 75-81.
 109. Riondet, C., Desouris, J. P., Guilleminotmontoya, J., Chartier, Y., Meyer, Y., Reichheld, J-P. A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2. *Plant Cell Environ.* (2012), 35, p. 360–373.
 110. Rodríguez-Manzanaque, M. T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., Herrero, E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron-sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* (2002), 13, p. 1109-1121.
 111. Rohuier, N., Couturier, J., Johnson, M. K., Jacquot, J. P. Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* (2010), 35 (1), p. 43-52.
 112. Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S. K., Hirasawa, M., Gualberto, J. M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D. B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M. K., Jacquot, J. P. Functional, structural and spectroscopic characterization

- of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1. Proc. Nat. Acad. Sci. (2007), 104 (18), p. 7379-7384.
113. Salzman, T. A., Stella, A. M., Wider de Xifra, E. A., Del Batlle, A. M., Docampo, R., Stoppani, A. O. M. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. (1982), 72B (4), p. 663-667.
 114. Shomura, Y., Yoon, Ki-S., Nishihara, H., Higuchi, Y. Structural basis for a [4Fe-3S] cluster in the oxygentolerant membrane-bound Ni-Fe hydrogenase. Nature (2011), 479 (7372), p. 253-256.
 115. Smíd, O., Horáková, E., Vilímová, V., Hrdy, I., Cammack, R., Horváth, A., Lukes, J., Tachezy, J. Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. (2006), 281 (39), p. 28679-28686.
 116. Smith, K., Nadeau, K., Bradley, M., Walsh, C., Fairlamb, A. H. Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. Protein Sci. (1992), 1, p. 874-883.
 117. Sokolova, A. Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S. L., Read, K. D., Fairlamb, A. H. Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. Antimicrob. Agents Chemother. (2010), 54 (7), p. 2893-2900.
 118. Sotirchos, I. M., Hudson, A. L., Ellis, J., Davey, M. W. A unique thioredoxin of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* with glutaredoxin activity. Free Radic. Biol. Med. (2009), 46 (5), p. 579-585.
 119. Srajer, V., Ren, Z., Teng, T-Y., Schmidt, M., Ursby, T., Bourgeois, D., Pradervand, C., Schildkamp, W., Wulff, M., Moffat, K. Protein conformational relaxation and ligand migration in myoglobin: a nanosecond to millisecond molecular movie from time-resolved Laue X-ray diffraction. Biochem. J. (2001), 40, p. 13802-13815.
 120. Sutak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J., Richardson, D. E. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. Trends Microbiol. (2008), 16 (6), p. 261-268.
 121. Tamarit, J., Bellí, G., Cabisco, E., Herrero, E., Ros, J. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. J. Biol. Chem. (2003), 278 (28), p. 25745-25751.

122. Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P., Rouhier, N., D. Lemaire, S., Rey, P. Regeneration Mechanisms of Arabidopsis thaliana Methionine Sulfoxide Reductases B by Glutaredoxins and Thioredoxins. *J. Biol. Chem.* (2009), 284 (28), p. 18963–18971.
123. Taylor, M. C., Kelly, J. M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitol.* (2010), 137 (6), p. 899-917.
124. Trotter, E. W., Grant, C. M. Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomices cerevisiae*. *Eukaryot Cell* (2005), 4 (2), p. 392-400.
125. Ullu, E., Tschudi, C., Chakraborty, T. RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* (2004), 6 (6) p. 509-519.
126. van den Berg, S., Löfdahl, P. A., Härd, T., Berglund, H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J. Biotechnol.* (2006), 121 (3), p. 91-98.
127. Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M. J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S. K., Pays, E. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* (2008), 320, p. 677-671.
128. Vergauwen, B., Pauwels, F., Jacquemotte, F., E. Meyer, T. E., Cusanovich, M. A., Bartschi, R. G., Van Beeumen, J. J. Characterization of Glutathione Amide Reductase from *Chromatium gracile*. *J. Biol. Chem.* (2001), 276 (24), p. 20890–20897.
129. Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzanique, M., Bellí, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., Herrero, E. Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulfur cluster assembly. *Comp. Funct. Genom.* (2004), 5, p. 328-341.
130. Wang, J., Boja E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieyal, J. J., Chock, P. B. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* (2001), 278 (51), p. 47763–47766.
131. Wiley, S. E., Paddock, M. L., Abresch, E. C., Gross, L., van der Geer P., Nechushtai, R., Murphy, A. N., Jennings, P. A., Dixon, J. E. The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. *J. Biol. Chem.* (2007), 282 (33), p. 23745–23749.
132. Wingert, R. A., Galloway, J. L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J. L., Weber, G. J., Dooley, K., Davidson, A. J., Schmidt, B., Paw B. H., Shaw, G. C., Kingsley,

- P., Palis, J., Schubert, H., Chen, O., Kaplan, J., Zon, L. I. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* (2005), 436 (18), p. 1035-1039.
133. World Health Organization. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. 2007. En: http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/pdf/swg_chagas.pdf.
134. World Health Organization. Chagas Disease, 2010. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
135. Xie, Y., Kole, S., Precht, P., Pazin, M. J., Bernier, M. S-Glutathionylation impairs Signal Transducer and Activator of Transcription 3 activation and signaling. *Endocrinology* (2009), 150 (3), p. 1122–1131
136. Xing, S., Rosso, M. G., Zachgo, S. ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* (2005), 132 (7), p. 1555-1565.
137. Ye, H., Jeong, S. Y., Ghosh, M. C., Kovtunovych, G., Silvestri, L., Ortillo, D., Uchida, N., Tisdale, J., Camaschella, C., Rouault T. A. Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.* (2010), 137 (6), p. 899-917.
138. Yuan Qi, Y., Grishin, N. V. Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (2005), 58 (2), p. 376–388.
139. Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., Lemaire, S. D. Biochemical characterization of Glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* (2008), 283 (14), p. 8868-8876.

7. Agradecimientos

A la gente del laboratorio, por las ideas, sugerencias y por estar siempre para dar una mano. Sobre todo a Bruno, por acompañarme durante toda esta etapa con enseñanzas y desafíos continuos. También por el gran crecimiento (no sólo académico) que implicó este tiempo para mí.

A mis amigas y compañeras de la carrera, Pau y Vir. Por los momentos estresantes que sufrimos y a la vez disfrutamos. Por las comidas y todo ese café...

A mis amigos de la vida: Maris, DanielÖ, Valito, Fran, Fede, Gordo, Mariana. Por ser parte de mi vida y dejarme también ser parte de la suya. Por compartir los buenos momentos y bancarme en los malos, sobre todo en estos últimos tiempos haciéndome sentir su compañía.

A mi familia, pero más que nada a Mamá y Papá. Por el apoyo que me han dado durante todas las etapas de mi vida y esta última en particular. Por siempre haberme impulsado a hacer lo que quisiera pero más que nada por el cariño de todos los días.