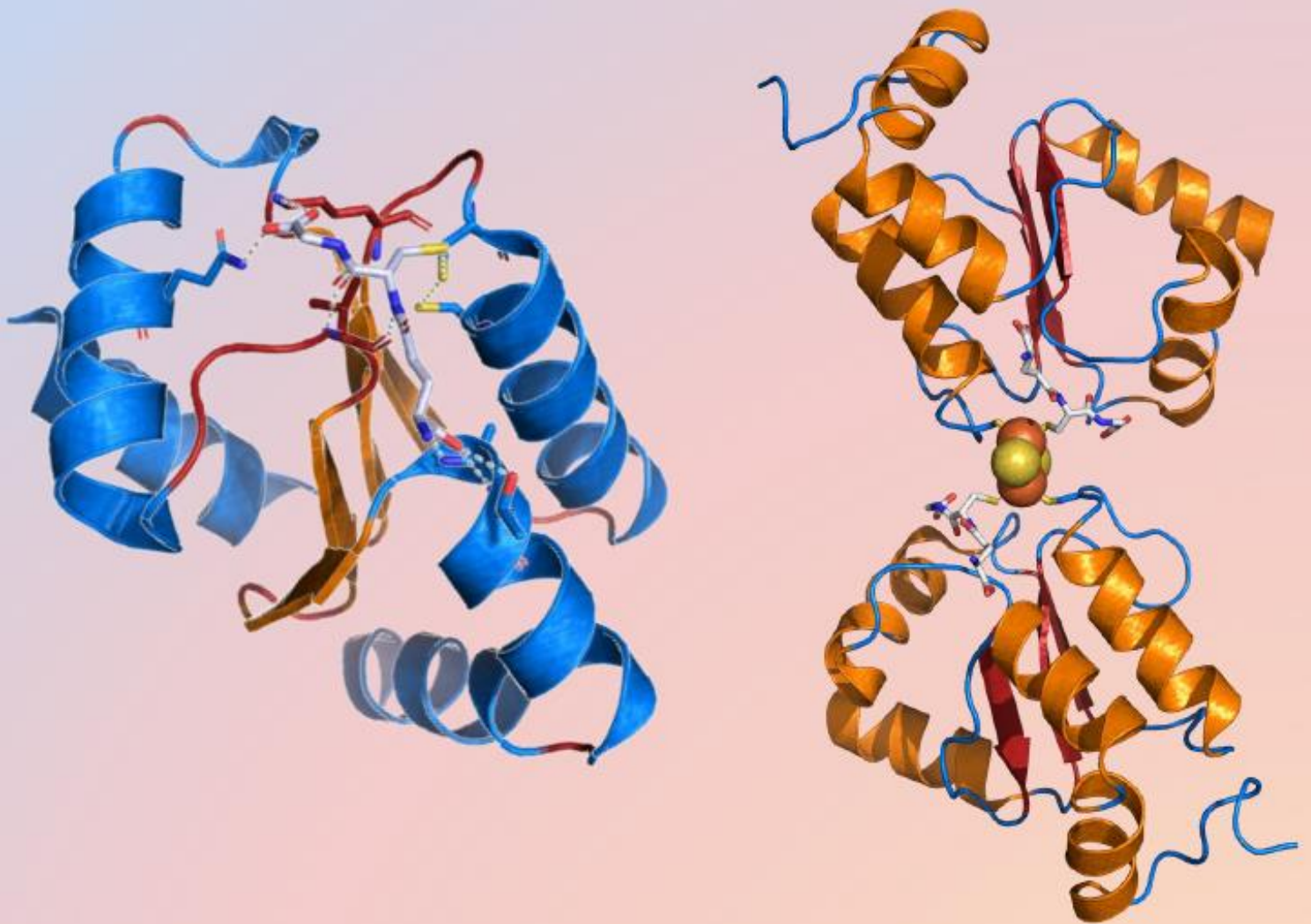


ORÍGENES ESTRUCTURALES DE LAS DIFERENCIAS FUNCIONALES EN GLUTARREDOXINAS HUMANAS



Sebastián Villar

Tutor: Gerardo Ferrer-Sueta

*Laboratorio de Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias, UdelaR*

Diciembre 2017

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Gerardo Ferrer-Sueta y a Bruno Manta, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Fisicoquímica Biológica del Instituto de Química Biológica de Facultad de Ciencias, UdelaR. A Gerardo, le agradezco nuevamente, por todo lo que he aprendido a nivel práctico en el laboratorio, por el buen trato, por las valiosas ideas y consejos compartidos.

A cada uno de los integrantes de los laboratorios de Fisicoquímica Biológica y Enzimología, por la amistad generada en este tiempo, la solidaridad, y generar un ambiente de trabajo inigualable en el cual me sentí, y me siento, muy cómodo. En particular, agradecer a Karin por su ayuda y paciencia, con la expresión y purificación de proteínas y Matías, por ayudarme y enseñarme a sintetizar dos reactivos fundamentales para este trabajo: el FGSSGF y el "Geseto".

También quiero agradecer a mis amigos de facultad, por acompañar a lo largo de la carrera, y por la amistad de todos estos años, haciendo a la vida universitaria mucho más divertida y llevadera.

A mis amigos de toda la vida, que pese a nunca terminar de entender bien a que me dedico, apoyaron siempre con mucha alegría y entusiasmo.

Por último, y más importante, agradezco a toda mi familia y a mi novia Meche, por todo el apoyo incondicional, la motivación y la comprensión, que fueron pilares fundamentales para que pudiera atravesar este camino.

A todos ellos, gracias por tanto y perdón por tan poco.

Resumen

Las glutarredoxinas son proteínas pequeñas, de aproximadamente 80 a 120 aminoácidos con plegamiento tipo tiorredoxina, un sitio activo CXXC/S y presentes en organismos de todos los reinos. Algunas, catalizan reacciones de intercambio tiol-disulfuro, mientras que otras utilizan el glutatión para la biogénesis de centros Fe-S.

En este trabajo se profundiza sobre la reactividad de dos glutarredoxinas humanas: Grx2 y Grx5. La primera, es activa en reacciones de intercambio tiol-disulfuro, mientras que la última no. A raíz de esto, se plantea identificar el origen de las diferencias funcionales en estas proteínas muy similares, a nivel estructural. Para ello, distintas variantes de Grx2 y Grx5 se someten a ensayos relacionados a reactividad nucleofílica, actividad enzimática y determinaciones de pKa de residuos de cisteína.

Los ensayos de reactividad nucleofílica, apuntan al estudio cinético de la reacción entre los tioles de cisteína y dos electrófilos: el monobromobimano (mBBr) y un disulfuro de glutatión marcado con fluoresceína.

Para evaluar la actividad de intercambio tiol-disulfuro, se siguió la reacción entre la proteína y un disulfuro mixto, de glutatión y mercaptoetanol, por consumo de NADPH dado por la glutatión reductasa.

El pKa se determinó mediante distintas técnicas, observando: la absorbancia del tiolato (RS⁻) a 240 nm, el espectro de emisión de las proteínas y las velocidades iniciales de reacción con mBBr; todo en función del pH.

La acidez de las cisteínas fue similar para todas las proteínas, al igual que para una cisteína fuera del sitio activo de la Grx5. La reactividad con reactivo inespecífico (mBBr) fue dos órdenes de magnitud mayor para Grx2 que para Grx5. En cuanto al sustrato específico (FGSSGF) se observó que la reacción para la Grx2 resultó ser 10⁵ veces más rápida que para la Grx5; y que la última no posee actividad en el ensayo enzimático, a diferencia de la primera.

Contenidos

1. Introducción	5
1.1 Glutarredoxinas	6
1.1.1 Descubrimiento	6
1.1.2 Clasificación y rol biológico	7
1.1.3 El Glutati6n	10
1.1.4 Estructura: plegamiento Trx	11
1.2 Intercambio tiol-disulfuro	15
1.2.1 Aspectos generales	15
1.2.2 Deglutationilaci6n	17
1.2.3 Ensayos de actividad y titulaci6n de tioles proteicos	19
1.2.4 Nucleofilia y pK _a en Grx	22
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo general	25
2.2 Objetivos especificos	25
3. Materiales y M6todos	27
3.1 Materiales de uso general	28
3.1.1 Proteinas en este trabajo	28
3.1.2 Soluciones amortiguadoras	29
3.1.3 Medios de cultivo	30
3.2 M6todos	30
3.2.1 Procedimientos generales	30
3.2.1 Procedimientos especificos	39
4. Resultados y Discusi6n	49
4.1 Estudio de pK_a	50
4.1.1 Titulaci6n de hGrx5 y variantes, a partir del cambio en el centro de masa del espectro de emisi6n del tript6fano	50
4.1.2 Titulaci6n de hGrx2 WT, a partir del cambio en la absorbancia del tiolato a 240 nm	53
4.1.3 Titulaci6n de glutarredoxinas mediante reactividad con mBBr	56
4.2 Cin6tica bimolecular	61
4.2.1 Cin6tica con mBBr	61
4.2.2 Cin6tica con FGSSGF	67
4.3 Cin6tica enzim6tica	73
4.3.1 Medidas de actividad enzim6tica	73
4.3.2 Cin6tica michaeliana	76

Conclusiones y Perspectivas	83
Bibliografía	85

1.Introducción

1.1 Glutarredoxinas

1.1.1 Descubrimiento

A lo largo de su historia en la literatura científica, las actualmente llamadas glutarredoxinas (Grx), han sufrido un particular problema de identidad.

Todo comenzó en el año 1955, cuando el bioquímico austríaco, futuro descubridor de la ATPsintasa, Efraim Racker se encontraba realizando estudios, en la universidad de Yale, sobre la reducción de glutatión disulfuro (GSSG) a partir de glutatión reductasa (GSSG reductasa, o, GR) de extractos crudos de hígado bovino. En el proceso, encontró otros compuestos disulfuro que también lograban reducirse en presencia del extracto. Entre ellos, se encontraba la homocistina, que se presentó como la más activa aceptora de equivalentes de reducción. El estudio, se dirigió a caracterizar la reducción de homocistina, a partir de glutatión (GSH) a través de un nuevo tipo de enzima, encargada de catalizar la transferencia de protones, desde tioles a disulfuros. Al sistema, y a la enzima, se los llamó “glutatión-homocistina transhidrogenasa”. Este primer encuentro con las futuras protagonistas, fue bastante preliminar, debido a que no se contaba con proteína completamente purificada, por lo que no se le pudo asignar la función a una única enzima[1]. Entonces, la actividad transhidrogenasa desde sulfhidrilos a disulfuros, permaneció huérfana, por un tiempo.

Más tarde, en el año 1974, científicos escandinavos plantearon cambiar el nombre del tipo de proteínas que realizaban la función determinada por Racker. Demostraron empíricamente que la enzima que cataliza el intercambio tiol-disulfuro (ver 1.2) entre cistina y glutatión, lo hace siguiendo un mecanismo secuencial de dos sustratos, es decir, primero disulfuro y luego tiol. A consecuencia de esto, llegaron a nombrar a estas enzimas: “Tioltransferasas”, dada su capacidad de transferir tioles, como el GSH, a disulfuros. Al mismo tiempo recomendaron evitar el nombre “transhidrogenasa”, debido a que las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, presentaron intermediarios inesperados para las transhidrogenaciones[2].

No fue hasta dos años más tarde, que el pionero redox, referente de las tiorredoxinas y también escandinavo, profesor Arne Holmgren, mencionó en su publicación a unas proteínas térmicamente estables, capaces de reducir la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), las cuales el bautizó con el nombre de: “Glutarredoxinas” (Grx). Estudiando una cepa de *E.coli*, mutante para tiorredoxinas (Trx), e incapaz de replicar el ADN del fago T7; el profesor descubrió otro sistema de reducción presente en los lisados bacterianos, dependiente de GSH y la enzima reductora de su disulfuro (GR), que a expensas del poder reductor del NADPH, podía recuperar la capacidad de replicar el ADN del fago. Este sistema, en presencia de la RNR, también podía reducir citosina-difosfato (CDP) a dideoxi citosina-difosfato (dCDP). Dicho sistema, presentó actividad similar al conocido hasta ese entonces, tiorredoxina-tiorredoxina reductasa (Trx-TR), y perdía actividad si la GR era remplazada por TR. Concluyendo, el grupo de Holmgren demostró, que el glutatión puede proveer su poder reductor a la enzima generadora de desoxinucleótido difosfato (dNDP), si está acoplado a una novedosa enzima, con aparente especificidad por el GSH[3].

En los últimos años, se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre glutarredoxinas. Análisis filogenéticos y ensayos funcionales han revelado la existencia de varias clases y el descubrimiento de nuevas funciones; entre ellas el rol de glutarredoxinas en el metabolismo y la homeostasis del hierro. Este rol es tan ubicuo como su actividad oxidorreductasa, y también se encuentra representado en todos los organismos[4].

Se ha visto que ciertas Grx son indispensables para la biogénesis de centros hierro-azufre (Fe-S). Células de levadura mutantes en el gen *grx5* demostraron deficiencia en la formación de centros Fe-S de proteínas como la aconitasa y succinato deshidrogenasa, desencadenando crecimiento defectuoso y aumento de sensibilidad a la oxidación debido a la acumulación de hierro libre[5, 6].

Paradójicamente, el nombre “glutarredoxina” no abarca, o describe de manera adecuada, a todas las proteínas que integran a esta familia. Las que no usan el GSH como sustrato para reducir disulfuros, quedan por fuera de lo que sugiere el nombre, entonces la nomenclatura en cuanto a estas proteínas es algo que todavía necesita de trabajo, pero más que nada, de consenso. Se ha avanzado mucho en el descubrimiento de nuevas isoformas y nuevas funciones para estas proteínas, ampliando el rol que cumplen a nivel fisiológico, más precisamente en el campo de la biología redox.

1.1.2 Clasificación y rol biológico

Las glutarredoxinas son proteínas pequeñas (10 a 16 kDa) de 80 a 120 aminoácidos, con una amplia distribución y diversidad en todos los dominios de la vida. Junto con las Trx, son las principales responsables de mantener reducidos a los residuos de cisteína del resto del proteoma, ante condiciones oxidantes desfavorables, mejor conocidas como estrés oxidativo[7]. Las Grx se caracterizan por pertenecer a la familia de proteínas que comparten el plegamiento tipo Trx[8], conteniendo al menos un dominio con este tipo de configuración estructural. Su motivo de sitio activo CXXC/S, es característico de la familia que integran y es el punto de partida de los criterios clasificatorios. A nivel intracelular, cada organismo presenta un patrón determinado de Grx, que puede variar entre compartimentos en el caso de eucariotas: existen Grx citosólicas, mitocondriales, nucleares, del cloroplasto, del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi[9, 10].

La clasificación más básica para Grx simplemente tiene en cuenta el número de cisteínas del sitio activo y las separa en dos grupos: Grx ditiólicas CXXC, y Grx monotiólicas CXXS. Esta clasificación fue por mucho tiempo “suficiente”, para organismos que presentan una diversidad relativamente acotada de glutarredoxinas, como bacterias, levaduras y humanos. No obstante, estudios evolutivos han llegado a una clasificación más acertada, desde el punto de vista filogenético, y también más extensa, que ha distinguido a las Grx en seis clases. Las primeras dos clases, son las más “tradicionales”, ubicuas en todos los dominios de la vida, y comprenden a las proteínas de este trabajo, las otras 4 clases son específicas de organismos fotosintéticos[11].

Las Grx de clase I presentan un sitio activo del tipo C{P/G/S}{F/Y}{C/S}, son las más distribuidas y generalmente todas son activas en distintos ensayos de reducción de disulfuros, además del conocido caso de la reducción de la ribonucleótido-reductasa (RNR) por parte de la Grx1 de *E.coli*[12]. Esto último involucra a las Grx de esta clase, en la síntesis de dNTP, y por lo tanto en la síntesis de ADN. Mayoritariamente, se les ha adjudicado a estas proteínas el rol de antioxidante, por su capacidad de reducir disulfuros mixtos entre glutatión y tioles de residuos de cisteína proteicos, en una actividad llamada “deglutinationilación”, la cual se describirá más adelante. Algunas proteínas de esta clase son capaces de coordinar centros hierro-azufre (Fe-S) conjuntamente con el GSH. La Grx2 humana es un ejemplo bien estudiado de este caso, ya que es capaz de unir centros [2Fe-2S] formando un homodímero inactivo; a raíz de esto se ha propuesto que la coordinación en estas enzimas es responsable de modular su actividad[13, 14].

La clase II se subdivide en dos grupos, compuestos por glutarredoxinas monoméricas y multiméricas, con un sitio activo altamente conservado, CGFS. Grx multiméricas, como la 3 de humano y la 4 de levadura, pueden tener varios dominios Grx, o bien, un dominio Trx. Se cree que el origen de estas glutarredoxinas proviene de fenómenos de duplicación, a partir de un gen ancestral que poseía los genes Grx y Trx fusionados[11].

Esta clase de Grx posee la particularidad de no presentar actividad de deglutinationilación[15], a excepción de algunos casos puntuales[16]. Por otro lado, su rol más activo a nivel biológico, está relacionado con la biogénesis y transferencia de centros Fe-S. Se ha notado empíricamente, que la ausencia de Grx monotiólicas, como la 5 de *S.cerevisiae*, causan la acumulación de hierro en la célula, promoviendo el daño oxidativo, y la inactivación de enzimas que requieren de centros Fe-S para desempeñar su función[6]. Otro de los roles asignados para esta clase de glutarredoxinas es la capacidad de detectar la concentración hierro en los distintos compartimentos celulares y participar en la homeostasis del hierro junto con otras proteínas[4].

SITIO ACTIVO

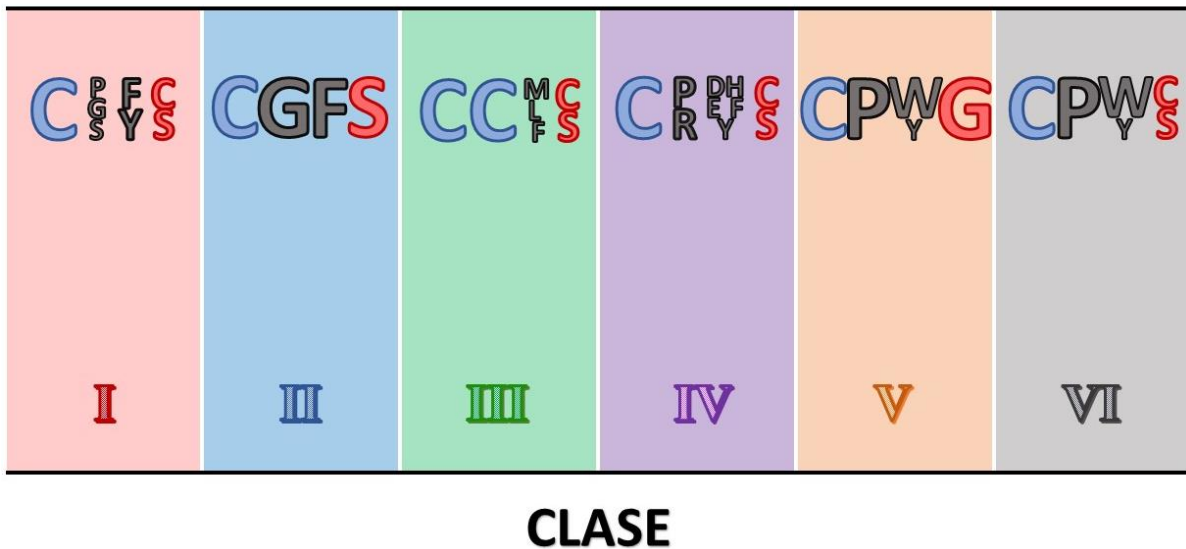


Figura 1.1. Sitio activo de las seis clases de Grx. Las posiciones amino y carboxilo terminal del motivo se representan con azul y rojo respectivamente. El tamaño de la fuente está directamente relacionado con la conservación de los residuos en las distintas posiciones del motivo. Construido a partir de Couturier et al., 2009[11].

La clase III es específica de plantas, e incluye a Grx con sitio activo $CC\{M/L/F\}\{C/S\}$. Las glutarredoxinas de clase IV, presentes en todos los eucariotas fotosintéticos, poseen el dominio Grx en su N-terminal, con un sitio activo tipo $CXX\{C/S\}$, fusionado con otros dos dominios de función desconocida, hacia su extremo C-terminal. Las últimas dos clases de Grx (V y VI), son exclusivas de cianobacterias, y presentan más de un dominio. Las Grx de clase V constan de un particular sitio activo $CP\{W/Y\}G$, mientras que las de clase VI tienen un motivo $CP\{W/Y\}\{C/S\}$ [9, 11].

1.1.3 El Glutatión

El L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, mejor conocido como glutatión, es el tiol de bajo peso molecular más abundante en los organismos de todos los dominios de la vida[17]. Desde el punto de vista químico, es un péptido particular porque presenta un enlace peptídico inusual entre el ácido carboxílico de la cadena lateral del glutamato y el grupo amino de la cisteína.

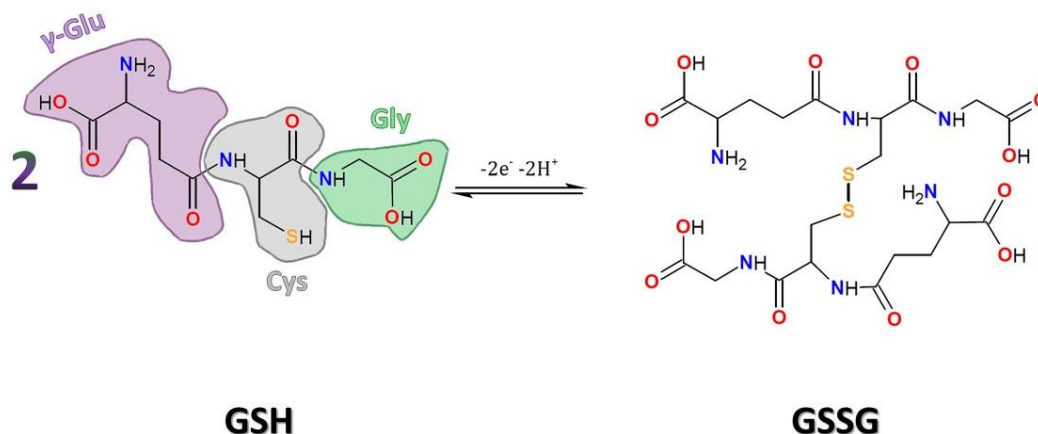


Figura 1.2. Oxidación del GSH a GSSG.

En general se lo describe como amortiguador redox y agente antioxidante en la célula, dada su capacidad de reaccionar con especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, protegiendo a los componentes celulares sensibles a la oxidación. No obstante, su metabolismo celular es considerablemente más amplio. El mismo comprende la detoxificación de aldehídos, xenobióticos y metales pesados; la síntesis de eicosanoides, esteroides y centros de hierro-azufre. El GSH también se encuentra involucrado en el plegamiento oxidativo de proteínas, y la señalización redox[18].

Las concentraciones de GSH dependen del organismo, el tipo de celular y hasta del compartimento intracelular. Existen estimaciones para el citosol de levaduras que se aproximan a concentraciones de 13 mM[19, 20], mientras que para algunas bacterias, como *E.coli*, puede llegar a 20 mM[21]. En el caso de eucariotas, para sus organelos, las concentraciones de GSH, y su forma oxidada (GSSG), depende de fenómenos de transporte mediados por moléculas transportadoras y porinas en la interface organelo-citosol. Por ejemplo, para el periplasma mitocondrial la concentración se equilibra rápidamente con la del citosol, debido a la presencia de poros por los cuales el GSH difunde[22]. En cambio, el ingreso de GSH y GSSG a otros compartimentos puede estar regulado por transportadores, como el de la familia ABC, Ycf1, capaz de transportar rápidamente el GSSG presente en el citosol al sistema de secreción vacuolar[23]. Algo similar sucede en el retículo endoplásmico.

Dentro de la célula el GSH se encuentra mayoritariamente en su forma reducida, ya que las concentraciones de GSSG se estiman en el orden de 0,2 μ M, como fue reportado para levaduras[24]. Esto se debe, en parte, a la acción de la glutatión reductasa, además del transporte activo anteriormente mencionado.

El glutatión ha dejado una profunda huella en los organismos a nivel evolutivo. Esto se ve reflejado en la existencia de por lo menos 5 plegamientos proteicos distintos (dentro de ellos el Trx), que han optimizado sus interacciones y catálisis con el GSH a lo largo de la evolución. Estas proteínas dependientes de glutatión, permitieron a eucariotas y procariotas metabolizar una variedad de sustratos electrófilos derivados de la vida aeróbica y la exposición a xenobióticos[18].

1.1.4 Estructura: plegamiento Trx

Las glutarredoxinas pertenecen a la familia de las proteínas con plegamiento tipo Trx[8]. Este tipo de arreglo estructural, comprende a proteínas de la clase de la glutatión transferasa (GST), proteína-disulfuro isomerasa (PDI), peroxirredoxina (Prx) y glutatión peroxidasa (GPx), además de las ya mencionadas, glutarredoxina y tiorredoxina. Pese a que no todas poseen funcionalidad redox, comparten una característica en común, que es la química de cisteínas: todas participan en reacciones con grupos tioles y/o disulfuro[25].

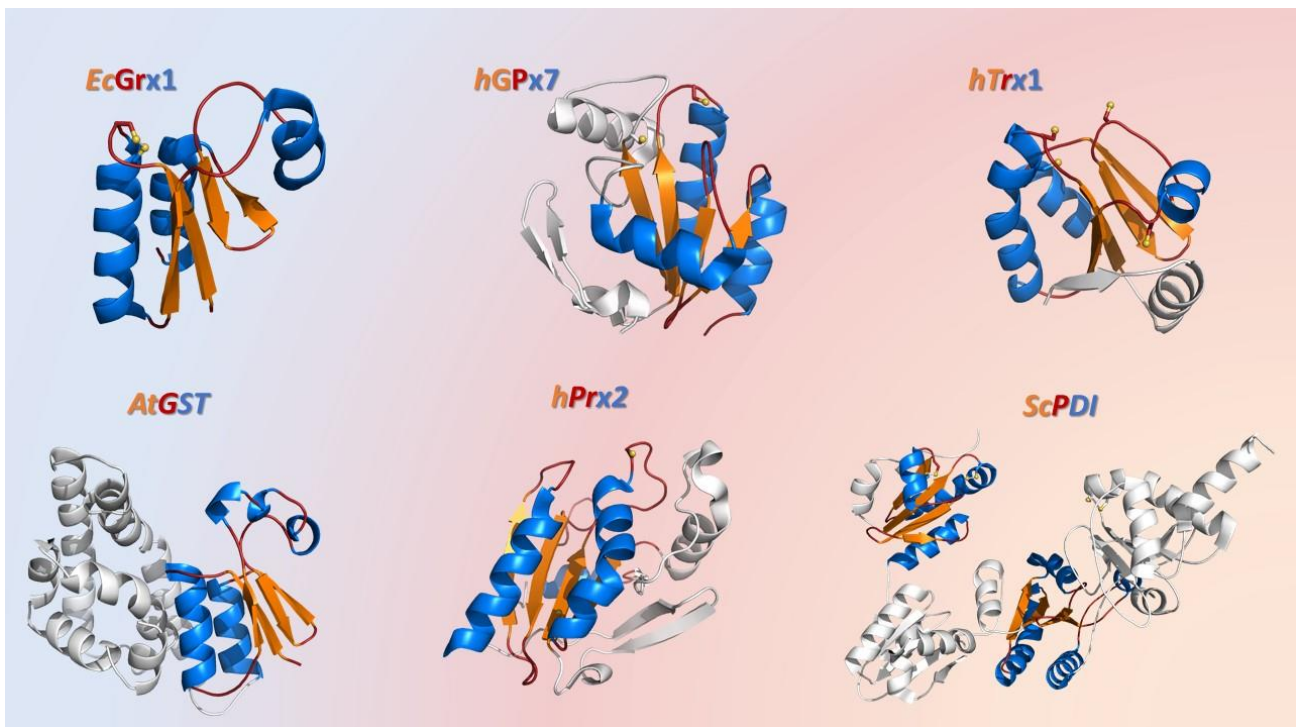


Figura 1.3. Plegamiento Trx en distintos miembros de la familia. Las hélices azules, hojas naranjas y bucles rojos, muestran los elementos de la estructura secundaria del plegamiento Trx. Con bolas amarillas se representan las cisteínas. En blanco se muestran los elementos que exceden al núcleo del plegamiento. Las estructuras corresponden a las siguientes proteínas: *E.coli* Grx1 (PDB: 1EGO), *h.sapiens* GPx7 (PDB: 2P31), *h.sapiens* Trx1 (PDB: 1ERT), *A.thaliana* GST (PDB: 1GNW), *h.sapiens* Prx2 (PDB: 5IJT) y *S.cerevisiae* PDI (PDB: 2B5E).

El núcleo del plegamiento Trx, consiste en 4 hojas β , rodeadas por tres hélices α . Estas estructuras secundarias, se separan en dos grupos: “ $\beta\alpha\beta$ ”, cercano al extremo

amino (N-terminal), en el que sus hojas β (b1 y b2) son paralelas; y en el extremo carboxilo (C-terminal), el grupo " $\beta\beta\alpha$ " en el que sus hojas b3 y b4 son antiparalelas. Las hélices a1 y a3, se alinean en un plano paralelo al de las hojas β , mientras que a2 se encuentra en el plano opuesto y se orienta perpendicularmente con respecto a las otras hélices[25, 26]. Lo anterior se puede percibir en la representación tridimensional de la Grx1 de *E.coli*, en la figura 1.4. Lo particular de esta proteína, es que es el mejor ejemplo del plegamiento Trx básico, porque no presenta estructuras adicionales.

Otra característica importante de este plegamiento, es la presencia de una prolina en conformación *cis* (*cis*-Pro), ubicada en el bucle anterior a la hoja b3. La misma se encuentra cercana al sitio activo, y se ha descrito como posible determinante de la función de proteínas con plegamiento Trx[27, 28].

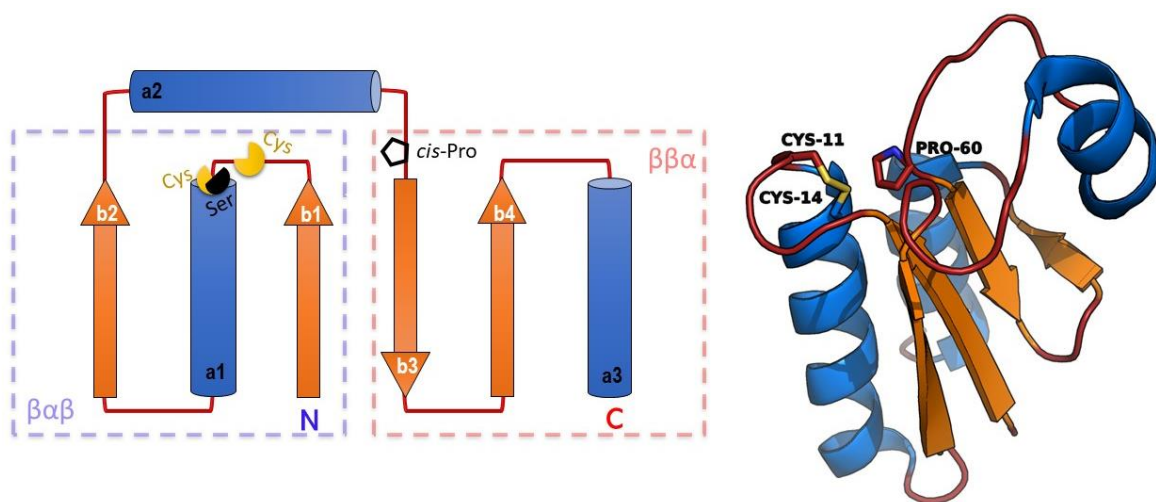


Figura 1.4. Representaciones del plegamiento Trx. A la izquierda se muestra la distribución de los elementos de la estructura secundaria, las flechas naranjas y los cilindros azules representan las hojas β y las hélices α respectivamente. Los bucles se indican en rojo. Los símbolos amarillos y negros identifican los residuos del motivo Cys-X-X-Cys/Ser, el pentágono negro representa el *cis*-Pro. Los recuadros segmentados, azul y rojo, señalan los grupos $\beta\alpha\beta$ N-terminal y $\beta\beta\alpha$ C-terminal respectivamente. La figura de la derecha es una representación tridimensional de la Grx1 de *E.coli* (código PDB: 1EGO). Para esta figura se mantuvo el código de colores empleado en la representación de la izquierda.

El sitio activo para las Grx es un motivo Cys-X-X-Cys/Ser, ubicado en el bucle ("Loop") que se forma entre la hoja β 1 y la hélice α 1. La cisteína N-terminal se ubica en el bucle, mientras que la C-terminal, se encuentra en la primera vuelta de la hélice a1.

La cisteína N-terminal, está relativamente expuesta al solvente, tiende a ser la más ácida en términos de pK_a y es la encargada de iniciar la catálisis, en el caso de las Grx con actividad oxidoreductasa. No obstante, el residuo de cisteína C-terminal está menos expuesto al solvente y presenta un valor mayor de pK_a .

A diferencia de otras oxidoreductasas de cisteína de la misma familia, las glutarredoxinas presentan una afinidad inherente por la entidad glutatión en disulfuros [29, 30]. Existe un surco en la superficie de las Grx, que está constituido por residuos que forman interacciones polares, o de enlace de hidrógeno (EdH), con el glutatión. Para estructuras de Grx formando disulfuro con GSH (Grx-SSG) de humano, levadura y *E.coli*, se ha visto que el esqueleto carbonado del residuo de cisteína del GSH,

forma enlaces de hidrógeno con los grupos amida y carbonilo de un residuo de valina conservado. Los grupos carboxilato y amino del γ -glutamato, son estabilizados por residuos con carga complementaria, por lo que se ha visto en la mayoría de las estructuras; no obstante, los residuos responsables de estas interacciones, difieren entre especies. El grupo carboxilato de la glicina del GSH, es estabilizado por residuos dadores de EdH, o, interacciones polares con residuos cargados positivamente, como lisinas o argininas[31]. También se ha reportado, que el carboxilato de la entidad γ -glutamato es estabilizado por el extremo positivo del dipolo de la hélice $\alpha 3$ [32]. En la figura 1.5, se resumen las interacciones descritas.

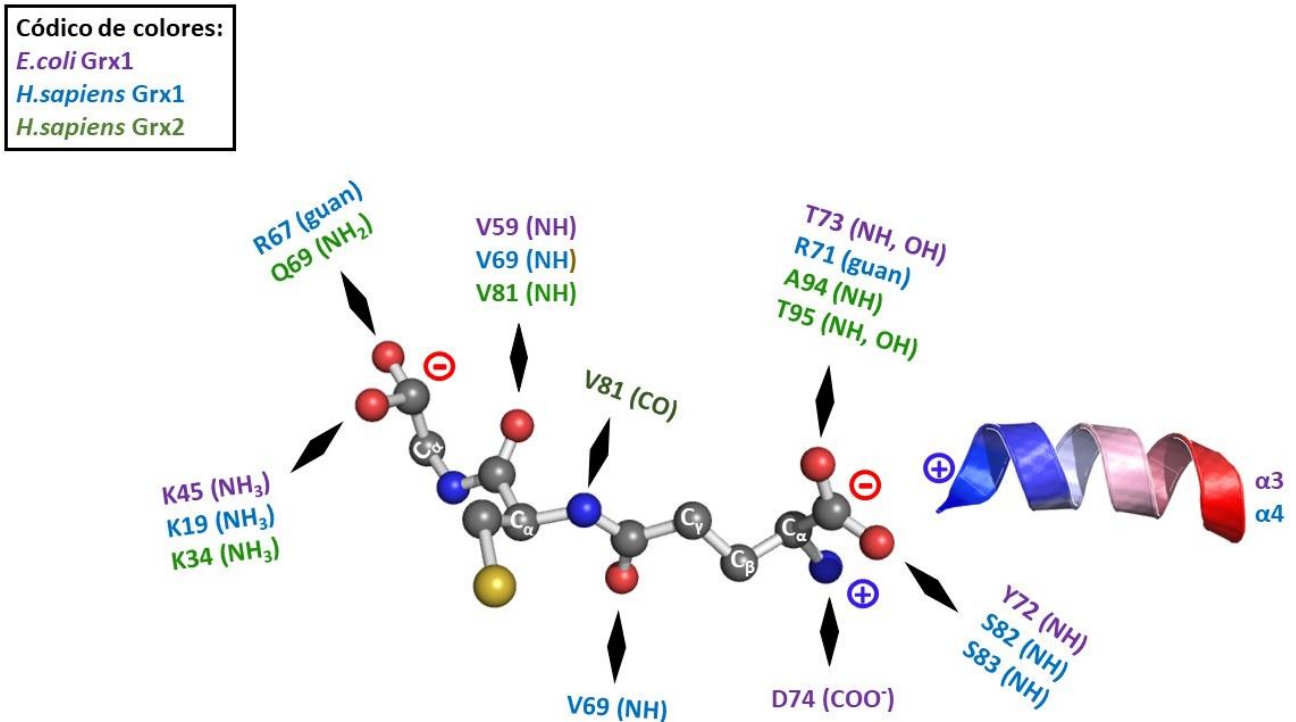


Figura 1.5. Mapa de interacciones conservadas entre Grx y el glutatión. Entre paréntesis se indican los grupos funcionales de los residuos que participan en la interacción. La figura es una adaptación de Gallogly et al., 2009 [31].

Existe una serie de componentes estructurales que diferencian a las Grx de clase I de las de clase II. Entre ellos se destaca una inserción de 5 residuos, que forma un Loop previo al sitio activo, es decir, entre la hoja $\beta 1$ y la hélice $\alpha 1$. Esta estructura, presente en Grx de clase II y ausente en las de clase I, podría llegar a ser uno de los factores que justifiquen, en parte, la diferencia funcional entre proteínas de ambas clases. En la figura 1.6, se muestra esta diferencia para las proteínas de este trabajo.

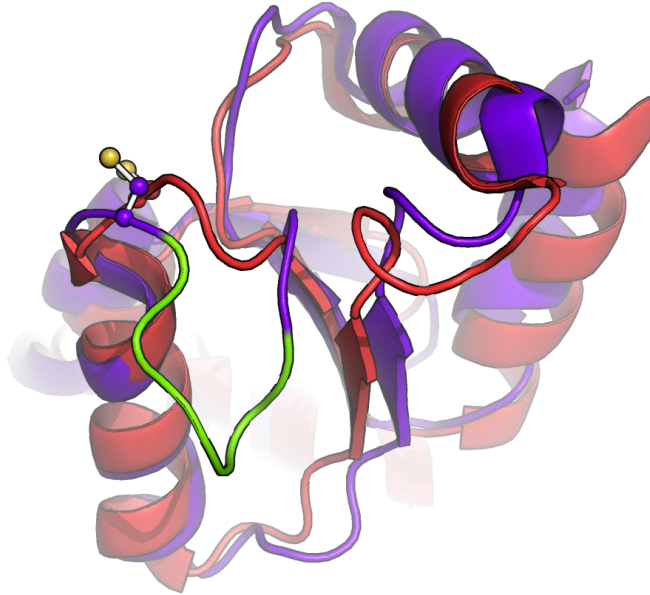


Figura 1.6. Alineamiento de las estructuras de glutaredoxinas 2 y 5 humanas. En violeta se representa la estructura de la *hGrx5* (PDB: 2MMZ) y en rojo la *hGrx2* (PDB: 2CQ9). En verde se indica el Loop de la *hGrx5*, constituido por los residuos PEQPQ. Las cisteínas N-terminales de sitio activo se representan como bolas y palos.

1.2 Intercambio tiol-disulfuro

1.2.1 Aspectos generales

El enlace disulfuro, y su formación, tienen una amplia relevancia en los procesos biológicos. Están involucrados en catálisis enzimáticas, protección contra el daño oxidativo, estabilización de proteínas y regulación de la actividad biológica.

La formación del enlace disulfuro, a través de la reacción de intercambio tiol-disulfuro, es un proceso completamente reversible en el que un grupo tiol en su forma tiolato reactiva, realiza un ataque nucleofílico sobre uno de los dos azufres del enlace disulfuro (ver figura 3), en un mecanismo de sustitución nucleofílica tipo S_N2 . La estabilidad del disulfuro a formar, o romper, depende de una serie de características del medio. Entre ellas, la naturaleza del oxidante o el reductor, es decir, el carácter nucleofílico del tiol atacante, la reactividad del azufre electrófilo y la estabilidad del grupo tiol saliente; y la cinética de las reacciones directa y reversa[33].

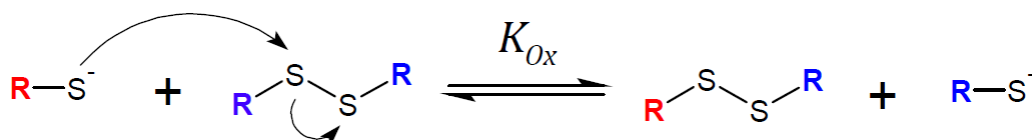


Figura 1.7. Esquema genérico de la reacción de intercambio tiol-disulfuro. Las flechas indican los movimientos electrónicos.

La constante de equilibrio de la reacción, referida como K_{Ox} en la figura 1.7, va a depender de la estabilidad entre los dos disulfuros y los dos tioles (tiolatos) y tiene la forma que se presenta a continuación.

$$K_{Ox} = \frac{[\text{RSSR}][\text{RS}^-]}{[\text{RS}^-][\text{RSSR}]} \quad \text{Ec. 1.1}$$

A nivel biológico, el par redox predominante es el de glutatión y su disulfuro, debido a las altas concentraciones que llega a alcanzar en células eucariotas, de 2 a 10 mM. Es por esto que se le ha adjudicado el carácter de amortiguador redox y se lo ha empleado como estándar, para determinar constantes de equilibrio de oxidación y potenciales redox, de distintos tioles. La constante K_{Ox} , trata de representar la estabilidad termodinámica del disulfuro mixto formado, en comparación con el disulfuro simétrico de glutatión. Cuanto más estable sea el primero en relación al último, mayor será el valor de K_{Ox} [33]. En la ecuación 2, se plantea la constante teniendo en cuenta el par GSH/GSSG.

$$K_{Ox} = \frac{[\text{RSSG}][\text{GS}^-]}{[\text{RS}^-][\text{GSSG}]} \quad \text{Ec. 1.2}$$

No obstante, las suposiciones de equilibrio tomadas anteriormente, no tienen lugar en el contexto biológico. La acción de la enzima glutatión reductasa (GR), que reduce GSSG a expensas de NADPH, disminuye la concentración de GSSG, afectando el equilibrio planteado. Y no solo la acción específica de esta enzima, una enorme cantidad de reacciones redox entre tioles de distinta índole y GSSG, que generan equilibrios alternativos de disulfuros mixtos, eliminan cualquier oportunidad de que se establezca un equilibrio. A su vez, el complejo metabolismo del glutatión, nos lleva a pensar en términos de flujo del último como metabolito, y no como concentraciones acumuladas que pueden ser calculadas a partir de la suposición del equilibrio. Adicionalmente, la distribución del GSH dentro de la célula no es del todo conocida. Existen transportadores con aparente especificidad por el glutatión[23], además de poros que pueden ser atravesados por el mismo[18]. Esto último indica que las concentraciones de GSH pueden variar rápidamente entre compartimentos, dependiendo de los eventos celulares ocurriendo en un determinado momento, lo que dificulta aún más las conclusiones a partir de cálculos de la concentración de las dos especies, expresada como valores de potencial redox.

1.2.2 Deglutationilación

La reacción de deglutationilación, es llevada a cabo generalmente por glutarredoxinas (Grx) de clase I, sobre disulfuros entre residuos de cisteína proteicos y glutatión. El nombre de la reacción, proviene de la acción que tienen las Grx de quitarle el glutatión a las proteínas que se encuentran oxidadas con el mismo. A consecuencia de lo último, al proceso inverso a la deglutationilación se lo llama glutationilación.

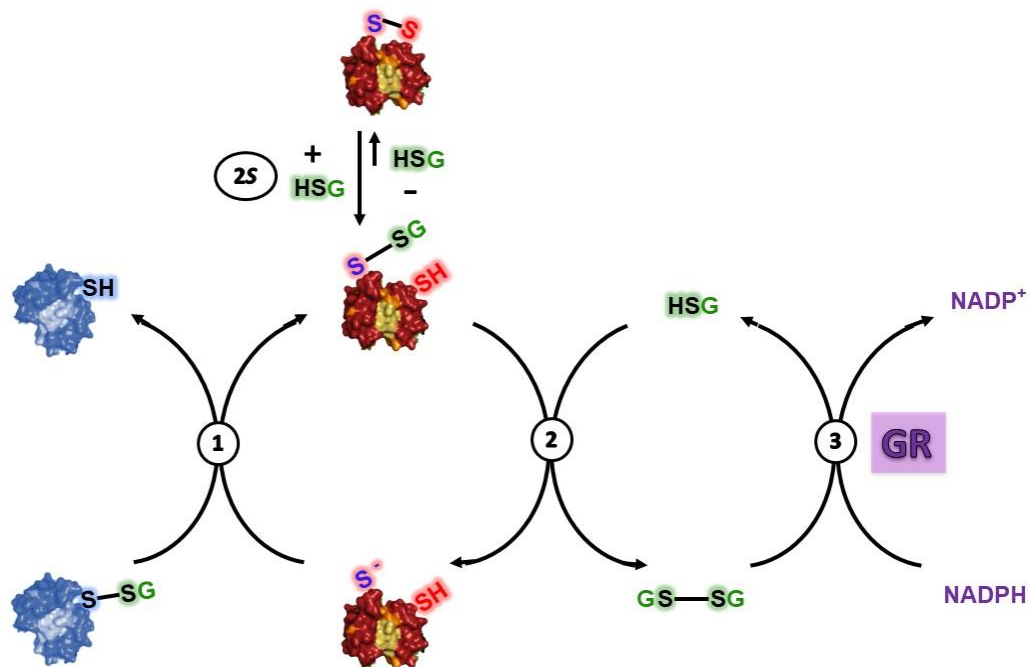


Figura 1.8. Esquema de la reacción de deglutationilación, entre una proteína genérica formando un disulfuro con glutatión (proteína azul) y una glutarredoxina con sitio activo CXXC (proteína roja). Los azufres marcados en azul y rojo, corresponden a los grupos tiol de las cisteínas amino y carboxilo terminal respectivamente. La sigla GR en violeta, representa a la enzima glutatión reductasa. Para la realización del esquema no se tuvo en cuenta la estequiometría del paso 3.

El mecanismo, que se ve en la figura 1.8, consiste en los siguientes 3 pasos principales. En el paso 1, el tiolato de la cisteína aminoterminal de la Grx realiza un ataque nucleofílico sobre el disulfuro entre GSH y el residuo de cisteína de una proteína dada. Los productos de este primer paso son, la proteína reducida y la Grx oxidada, con su cisteína formando un disulfuro con el GSH (Grx-SSG).

A partir de este punto, la catálisis puede seguir directamente al paso 2, o, atravesar antes el paso 2S. En el paso 2S, la cisteína C-terminal de la Grx realiza un ataque nucleofílico sobre el disulfuro Grx-SSG, formándose un disulfuro intramolecular entre las cisteínas N y C-terminal de la Grx (Grx-S₂) y glutatión reducido. No obstante, para poder finalizar el ciclo catalítico la especie Grx-S₂ debe volver a glutationilarse y atravesar el paso 2. En la reacción 2, una molécula de GSH se encarga de reducir el disulfuro Grx-SSG, regenerando a la Grx reducida y formando GSSG. Este último se

reduce a dos moléculas de GSH mediante la enzima glutatión reductasa a expensas del poder reductor del NADPH, en el paso 3.

Al estilo de catálisis que realizan las Grx, se le llama con el nombre de “Ping-Pong”. Esto es debido a los mecanismos correspondientes a los pasos 1 y 2, que son de doble desplazamiento nucleofílico o, intercambio tiol-disulfuro secuencial. Este comportamiento se ve para enzimas que dependen de dos sustratos para llevar a cabo un ciclo catalítico completo (bisustráticas).

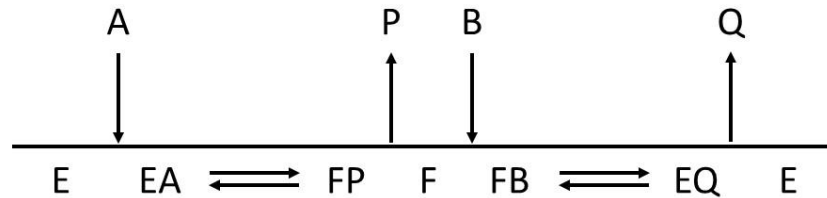


Figura 1.9. Esquemización de la catálisis Ping-Pong. El sustrato A, representaría al disulfuro mixto de glutatión. Luego de la transición EA-FP, se libera la entidad que formaba el disulfuro con el GSH (una proteína, o un tiol de bajo peso molecular) y queda la forma de la enzima glutationilada (Grx-SSG), F. Luego el segundo sustrato, B (GSH), se une a la forma F, siguiendo el paso de regeneración de la enzima, en el que se libera el segundo producto Q (GSSG).

En la mayoría de los casos, las Grx realizan su catálisis sin atravesar el paso 2S, ya que este no representa ninguna ventaja cinética. De todas maneras está reportado, que la Grx de *E.coli*, encargada de reducir a la enzima ribonucleótido reductasa, utiliza un mecanismo que involucra la formación del disulfuro entre cisteínas de sitio activo[34]. Por lo tanto, las glutarredoxinas tendrían diversas maneras de actuar, según el blanco a reducir y las condiciones en las que se encuentren, de modo que no existe un único mecanismo catalítico. Esta versatilidad en cuanto al mecanismo, podría implicar la posibilidad de algún tipo de regulación a nivel del paso 2S. Por ejemplo, la Grx en ciertas condiciones, podría dirigir su catálisis a la formación del disulfuro intramolecular, retrasando la finalización del ciclo.

1.2.3 Ensayos de actividad y titulación de tioles proteicos

Existen diversos ensayos para estudiar la actividad oxidorreductasa dependiente de glutatión de Grx. El más célebre es sin dudas el de la formación de dCDP a partir de CDP, por la enzima ribonucleótido reductasa, dependiente de la reducción por Grx1, a expensas de la GR y NADPH. Este ensayo es especial en el contexto histórico del descubrimiento de Grx, ya que el nombre de las glutarredoxinas como tales, aparece por primera vez en el trabajo de Holmgren en 1976, en el cual se realiza este procedimiento[3].

Otra metodología de determinación de la actividad Grx que ha sido muy usada, es el ensayo HED. El mismo consiste en la reducción del disulfuro mixto GSSEtOH, formado por el β -mercaptoetanol (β -ME) y el glutatión, mediada por Grx, y seguida por el consumo de NADPH por parte de la GR (figura 1.10). El inconveniente de este ensayo, de la manera en que es usado generalmente, es que se desconoce la concentración inicial del sustrato disulfuro previo al inicio de la reacción con Grx, lo que dificulta la reproducibilidad del método.

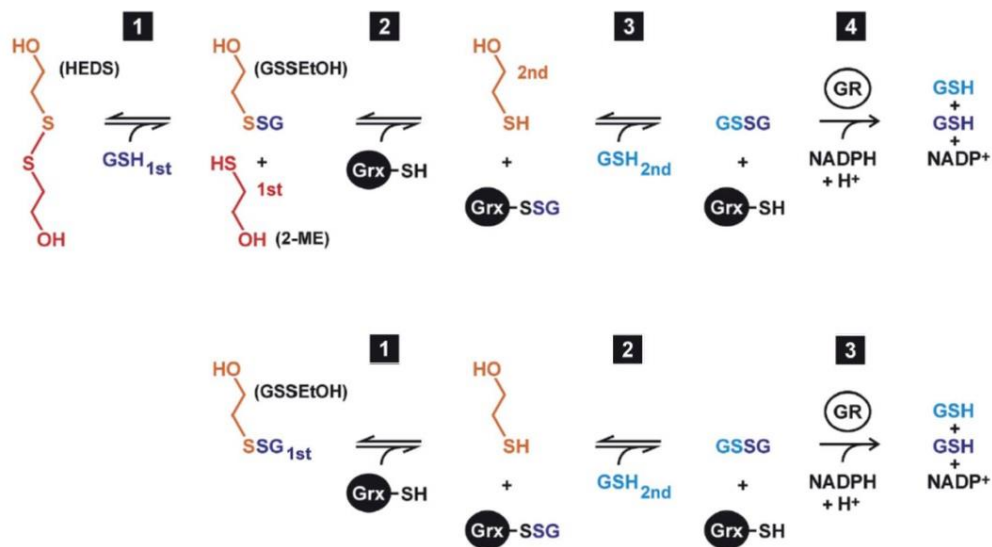


Figura 1.10. Comparación del ensayo HED tradicional con el modificado para este trabajo. Adaptado de Begas et al., 2015[35].

Para este trabajo, procedimos a sintetizar y purificar el GSSEtOH (ver 3.2.1), con el fin de tener una concentración conocida de este reactivo al iniciar el ensayo, de manera de obtener resultados más reproducibles y liberarnos del paso de síntesis no enzimática del sustrato.

Para determinar el valor de pK_a de cisteínas en proteínas, existen diversas metodologías, que se pueden categorizar en espectroscópicas (Absorbancia UV, Fluorescencias, Raman, RMN), químicas (alquilación, determinación de constantes cinéticas), calorimétricas, espectrométricas y potenciométricas[36].

Un ejemplo de un método espectroscópico, es el de la titulación del azufre tiolato por el seguimiento de la absorbancia a 240 nm, aprovechando el hecho de que el tiolato absorbe mucho más que su forma ácida en esa longitud de onda (diferencia entre ϵ_S y ϵ_{SH} de 4000 a 6000 $M^{-1}cm^{-1}$ [37]).

Otro enfoque, consiste en aprovechar la emisión de residuos de triptófano y tirosina, para determinar el pK_a de cisteínas con relativa proximidad espacial a los dos anteriores. Los cambios en la intensidad de fluorescencia de estos aminoácidos en proteínas, se dan principalmente por interacciones específicas (grupos que puedan reaccionar con los estados excitados) o por efectos de exposición al solvente. Es por esto que la fluorescencia de estos residuos sirve como sonda para detectar cambios moleculares conformacionales en proteínas. Para la situación de cisteínas, es de esperar que, si el residuo fluoróforo es relativamente cercano en el espacio, la forma tiolato aniónica pueda llegar a tener un efecto en la emisión, distinto al del tiol. Otra posibilidad, es que la transición tiol/tiolato, altere la conformación local, afectando también la emisión[38]. En este tipo de técnica, se pueden tomar dos parámetros del espectro: intensidad y/o centro de masa, y ver su cambio con respecto al pH. El último parámetro, es la mediana de las longitudes de onda, considerando la intensidad como factor de ponderación (ver *Ec. 3.3*).

Una posibilidad adicional, es determinar el pK_a de cisteínas proteicas, mediante el estudio de la alquilación de las mismas a distintos valores de pH.

El syn-(metil,metil) Bimano, o solo Bimano, es un compuesto químico fluorescente, capaz de emitir a un λ_{em} de 482 nm, si es excitado a un λ_{ex} de 390 nm. Las variantes halogenadas del Bimano, por ejemplo, el monobromobimano (mBBr), no presentan fluorescencia debido a que el elemento halógeno (en este caso el Br) actúa como "Quencher", disminuyendo la capacidad de emitir luz a la determinada longitud de onda. La sustitución nucleofílica del halógeno por otro tipo de nucleófilo, reestablece la fluorescencia del Bimano, disipando el efecto Quencher proveniente del Br.

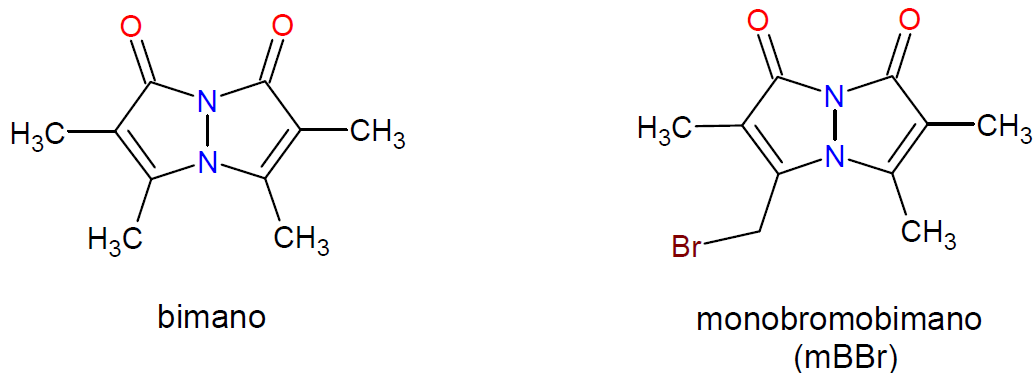


Figura 1.11. Estructura del Bimano y monobromobimano (mBBr).

El mBBr posee una alta especificidad por los nucleófilos de grupos tiol, es decir, tiolatos (RS^-). La presencia de este tipo de nucleófilos en proteínas y tioles de bajo peso molecular, hace que el mBBr sea una buena herramienta para marcar y cuantificar dichas entidades. La reacción entre grupos tiolato y mBBr, consiste en una sustitución nucleofílica del tipo S_N2 , en la que se obtienen como productos, el tiol alquilado con bimano, o sea el producto fluorescente, y el grupo saliente bromuro (ver figura 2).

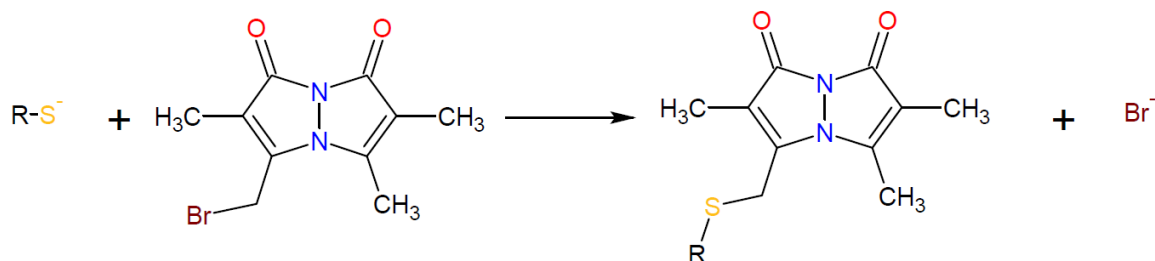


Figura 1.12. Esquema de reacción entre un tiolato genérico y el mBBr. Se visualiza la formación del tioéter con bimano (fluoróforo) y bromuro.

El uso de halobimanos como sondas fluorescentes, fue introducido por primera vez en 1979 a través de un trabajo de Kosower y colaboradores, en el que estudiaron el uso de monobromo, dibromo y monobromotrimetilamonio bimano, para cuantificar y determinar tioles celulares[39]. Desde ese entonces, se han desarrollado métodos que utilizan mBBr para determinar nucleofilia y pK_a de residuos de cisteína proteicos y tioles de bajo peso molecular, otorgándole al mBBr un papel importante en el estudio cinético de la reactividad de tioles.

Existen varias ventajas a la hora de usar el mBBr como sonda cinética. En primer lugar, la sensibilidad que provee su fluorescencia, con la capacidad de determinar concentraciones de producto a nivel nanomolar, y seguir el aumento de fluorescencia en el tiempo a medida que se forma el producto. Otro aspecto a tener en cuenta, es su pequeño tamaño, ya que no impone efectos estéricos que dificulten la reacción. Por otra parte, la ausencia de grupos ácido/base descarta que los efectos del pH puedan afectar sus propiedades espectrales; algo que es de mucha conveniencia, si

se quiere determinar valores de pK_a . Por último, la inespecificidad del mBBr como sustrato de proteínas, permite comparar nucleofilia de cisteínas entre distintas proteínas, ya que no existirían interacciones a nivel de sitio activo, que favorecieran la reacción[40].

1.2.4 Nucleofilia y pK_a en Grx

Las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son del tipo S_N2 , en las que la velocidad es dependiente de la basicidad (pK_a) de los nucleófilos y grupos salientes, y la especie reactiva es el anión tiolato[41]. Por lo tanto, un buen nucleófilo, será aquel que posea un pK_a mayor, y un buen grupo saliente, el que posea un menor valor de pK_a .

La ecuación 1.3, surge de un trabajo de Szajewski y Whitesides del año 1980[42], en el que llevan a cabo un análisis minucioso de datos de velocidad y equilibrio para reacciones de intercambio tiol-disulfuro entre mono, y ditioles, y GSSG. En este trabajo, demuestran que las constantes de velocidad para estas reacciones se correlacionan bien con ecuaciones del estilo de la 1.3.

$$\log k = C + \beta_{nuc}pK_a^{nuc} + \beta_c pK_a^c + \beta_{gs}pK_a^{gs} \quad \text{Ec. 1.3}$$

La ecuación presenta los coeficientes de Brønsted para los azufres nucleófilo, central y grupo saliente, β_{nuc} , β_c y β_{gs} respectivamente. Los valores para los coeficientes fueron determinados en ese mismo trabajo, y se vio que correlacionaban bien con los datos reportados para las constantes de velocidad de intercambio tiol-disulfuro (k) de una gran cantidad de tioles. En la ecuación 1.4, se introducen los valores de los coeficientes β_{nuc} , β_c , β_{gs} y C .

$$\log k = 7,0 + 0,50pK_a^{nuc} - 0,27pK_a^c - 0,73pK_a^{gs} \quad \text{Ec. 1.4}$$

Tanto, la ecuación 1.3, como, la 1.4 describen la existencia de una dependencia entre la k y el pK_a de las especies reactivas, para un grupo heterogéneo de tioles. Para tioles no proteicos, se vio que su k en función del su pK_a marcan una tendencia lineal (ver figura 4.10).

Ahora bien, para tioles proteicos, no existe dicha correlación, y los valores de las constantes quedan fuera de la tendencia. Esto se debe a efectos del entorno proteico en cuanto al tiol, que involucran interacciones a nivel de estructura terciaria entre el último y residuos vecinos. Si, por ejemplo, deseamos calcular el valor de k para la reducción del disulfuro GSS-Cys con la Grx1, podemos tomar los valores de pK_a conocidos para las distintas especies (GSH: 8,7, Cys: 8,73 y Grx1: 3,5) e introducirlos

en la ecuación 1.4. Esto da un valor de k de $1,07 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. No obstante, los valores de k para este paso de reacción, determinados en la literatura, son del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [43].

En el caso de glutarredoxinas, sus residuos de cisteína N terminal de sitio activo particularmente ácidos, representan una situación favorable como grupo saliente en la reacción correspondiente al paso 2 del esquema de la figura 1.8. Se estima que para una reacción de intercambio tiol-disulfuro dada, la constante de segundo orden aumenta por un factor de 3 a 5, a medida que desciende el valor de pK_a una unidad[43]. Esto favorece claramente la velocidad de la reducción del disulfuro mixto Grx-SSG.

La acidez característica de la cisteína N terminal, nucleofílica, de Grx, la hace un mal nucleófilo. Sin embargo, se ha visto que para Grx el primer paso de reacción, dependiente del ataque nucleofílico de la cisteína aminoterminal, es extremadamente rápido y no es el limitante de la reacción de deglutationilación. Experimentos de titulación de la actividad de Grx, han demostrado que el paso limitante de la catálisis es dependiente de la ionización del GSH, al obtener valores de pK_a en el entorno de 8,5, idénticos a los del GSH pero muy distintos a los de Grx (3,5 en adelante) [44-46]. Esto sugiere, que en la primera reacción del mecanismo, existen otros factores que compensan la aparente baja nucleofilia, de la cisteína catalítica. Estos factores tendrían que ver con el acomodamiento de la entidad GSH en el sitio activo de Grx, mediado por las interacciones ya mencionadas (ver 1.1.4).

Uno de los aspectos más interesantes de Grx es su versatilidad en cuanto al uso del GSH como sustrato. Las Grx de clase I, usualmente lo usan para llevar a cabo la deglutationilación de proteínas en los distintos compartimentos celulares; mientras que las de clase II, dependen del GSH para la coordinación de centros Fe-S. Existe una serie de componentes estructurales que diferencian a las Grx de estas dos clases. Entre ellos se destaca una inserción de 5 residuos, que forman un Loop previo al sitio activo, en Grx de clase II (ver 1.1.4). En base a esto, formamos nuestra hipótesis, que consiste en que el Loop presente en Grx de clase II, ausente en las de clase I, impide el uso de GSH como sustrato redox. Para evaluar nuestra hipótesis seleccionamos dos glutarredoxinas humanas de mitocondria, Grx2 y 5, correspondientes a las clases I y II respectivamente, y las sometimos a una serie de ensayos. Estos consistieron en determinaciones de pK_a , cinética bimolecular y cinética enzimática. También realizamos estos ensayos con mutantes de cisteína de ambas Grx, y con una variante de región de la Grx5, que consistió en la sustitución de los residuos del Loop, por residuos de glicina. Logramos determinar valores de pK_a , para todas las proteínas, y constantes de velocidad para el primer paso de la catálisis. Llevamos a cabo un estudio de la cinética de estado estacionario de las Grx que presentaron actividad de deglutationilación, hallando un comportamiento no antes visto para estas enzimas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar los orígenes estructurales de las diferencias que determinan la reducción de disulfuros de glutatión por parte de la cisteína N-terminal de dos glutarredoxinas humanas, Grx2 y Grx5, de clase I y II respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del Loop β 1- α 1 en cuanto a la utilización del glutatión como sustrato redox.
- Alterar este motivo estructural en la Grx5, con el fin de demostrar la posibilidad de intercambiar la función entre Grx de clase I y II.
- Llevar a cabo un estudio de nucleofilia y pK_a de cisteínas en ambas proteínas, para esclarecer aspectos de la actividad de deglutationilación.
- Estudiar la catálisis enzimática de glutarredoxinas para entender sobre la especificidad por los sustratos y la velocidad de reacción.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales de uso general

3.1.1 Proteínas en este trabajo

En esta sección se define el repertorio de proteínas utilizadas a lo largo de la tesis. El mismo consta de dos glutarredoxinas humanas, *hGrx2* y *hGrx5*, junto con sus respectivas variantes. Como se presenta en la tabla 3.1, este repertorio se puede dividir en tres grupos teniendo en cuenta el tipo de variación que presentan las proteínas. El primer grupo es el de las proteínas expresadas en su forma salvaje, o también referidas como “*wild type*” (WT), este grupo está constituido por *hGrx2*WT y *hGrx5*WT con su secuencia canónica, sin la señal de localización mitocondrial. El segundo grupo corresponde a las proteínas que fueron mutadas en residuos de cisteína por serina; dentro de ellas se encuentran: *hGrx2* C40S, *hGrx5* C67S y *hGrx5* C122S. Por último, están las proteínas que son mutantes de región. Dentro de las mismas se definen las mutantes de “Loop” y de poli-glicina (poli-Gly). Con el fin de investigar el posible rol funcional de esta estructura, se expresó la mutante *hGrx5* -Loop + poli-Gly. En la figura 3.1, se pueden visualizar las secuencias aminoacídicas de las proteínas estudiadas.

Tabla 3.1. Características de las proteínas en este trabajo. Con **C**, se indican las cisteínas del sitio activo.

Proteína	<i>hGrx2</i>	<i>hGrx5</i>
Sitio activo	CSYC	CGFS
Cisteínas adicionales	-	C122
UniProt	<u>Q9NS18</u>	Q86SX6
$\epsilon_{280\text{ nm}}$ WT ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) †	7450	11460
Peso Molecular WT (Da) †	12152	13608
Variantes Cys	C40S	C67S
		C122S
Variantes de región	-	-Loop + poli-Gly

† Los valores de absorptividad y peso molecular, fueron calculados teóricamente a partir de la secuencia canónica de las proteínas (excluyendo la señal mitocondrial), en el sitio web de ExPasy, ProtParam.

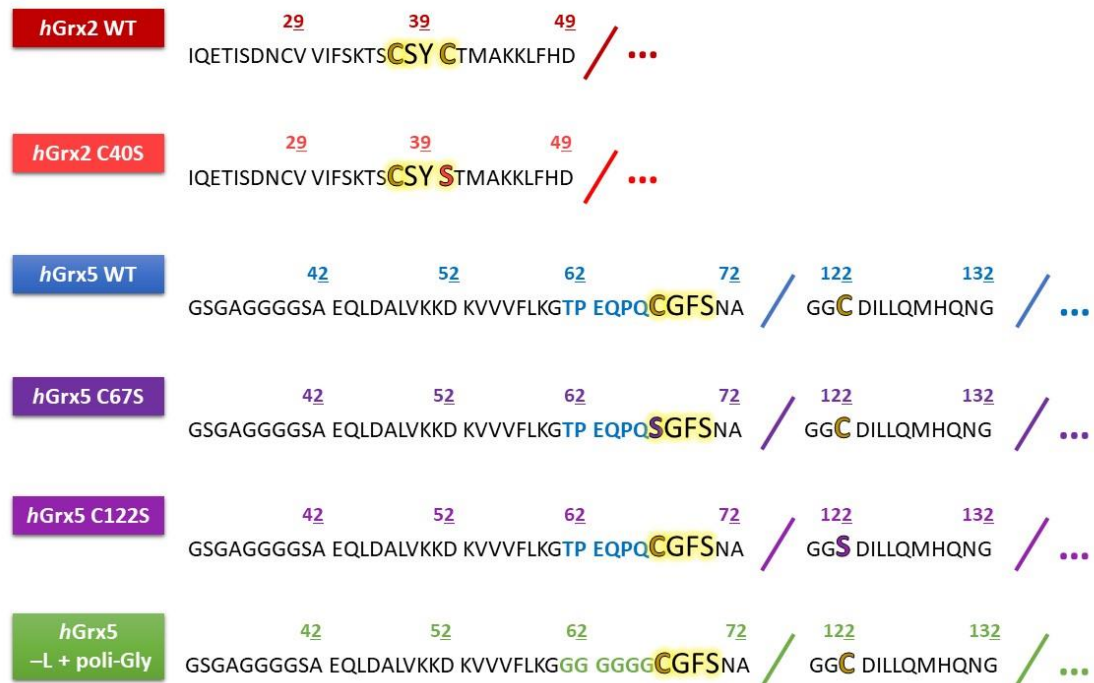


Figura 3.1. Secuencias de las proteínas estudiadas en este trabajo. Los aminoácidos con fondo amarillo y fuente de mayor tamaño, son los del sitio activo. Los residuos de cisteína se encuentran representados en dorado y las mutaciones, ya sean cisteína por serina o variantes de región, aparecen del color de los cuadros con el nombre de la proteína correspondiente a la mutación. Para las *hGrx5*, los residuos del "Loop" se representan en azul.

3.1.2 Soluciones amortiguadoras

Amortiguador TMA1: 30 mM TRIS, 15 mM MES, 15 mM ácido acético 120 mM NaCl, 0,1 mM DTPA, pH 7 (mantiene la fuerza iónica constante en 0,15 M a lo largo del intervalo de pH de 3,6 a 9,1)[47].

Amortiguador A: fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,8.

Amortiguador de lisis: amortiguador A con el agregado de 50 mg de lisozima y media pastilla de inhibidor de proteasa, SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, cada 50 mL de amortiguador.

Amortiguador B: fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 7,8.

Amortiguador P: fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4.

Amortiguador TE: 1 M TRIS, 10 mM EDTA, pH 8. (10X)

Amortiguador TMA 2: 1 mM TRIS, 0,5 mM MES, 0,5 mM ácido acético, 149 mM NaCl, pH 7,1.

Amortiguador borato: 200 mM ácido bórico, pH 8,5.

3.1.3 Medios de cultivo

Medio LB (Luria-Bertani): 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona.

Medio 2XYT: 16 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona.

3.2 Métodos

3.2.1 Procedimientos generales

Estos procedimientos son de carácter preparativo. Son instancias previas, intermedias o finales, de los procedimientos específicos que buscan cumplir los objetivos del trabajo.

Expresión y purificación de proteínas

Las proteínas utilizadas en este trabajo fueron expresadas en células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3), transformadas con dos tipos de vectores. El vector utilizado varió para las distintas versiones de glutarredoxinas. Para las versiones salvajes y mutantes de cisteína por serina, el vector fue pET32a, que les otorga a las células resistencia a la ampicilina. Por otro lado, para las mutantes de Loop y poliGly, el vector usado fue el pET28a, que otorga a las células resistencia ante la kanamicina. En ambos vectores, las proteínas clonadas fueron expresadas con una etiqueta de afinidad de hexahistidina en la región amino terminal, y un sitio de corte para proteasa TEV, entre la etiqueta y la secuencia proteica.

Para este trabajo se expresaron y purificaron la *hGrx5WT* y la *hGrx5-Loop+poliGly*. El resto de las proteínas fueron expresadas y purificadas por Karin Grunberg, integrante de este proyecto[48].

Para la expresión, se parte de crioinóculos de células BL21(D3) de *E. coli*, almacenadas a -80 °C en medio de cultivo con 15% de glicerol. Se comienza con un pre-cultivo realizando un inóculo del crioinóculo de células BL21 transformadas, en 5 mL de medio LB (Luria-Bertani) suplementado de 50 µg/mL de medio de kanamicina, o, 100 µg/mL de medio de ampicilina, dependiendo de si el vector es el pET28-a o el pET32-a respectivamente. El pre-cultivo es incubado a 37°C, con una agitación orbital de 220 RPM, durante toda la noche.

Luego se lleva a cabo el escalado, inoculando los 5 mL de pre-cultivo en dos matraces Erlenmeyer de 2 L que contienen 500 mL de medio 2XYT suplementado con la misma concentración de antibiótico que el pre-cultivo, y fueron incubados a 37°C con agitación a 220 RPM hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de entre 0,8 y 1. Una vez que se llegó al valor de OD_{600nm} deseado, se indujo la expresión de proteína con IPTG 0,2 mM, y se incubó a 20°C, con 220 RPM de agitación, toda la noche.

Subsecuentemente, se cosecharon las células mediante una centrifugación, en dos tubos de 500 mL, a 4000xg, bajo una temperatura de 4°C, durante 15 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se pesó el pellet para poder resuspenderlo en amortiguador de lisis, siguiendo una razón de 4 mL por cada gramo de masa celular obtenida. Lograda la resuspensión del pellet, y al mismo tiempo, el inicio de la lisis celular, se prosiguió con el sonicado en baño de hielo, el cual se programó en 3 ciclos, de 180 segundos alternando 1 segundo *on*/1 segundo *off*. Posteriormente se le agregó al producto del sonicado, 0,01 U/mL de ADNasa, 10 mM de MgCl₂ y 1 mM de fluoruro de fenilmetisulfonilo (PMSF), y se centrifugó durante una hora, a 18000xg y 4 °C. El sobrenadante (lisado) se filtró con filtros de 0,22 µm; mientras que el pellet, que tiene restos de membrana celular entre otros componentes insolubles, se descartó.

Dada la etiqueta de histidina en el extremo N-terminal de estas proteínas, la purificación se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), con columnas HisTrap GE Healthcare de 1 mL. Una vez que se equilibró la columna con 5 volúmenes de amortiguador A, se sembró el lisado a un flujo de 1 mL/min. Luego, otros 5 volúmenes de amortiguador A se hicieron pasar, para recolectar aquellos compuestos que no se unieron a la columna; a esta fracción se la nombró fracción no unida uno (FNU1). Después, se colocó la columna cargada, en un equipo ÄKTA FPLC y se realizó un lavado con 4% de amortiguador B (LAV1).

Posteriormente, se eluyó la proteína en un gradiente de amortiguador B (de 20 a 100% en 10 mL), a un flujo de 0,5 mL/min, colectando fracciones de 4 mL a medida que se seguía por absorbancia a 280 nm, en el cromatograma. Se preservaron las fracciones que correspondieron a un pico de absorbancia (ELU1), y se prosiguió a quitarles la cola de histidina mediante proteólisis con TEVp. Al mismo tiempo, se realizó una diálisis para diluir la alta concentración de imidazol presente en las fracciones que contienen proteína. Esto último se realizó con una membrana de tamaño de poro de 12 kDa, en la cual se introdujo la fracción ELU1, 5 mM DTT, 0,5 mM EDTA y 1 mg de TEVp, y posteriormente se colocó en un recipiente con 1 L de amortiguador P, y se dejó durante toda la noche a 4°C con agitación.

El último paso de purificación consistió en una segunda IMAC (idéntica a la primera), pero esta vez, recolectando la proteína (ahora sin cola de histidina) de la fracción no unida (FNU2). La TEVp unida a la cola de histidinas eluyó con 70% de amortiguador B (ELU2). A la fracción FNU2, que contienen la proteína, se la pasó por una columna PD-10, previamente equilibrada con amortiguador P, para quitarle el exceso de DTT y EDTA. La elución de la proteína se realizó con el mismo amortiguador que se equilibró la columna. Posteriormente se alicuotó la proteína en fracciones de 0,4 mL, y se almacenaron a -20°C.

Para evaluar cualitativamente el proceso de purificación, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, en los cuales se sembraron las fracciones FNU1, LAV1, ELU1 y FNU2, junto a un marcador de peso molecular. Previo al sembrado, las muestras fueron tratadas con SDS, a 90 °C, por 3 minutos.

El contenido proteico de las fracciones fue determinado a partir de espectros de 250 a 350 nm, calculando la concentración a partir del pico de absorbancia a 280 nm y el

coeficiente de extinción de la proteína purificada a esa misma longitud de onda (ver tabla 1).

Previo a ciertos ensayos (estudio de pK_a y cinética bimolecular), las proteínas fueron reducidas con 5 mM de ditioneitol (DTT) en amortiguador, durante media hora a temperatura ambiente, y posteriormente se quitó el exceso de reductor, con el uso de columnas de filtración PD-10 de GE Healthcare.

Cuantificación de tioles libres con DTDPy

La cuantificación de tioles libres para proteínas y soluciones de glutatión (GSH), se realizó mediante la reacción de la 4,4'-ditiopiridina (DTDPy) con tioles libres dando como producto 4-tiopiridona (4-TP), cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente a 324 nm, con un coeficiente de extinción de $21400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [49]. De la figura 3.2, se puede deducir que la concentración de 4-TP será igual a la concentración de tioles libres, ya que las dos especies presentan la misma estequiometría en la reacción.

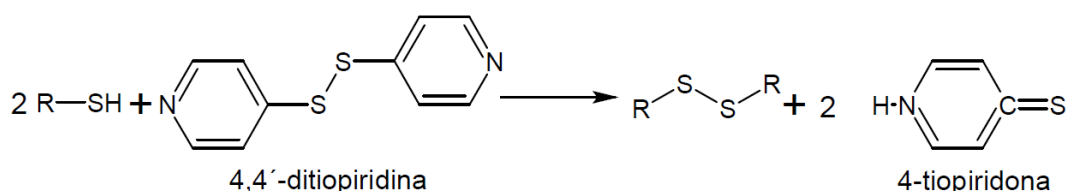


Figura 3.2. Reacción de intercambio tiol-disulfuro entre dos tioles libres y la 4,4'-ditiopiridina (DTDPy).

Para determinar la cantidad de tioles por proteína, se incubaron iguales volúmenes de una solución stock de DTDPy 750 μM , y la solución proteica de concentración conocida, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se realiza un espectro de absorción, contra un blanco de DTDPy, del cual se obtiene el valor de absorbancia a 324 nm y se determina la concentración de 4-TP, que se divide por la concentración de proteína (en la mezcla de incubación), dando dicho cociente el número aproximado de tioles libres por proteína.

En el caso de la verificación de la concentración de las soluciones stock de GSH, se preparan distintas diluciones de las últimas (1/10, 1/100), de manera de que los valores de absorbancia queden comprendidos en un rango de 0,1 a 1, que teniendo en cuenta el coeficiente de absorción de la 4-tiopiridona, corresponden un intervalo de concentración de 5 a 50 μM respectivamente. A continuación, las diluciones se incuban con exceso de DTDPy, también a temperatura ambiente, y durante 5 minutos aproximadamente. Luego, se vuelve a medir absorbancia a 324 nm contra un blanco de DTDPy, y se calcula la concentración de 4-TP.

Síntesis y purificación de GSSEtOH

La síntesis del disulfuro mixto entre glutatión y β -mercaptoetanol (GSSEtOH) fue necesaria para llevar a cabo la adaptación del ensayo HED (hidroxietildisulfuro), que se utiliza para determinar parámetros cinéticos de la reacción de intercambio tiol-disulfuro.

El GSSEtOH es producto de la reacción entre el HED y el GSH (Figura 3.3). En la síntesis se hizo reaccionar 0,6 M de GSH con un exceso de 6 M de HED, en amortiguador TRIS 1,2 M pH 8, ajustando el pH final a 8, con una solución de NaOH 5 M. Se dejó transcurrir la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Dadas las condiciones de reacción, se esperó que dentro de los productos finales de la misma se encuentren: el HED que no reaccionó debido a su exceso inicial, el GSSEtOH y el GSSG, producto de la reacción secundaria entre GSH y GSSEtOH.

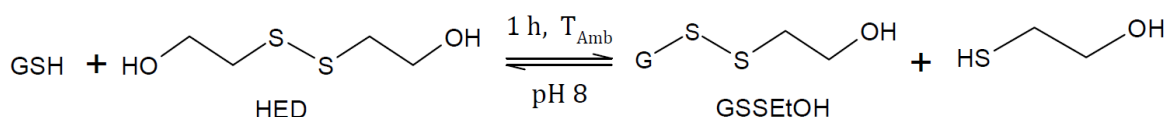


Figura 3.3. Esquema general de la reacción entre el glutatión (GSH) y el hidroxietildisulfuro (HED). En las condiciones de pH establecidas, la especie reactiva (nucleófila) es la base conjugada del grupo tiol del GSH, es decir, el glutatión tiolato (GS⁻).

Para a nuestro producto de interés del resto, se procedió a purificar el disulfuro mixto por intercambio aniónico mediante HPLC, con una columna HiPrep DEAE FF GE Healthcare de 20 mL.

En primer lugar, se introdujo en la columna, previamente equilibrada con amortiguador acetato de amonio 50 mM pH 5 (amortiguador X), la mezcla final de reacción. Al estar en condiciones de pH por arriba del valor teórico del punto isoeléctrico (PI) del GSSEtOH y del GSSG (4 y 3,67 respectivamente), logramos preservar las formas negativamente cargadas de ambos. Luego, a los 10 minutos, se comienza a pasar un gradiente de un amortiguador formiato de amonio 50 mM pH 3 (amortiguador Y), que paulatinamente logra disminuir la retención de las especies en la columna, debido a la repulsión electrostática con la resina, produciendo la progresiva liberación.

Esto ocurre a distintos tiempos (tiempos de retención) para el GSSEtOH y el GSSG, ya que los dos presentan distintos PI y carga. Teniendo en cuenta los dos puntos anteriores, el GSSG sería el compuesto que presente mayor tiempo de retención, ya que posee un PI de 3,67, por lo tanto, es el último en eluir.

Un aspecto técnico a considerar fue la utilización de un divisor de flujo, con el fin de reducir la presión generada dentro de la columna.

Antes de purificar, se corrieron dos soluciones de GSH y GSSG 10 mM, como estándares para tener un indicio del tiempo de retención de los componentes presentes al final de la reacción (ver figura 3.4). La detección de los productos fue llevada a cabo a 220 y 260 nm, longitudes de onda a las cuales absorben los grupos carbonilos y enlaces disulfuro, respectivamente. En la figura 3.4, se puede observar lo discutido anteriormente, sobre los distintos tiempos de retención para el GSSG y el GSSEtOH.

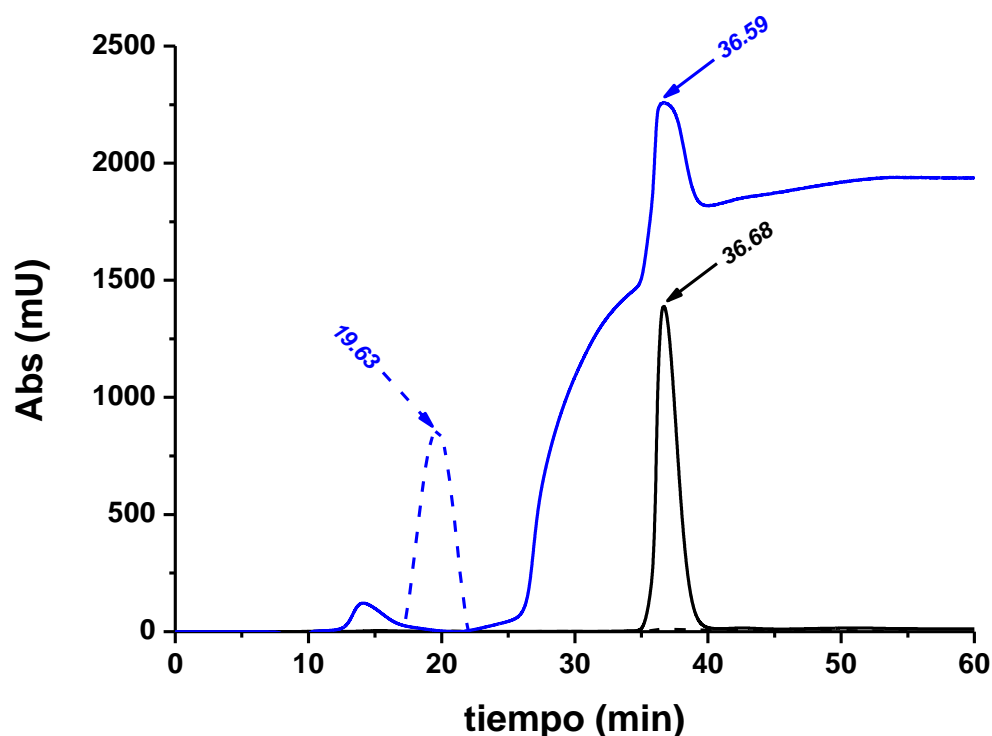


Figura 3.4. Cromatograma de soluciones de GSH y GSSG 10 mM. Las líneas azules y negras representan la absorbancia a 220 y 260 nm respectivamente, mientras que las líneas discontinuas corresponden al GSH, y las continuas al GSSG. Con las flechas se indican los tiempos de retención de los picos a las distintas longitudes de onda.

Para el GSSEtOH, se planteó que el tiempo de retención sería similar al del GSH, dado que la incorporación del mercaptoetanol no agrega ningún grupo ionizable a la molécula. Por esto, se supone que tanto el GSH como el GSSEtOH poseen el mismo PI.

En la figura 3.5, se muestra que el GSSEtOH se pudo detectar, tanto, por absorbancia a 220 nm, como, a 260 nm, porque presenta grupos carbonilo provenientes de la entidad glutatión, y un enlace disulfuro con el mercaptoetanol. El GSSEtOH presentó un pico bien definido a 19,53 minutos, cumpliendo con el planteo discutido anteriormente. También se pudo detectar el HED en el volumen muerto, a 9,89 minutos, ya que no presenta carga y eluye antes del comienzo del gradiente de

amortiguador Y. El GSSG presentó un tiempo de retención de 37 minutos aproximadamente.

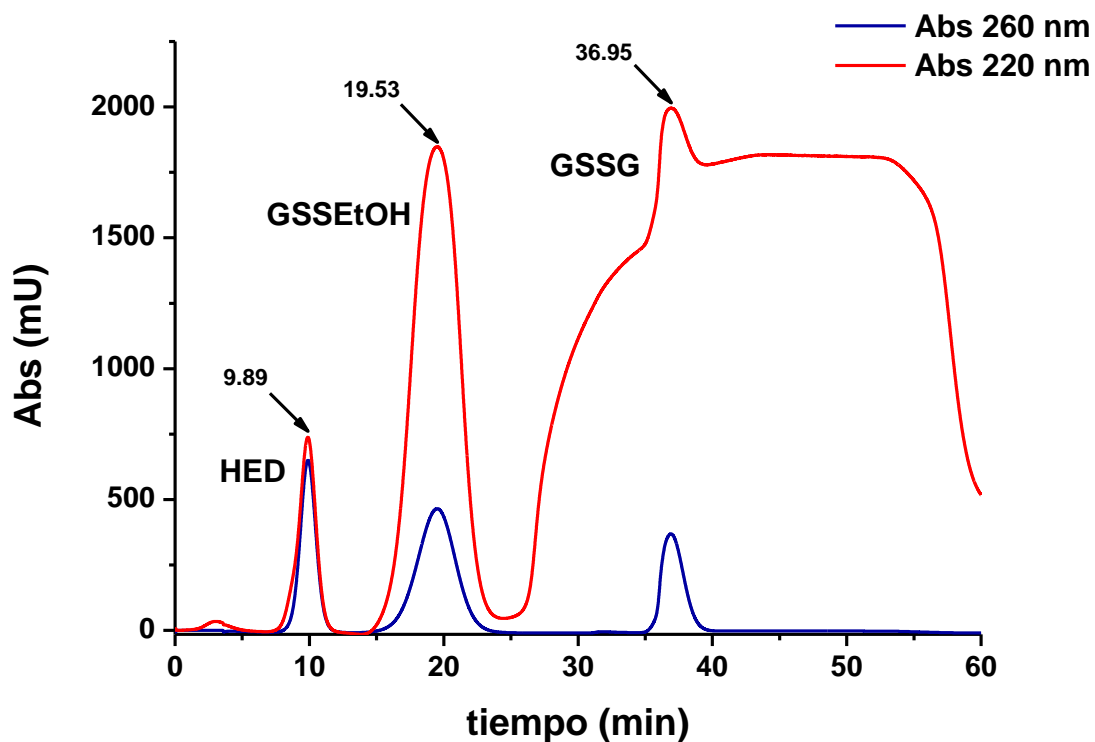


Figura 3.5. Cromatograma de purificación del GSSEtOH, a partir de la mezcla de reacción. Las líneas rojas y azules representan la absorbancia a 220 y 260 nm, respectivamente. Los picos a las distintas longitudes de onda presentaron, aproximadamente, el mismo tiempo de retención.

Por último, se recolectó la fracción del pico correspondiente al GSSEtOH, y se cuantificó por absorbancia del enlace disulfuro a 260 nm ($\epsilon = 270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [50]). Para ello, se realizó un espectro de absorbancia de 200 a 350 nm, y se calculó la concentración a partir del valor del pico a 260 nm.

Síntesis y purificación de FGSSGF

La síntesis de este reactivo fue llevada a cabo, para experimentos de cinética de intercambio tiol disulfuro con sustratos típicos de glutarredoxinas como es el glutatión disulfuro (GSSG). La FGSSGF es producto de la reacción entre GSSG y NHS Fluoresceína (NHS.Flu), que se explicita en el esquema de reacción de la figura 3.6.

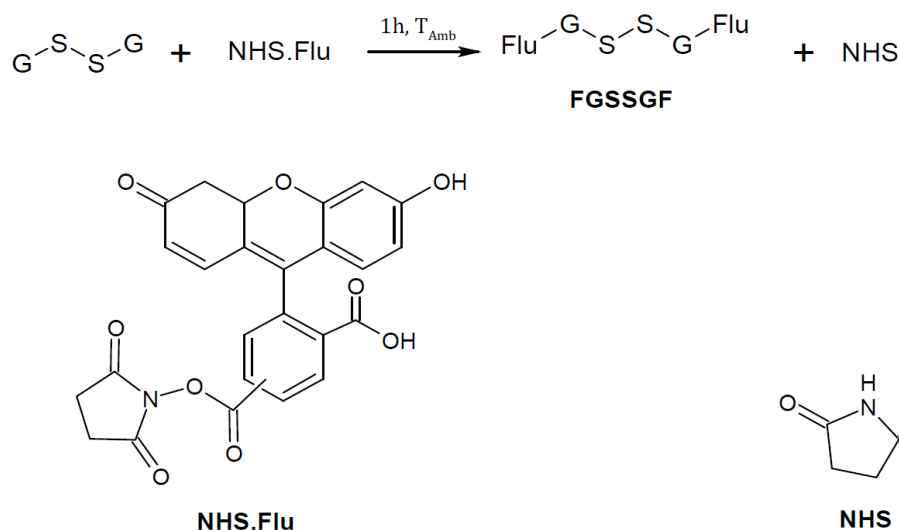


Figura 3.6. Reacción de síntesis de FGSSGF. La estequiometría de la reacción no fue tomada en cuenta para el esquema.

Los grupos amino derivados de los residuos de ácido glutámico, de la molécula de glutatión disulfuro reaccionan con la entidad éster de la NHS Fluoresceína, formando un enlace amida. La NHS, o N-hidroxisuccinimida, tiene propiedades de buen grupo saliente, favoreciendo la reacción a productos.

Para la síntesis, 6 mM de GSSG (preparado en amortiguador borato) reaccionó con 3 mM de NHS Fluoresceína, en amortiguador borato pH 8,5 durante una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Como producto de la reacción se obtuvo una mezcla de las especies que se muestran en el esquema de la figura 3.7, que incluyen a las variantes monomarcadas y bimarcatas de GSSG con Fluoresceína, GSSG sin marcar y derivados de la NHS.Flu que no reaccionaron con el GSSG (Por ejemplo, hidroxifluoresceína). Posteriormente se redujo la mezcla con DTT 20 mM, durante media hora en las mismas condiciones. Este paso fue necesario para deshacer la ambigüedad entre las variantes mono y bimarcatas y generar FGSH, el cual se obtiene puro en el siguiente paso de cromatografía; dejando de lado las especies contaminantes (GSSG, GSH y derivados de la NHS.Flu). Luego se acidificó la mezcla y se la sembró en una columna C18 J.T. Baker de 500 mg, la cual fue previamente activada con 1 mL de acetonitrilo, y equilibrada con dos volúmenes de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Luego de que se sembró la muestra, se realizaron tres lavados de 1 mL con la solución de TFA anteriormente descrita, y se prosiguió a eluir el FGSH con 50% de acetonitrilo. Al FGSH eluido, se lo llevó a un pH alrededor de 8, y se lo dejó oxidar con 5 mM de peróxido de hidrógeno, bajo las mismas condiciones que el primer paso de reacción. Una vez finalizada la

oxidación, se purificó el FGSSGF formado, con el mismo procedimiento empleado para el FGSH.

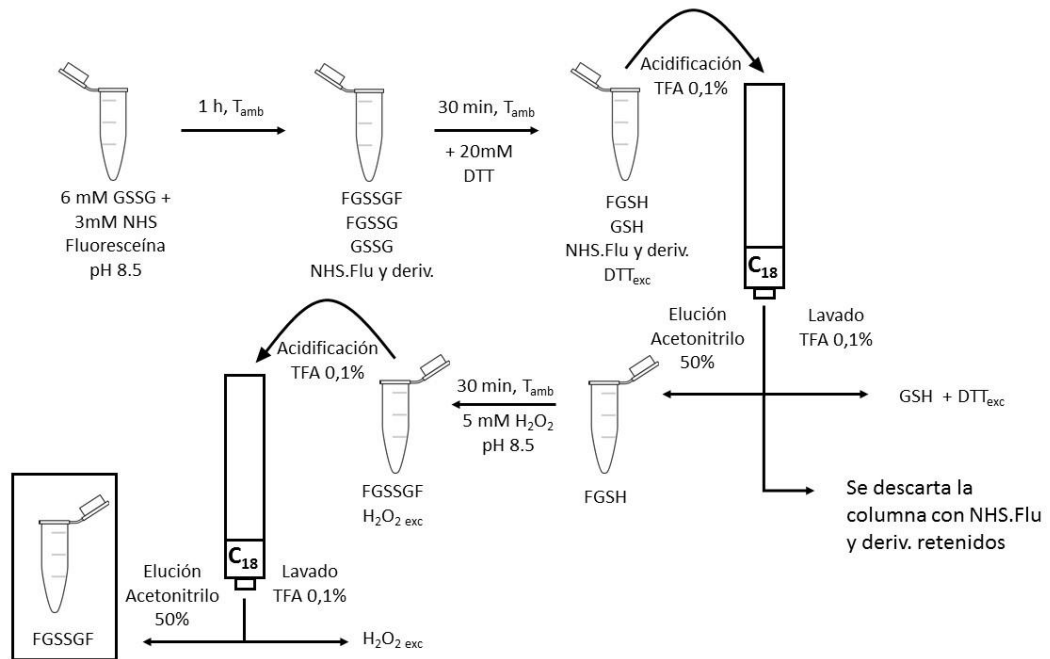


Figura 3.7. Esquema del procedimiento de síntesis y purificación de FGSSGF.

Todos los pasos anteriores fueron monitoreados por HPLC, en una columna de C18, observando la absorbancia a 450 nm. Se obtuvieron picos bien definidos, a tiempos distintos, tanto para el FGSH, como para el FGSSGF (Figura 3.8).

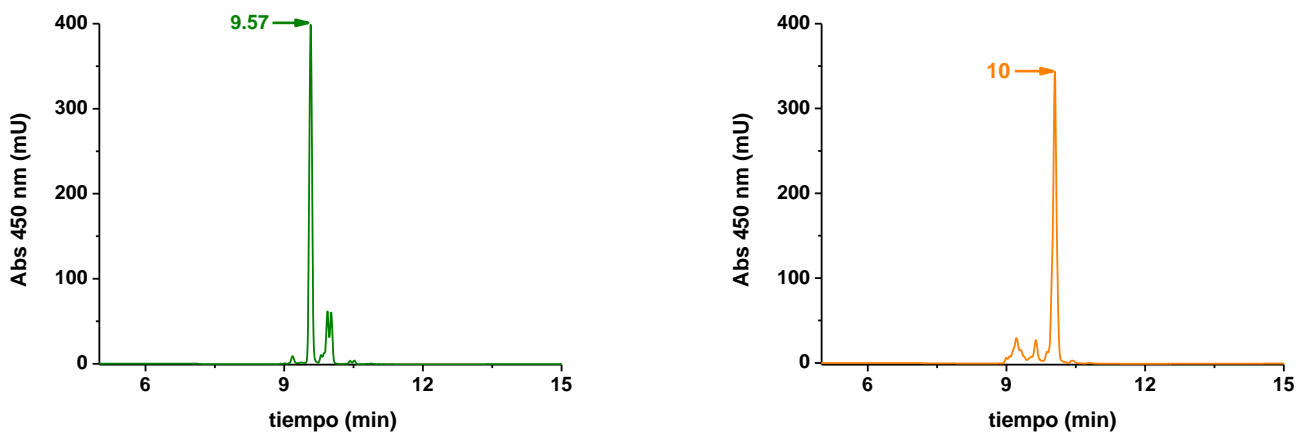


Figura 3.8. A la izquierda, se presenta el cromatograma de FGSH purificado después de la reducción por media hora con DTT; y a la derecha cromatograma de la purificación de FGSSGF, luego de los 45 minutos de reacción entre el FGSH purificado y peróxido de hidrógeno. Estos últimos pasos se encuentran en el esquema de la figura 3.7.

Además, se realizó una prueba para verificar si el pico el producto final (FGSSGF) se transformaba en un pico de FGSH, luego de reducir el primero con DTT en exceso.

En la figura 3.9, se puede ver como el pico de FGSGF (10 min) se convierte en el pico de FGSH (9,57 min), luego de reducir con 50 mM de DTT.

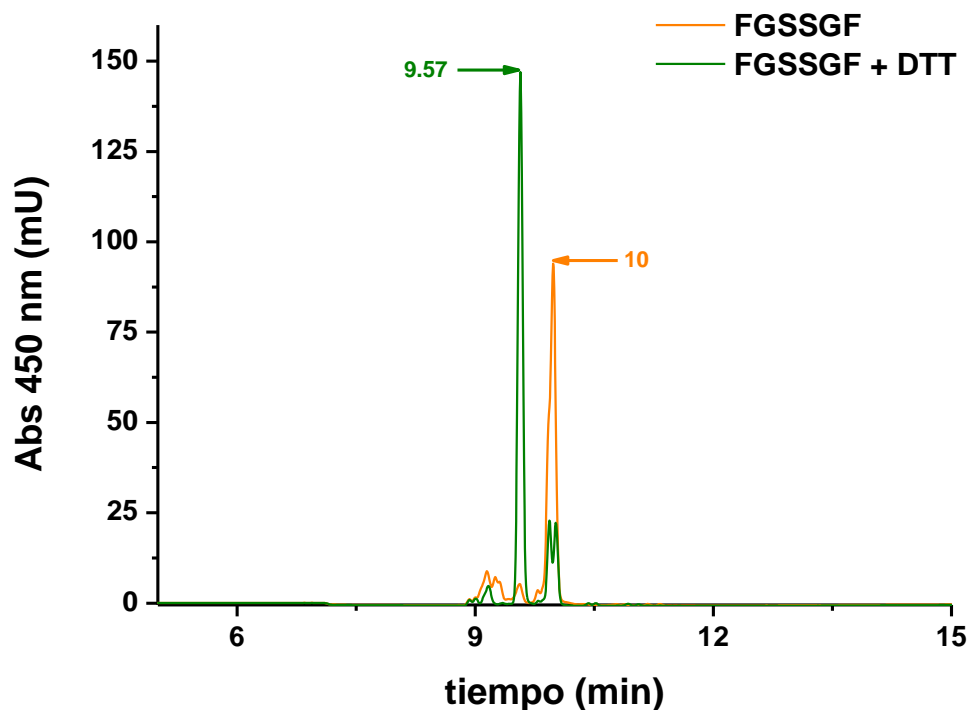


Figura 3.9. Verificación del producto obtenido, a partir de la reducción con DTT.

La determinación de la concentración del producto FGSSGF, se realizó espectrofotométricamente. Dado que el coeficiente de extinción de la fluoresceína a 495 nm es de $73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [51], consideramos que la absorptividad de la molécula de FGSSGF, al presentar dos entidades de fluoresceína, sería el doble; es decir, $140000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Con esta suposición, cuantificamos las muestras obtenidas del último paso de purificación. La cuantificación, consistió en realizar espectros de absorbancia de 450 a 510 nm, calculando la concentración a partir del valor del pico a 495 nm, teniendo en cuenta el coeficiente de absorptividad derivado de la suposición anterior.

3.2.1 Procedimientos específicos

Defino como procedimientos específicos, aquellos ensayos que forman parte del bloque experimental de este trabajo. Los mismos se pueden categorizar en tres grupos: estudio de pK_a , cinética bimolecular y cinética enzimática. Todos fueron realizados a una temperatura de 25°C. A continuación, se describen cada uno de los procedimientos.

3.2.1.1 Estudio de pK_a

El objetivo del siguiente grupo de experimentos fue hallar el valor de pK_a de los residuos de cisteína de sitio activo de las proteínas de este trabajo. Para ello se emplearon tres metodologías distintas, las cuales se basaron en: cambios en la absorbancia de la especie tiolato (RS^-), variaciones de la velocidad de reacción con mBBBr y alteraciones en el espectro de emisión de triptófanos.

Determinación de pK_a por absorbancia a 240 nm

Una de las metodologías que se empleó para determinar valores de pK_a de residuos de cisteína, consistió en registrar los cambios en la absorbancia del tiolato a 240 nm, en función del pH. A nivel práctico, se trabajó con, 10 μ M de proteína en amortiguador TMA 2 suplementado con 50 μ M de DTT, en un volumen de 4 mL. Luego se procedió a acidificar la muestra, mediante adiciones sucesivas de pequeños volúmenes (1 a 5 μ L) de una solución de HCl 0,6 M. Luego de cada adición, se tomó el valor de pH de la solución, y se realizó un espectro de absorción de 350 a 230 nm, en un espectrofotómetro Cary UV-Vis de Agilent Technologies. Este experimento fue realizado por triplicado de manera independiente, con muchos puntos (al menos 10), en un rango de pH entre 7 y 2 unidades.

Se graficaron los valores de absorbancia a 240 nm en función del pH, obteniendo un perfil, al cual lo ajustamos a una sigmoide, a partir de la cual se determinó el valor de pK_a . La ecuación para el ajuste se presenta a continuación.

$$y = A \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} + B \frac{K_a}{[H^+] + K_a} \quad \text{Ec. 3.1}$$

“A” y “B”, representan el valor de absorbancia a 240 nm para la especie ácida (tiol de la cisteína protonado) y básica (tiol de cisteína en su forma tiolato) respectivamente. “ K_a ” es la constante de disociación ácida del tiol del residuo de cisteína.

A su vez, se graficó la diferencia entre la absorbancia a 240 y 280 nm con el fin de restar la contribución de los residuos de tirosina a la absorbancia. A este gráfico, también se le hizo el ajuste representado a través de la ecuación 1; del cual se determinó el valor de pK_a correspondiente.

Velocidad de reacción con mBBr a distintos pH

Para este ensayo se partió de la proteína previamente reducida, preparada en amortiguador TMA 1 2X, y se la hizo reaccionar con mBBr en un rango de pH de aproximadamente 3 a 9. El experimento se realizó por cuadruplicado, en placas de greiner bio-one, negras, de 120 μL y 384 pozos. Las lecturas se hicieron en un lector de placas Varioskan Flash, con $\lambda_{\text{ex}} = 396 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$, registrando la intensidad de fluorescencia de la emisión. Las concentraciones de proteína y mBBr se mantuvieron constantes en todas las reacciones, y fueron de 2 y 8 μM respectivamente. Para establecer el rango de pH se prepararon dos soluciones: una de NaOH 60 mM y otra de HCl 60 mM. El diseño de la placa para el sembrado de las soluciones anteriores queda representado en la tabla siguiente.

Tabla 3.2. Protocolo de sembrado de placa, para velocidad de reacción con mBBr a distintos pH.

Pozo (1-4)	V_{HCl} (μL)	V_{NaOH} (μL)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (μL)
A	40	-	-
B	35	-	5
C	30	-	10
D	25	-	15
E	20	-	20
F	15	-	25
G	10	-	30
H	5	-	35
I	-	-	40
J	-	5	35
K	-	10	30
L	-	15	25
M	-	20	20
N	-	25	15
O	-	30	10
P	-	40	-

A su vez, en cada pocillo se sembraron 50 μL de proteína en amortiguador TMA 1 2X, y 10 μL de mBBr. El último fue inyectado por el equipo.

Los valores de pendiente de intensidad de fluorescencia por segundo (I.F./s) obtenidos de cada fila, se promediaron y se graficaron en función del pH. Al gráfico obtenido se lo ajustó a un modelo sigmoide, análogamente a lo anteriormente realizado, obteniendo un valor de pK_a . Para el caso de aquellas proteínas, que presentaran dos residuos de cisteína y que cuya gráfica mostrara un perfil de doble sigmoide, se realizó un ajuste para dos pK_a , cuya ecuación tiene la siguiente forma:

$$y = \frac{a_1}{\frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2} + 1 + \frac{Ka_1}{[H^+]}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{Ka_1} + 1 + \frac{Ka_2}{[H^+]}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{Ka_2Ka_1} + \frac{[H^+]}{Ka_2} + 1} \quad \text{Ec. 3.2}$$

donde a_1 , a_2 y a_3 , corresponden a los valores de IF/s para los dos residuos protonados, uno protonado y el otro desprotonado, y ambos desprotonados, respectivamente.

Determinación de pK_a por corrimiento del centro de masa espectral

Este ensayo fue realizado, únicamente, para aquellas proteínas que presentaran residuo de triptófano, aprovechando su fluorescencia intrínseca. Dentro de estas proteínas se encuentran la hGrx5WT y sus mutantes. El procedimiento consistió en registrar espectros de emisión de triptófano ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=349$ nm) de 300 a 420 nm en un fluorómetro chronosFD, a medida que se agregó secuencialmente, a la misma muestra, pequeños volúmenes (1 a 5 μL) de una solución de HCl 1,2 M. El cambio espectral observado, y seguido a los distintos valores de pH, fue el corrimiento del centro de masa del espectro de emisión del triptófano. El centro de masa de un espectro se define como,

$$CM = \frac{\sum_i IF_i \lambda_i}{\sum_i IF_i} \quad \text{Ec. 3.3}$$

donde el término en el numerador es la sumatoria del producto de las intensidades de fluorescencia (IF_i) del espectro por su longitud de onda respectiva (λ_i), y el denominador la sumatoria de todas las intensidades de fluorescencia registradas.

La relación del centro de masa con el pH fue determinada por un ajuste sigmoide, a partir del cual se obtuvo el valor de pK_a para la cisteína. Se utilizó la ecuación 1 para el ajuste, pero esta vez, los parámetros A y B indican el valor del centro de masa del espectro para el ácido y la base, respectivamente.

3.2.1.2 Cinética bimolecular

Cinética con mBBr

Defino el carácter de esta cinética como no específico, debido a que el mBBr es un agente alquilante, por el cual ninguna de las glutarredoxinas en este trabajo presenta especificidad.

Para este ensayo se partió de glutarredoxina reducida (ver "Reducción de tioles con DTT") en amortiguador TMA 1 2X a una concentración de 2 μM . Se trabajó bajo condiciones de cinética de pseudo-primer orden, en la cual se mantuvo constante la concentración de proteína, mientras que la concentración de mBBr fue variable (rango de 40 a 200 μM) y en exceso respecto a la primera.

La ventaja de trabajar en condiciones de pseudo-primer orden en cinética bimolecular, es que se puede obtener fácilmente la constante cinética de segundo orden (constante de velocidad para una reacción bimolecular) de la reacción a estudiar, graficando los valores de constantes observadas (k_{OBS}) en función de las distintas concentraciones de reactivo en exceso.

A modo de ejemplo, en nuestro caso la ley de velocidad para la reacción es la que se explicita en la Ec. 4.

$$v = k[hsGrx][mBBr] \quad Ec. 3.4$$

Planteando condiciones de pseudo-primer orden obtenemos la siguiente ley de velocidad:

$$v = k_{OBS}[hsGrx] \quad Ec. 3.5$$

$$k_{OBS} = k[mBBr] \quad Ec. 3.6$$

donde la k_{OBS} representa el término de la Ec. 6. Dicho término, vincula de manera directamente proporcional a la k_{OBS} con la concentración de mBBr, cuyo factor proporcionalidad “ k ” es la constante cinética de segundo orden para la reacción.

El hecho de mantener uno de los dos reactivos en exceso, permite suponer que la concentración del mismo permanecerá constante con respecto a la del reactivo en defecto a lo largo de la reacción, y así hacer válido el planteo de la correlación directa entre la k_{OBS} , de los cursos temporales, y la respectiva concentración de exceso usada.

El experimento fue realizado por cuadruplicado, en placa para fluorescencia greiner bio-one, negra, de 120 μ L y 384 pocillos. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en lector de placas Varioskan Flash, a longitud de onda de excitación y emisión, de 396 y 485 nm, respectivamente. El sembrado del mBBr fue realizado por el equipo, a partir de una solución 400 μ M (para las $hGrx5$), preparada en agua destilada. El diseño de la placa queda explicitado en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Protocolo de sembrado de placa, para cinética bimolecular con mBBr.

Pocillo (1-4)	V_{Grx} (μ L)	V_{H2O} (μ L)	V_{mBBr} (μ L)
A	50	40	10
B		30	20
C		20	30
D		10	40
E	↓	-	50

Los cursos temporales de intensidad de fluorescencia a 485 nm presentaron un perfil exponencial, típico de una reacción de primer orden, a partir de cuyo ajuste (Ec. 7), se pudo obtener el valor de una constante cinética observable (k_{OBS}).

$$y = Amp e^{(-k_{obs}t)} + A_i \quad \text{Ec. 3.7}$$

Al graficar, los valores de k_{OBS} para las distintas concentraciones de mBBr, se obtuvo una recta, cuya pendiente “ k ”, es el valor de la constante de velocidad de segundo orden para la reacción, en unidades $M^{-1}s^{-1}$.

Cinética con FGSSGF

El experimento se llevó a cabo de manera similar al ensayo anterior, en cuanto a la preparación de la proteína. Se estableció una cinética de pseudo-primer orden, en la cual la proteína era el reactivo en exceso y variable (en un rango aproximado de 1 a 15 μM), mientras que el FGSSGF se mantuvo constante (50 o 100 nM). El seguimiento de la reacción de reducción del disulfuro mediado por glutarredoxina, fue a través de la intensidad de fluorescencia emitida a 520 nm por la molécula de fluoresceína. Inicialmente, al estar en la misma molécula, la emisión de la fluoresceína en el FGSSGF se encuentra apagada debido al “auto-quenching”, por lo que la señal se obtiene únicamente luego de que el disulfuro se reduzca, y ambas entidades fluoresceína se separen.

Algunas de las glutarredoxinas de clase I (*hGrx2* WT y *hGrx2* C40S) demostraron ser muy rápidas en el contexto de esta reacción. Debido a esto, se realizó el experimento en un equipo de flujo detenido de Applied Photophysics, en el cual se registra toda la luz con un $\lambda > 320$ nm, excitando a 280 nm. Para este caso se llenó una de las jeringas con una solución 200 nM de FGSSGF preparada en agua destilada, mientras que la otra jeringa se llenó con la proteína a estudiar (*hGrx2* WT o *hGrx2* C40S) previamente reducida, en distintas concentraciones (2-20 μM). Debido a que el equipo inyecta el mismo volumen de cada jeringa a la celda de medición, las concentraciones efectivas de reacción son la mitad de las expresadas. Para cada concentración de proteína, se realizaron 15 medidas, en lapsos de tiempo de 7 y 0,6 segundos, para las menores y mayores concentraciones respectivamente.

Por el contrario, para el caso de las glutarredoxinas de clase II (*hGrx5* WT y variantes) la reacción fue lenta, entonces el ensayo fue llevado a cabo por cuadruplicado, en el lector de placas Varioskan Flash, en una placa greiner bio-one negra, de 120 μL y 384 pocillos. Las lecturas fueron realizadas a longitudes de onda de excitación y emisión de 495 y 520 nm, respectivamente.

Tabla 3.4. Protocolo de sembrado de placa, para cinética bimolecular entre *hGrx5* y FGSSGF.

Pocillo (1-4)	V _{FGSSGF} (μ L)	V _{Grx} (μ L)	V _{TMA1 2X} (μ L)
A	50	5	45
B		10	40
C		15	35
D		20	30
E		25	25
F		30	20
G		35	15
H		40	10
I	↓	50	-

El volumen de FGSSGF fue dispensado por el equipo a partir de una solución 100 nM, preparada en agua. Las concentraciones de proteína dependieron de lo que se obtuvo luego del paso de reducción y purificación por PD 10, que fue, aproximadamente, 30 μ M.

Los cursos temporales de intensidad de fluorescencia se ajustaron a una ecuación exponencial (Ec. 7) de la cual se obtuvieron k_{OBS} , que, graficadas en función de las distintas concentraciones de proteína dieron una recta, cuya pendiente es la constante de orden dos para la reacción, en unidades $M^{-1}s^{-1}$.

3.2.1.3 Cinética enzimática

Ensayo GSSEtOH: medidas de actividad

El ensayo consiste en observar la reducción del disulfuro GSSEtOH mediada por Grx y GSH, a través del descenso en la absorbancia del NADPH a 340 nm, producto del consumo por la enzima glutatión reductasa (GR), que reduce al disulfuro de glutatión formado durante la catálisis. Para el ensayo se preparó en agua: una mezcla (MM) conteniendo amortiguador TE (1X), GR (aprox 1,8 U/mL), GSSEtOH (400 μ M) y NADPH (400 μ M). Aparte, se preparó una solución de GSH 18 mM, y una solución de la proteína de interés, de 1 μ M. Las lecturas de absorbancia a 340 nm en el tiempo, se realizaron por cuadruplicado, con un lector de placas Varioskan Flash, en placas UV transparentes, greiner bio-one, de 120 μ L y 384 pocillos. A continuación, se muestra el protocolo de sembrado de las distintas soluciones en la placa. Vale destacar, que, el GSH fue dispensado por el equipo.

Tabla 3.5. Protocolo de sembrado de placa, para cinética bimolecular entre *hGrx5* y FGSSGF.

Pocillo (1-4)	V _{MM} (μ L)	V _{Grx} (μ L)	V _{H2O} (μ L)	V _{GSH} (μ L)
A	50	-	40	10
B		5	35	
C		10	30	
D		15	25	
E		20	20	
F		25	15	
G		30	10	
H		35	5	
I	↓	40	-	↓

De los cursos temporales obtenidos, se tomó la fase lineal del decaimiento de la absorbancia, a la cual se consideró como la velocidad inicial del curso temporal. La misma presenta unidades de absorbancia en el minuto (Abs/min), y se la convirtió a unidades de concentración por minuto (μ M/min), teniendo en cuenta la relación de Lambert-Beer y el coeficiente de extinción para el NADPH, a la longitud de onda de trabajo. A estos valores los consideramos como la velocidad inicial de reacción, a la correspondiente concentración de enzima " V_i ". Luego se grafican los valores de V_{MAX} contra sus respectivas concentraciones de proteína, obteniendo una recta con la siguiente forma:

$$V_i = a[hsGrx] \text{ Ec. 3.8}$$

donde “a”, es un valor proporcional a la actividad específica y al número de recambio (k_{CAT}). A esta recta se le realizó un ajuste lineal, de cuya pendiente se obtiene el valor de que definimos como “ k_{CAT} aparente”.

Ensayo GSSEtOH: cinética michaeliana

Este ensayo se realizó para las *hGrx2*, ya que resultaron activas en la reacción de deglutationilación. Para el experimento se partió de 9 mezclas maestras (MM) que consistieron en una preparación acuosa de amortiguador TE 1X, 0,2 mM NADPH, 1,8 U/mL de glutatión reductasa de levadura (GR) y GSSEtOH. El último, varió entre las distintas mezclas, en concentraciones de 37, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 600, y, 800 μ M. Aparte, se prepararon soluciones acuosas de GSH de 1,9 y 3,8 mM, además de una solución de *hGrx2WT* 1,6 μ M. Cabe destacar, que todas las soluciones fueron preparadas frescas, al momento de realizar el experimento.

Para cada mezcla se siguió la reducción de GSSEtOH de la misma manera que en el ensayo de actividad enzimática, en placas transparentes, de 384 pozos de 120 μ L, de greiner bio-one; en un lector de placas Varioskan Flash. El diseño de las placas fue para todas las mezclas el mismo, y se presenta a continuación:

Tabla 3.6. Protocolo de sembrado de placa, para cinética michaeliana de *hGrx2*.

Pocillo (1-4)	V_{MM} (μ L)	V_{hGrx2} (μ L)	V_{H_2O} (μ L)	V_{GSH} (μ L)
A	40	10	50	-
B			45	5
C			42	8
D			35	15
E			30	20
F			25	25
G			20	30
H			15	35
I			10	40
J			5	45
K	↓	↓	-	50

EL GSH fue inyectado por el equipo. La solución 1,9 mM, fue usada para las primeras y últimas tres concentraciones de GSSEtOH, mientras que la de 3,8 mM, para las demás. Para cada una de las placas, se obtuvo el valor de velocidad inicial, para las distintas concentraciones de GSH. Los rangos de concentración de GSH fueron de 0 a 0,95 mM y de 0 a 1,9 mM, para las soluciones de 1,9 y 3,8 mM respectivamente.

El análisis de datos a partir de los cursos temporales para las distintas concentraciones de glutatión, se realizó de la misma forma que para el ensayo de actividad enzimática. Una vez obtenidos los valores de velocidad inicial, se

promediaron, y graficaron en función de la concentración de GSH, obteniendo un perfil de hipérbola rectangular, característico de una cinética de estado estacionario. Este análisis se realizó para cada una de las concentraciones fijas de GSSEtOH, con el uso de la ecuación.

Luego, los valores aparentes de V_{Max} y K_M , obtenidos de los ajustes de las hipérbolas, se grafican en función de sus respectivas concentraciones de GSSEtOH. A partir de estos últimos gráficos, se obtienen parámetros que demarcan el comportamiento de la enzima en la catálisis.

4. Resultados y Discusión

4.1 Estudio de pK_a

4.1.1 Titulación de *hGrx5* y variantes, a partir del cambio en el centro de masa del espectro de emisión del triptófano

Como se ha mencionado anteriormente (ver 1.2.3), es posible titular residuos de cisteína de proteínas, a partir del cambio en la emisión de fluorescencia de triptófanos. En nuestro trabajo contamos con 4 proteínas que presentan triptófano en su estructura, ellas son la *hGrx5* WT y sus variantes.

Para corroborar la existencia de un cambio observable en la emisión del triptófano, realizamos espectros de emisión de fluorescencia para la *hGrx5* WT y sus variantes, a distintos valores de pH. Los espectros mostraron cambiar su intensidad y posición del máximo, de la manera que se muestra en el lado izquierdo de la figura 4.1. Pudimos observar, que el máximo espectral se desplaza levemente hacia la izquierda, y que la intensidad disminuye considerablemente a medida que disminuye el pH.

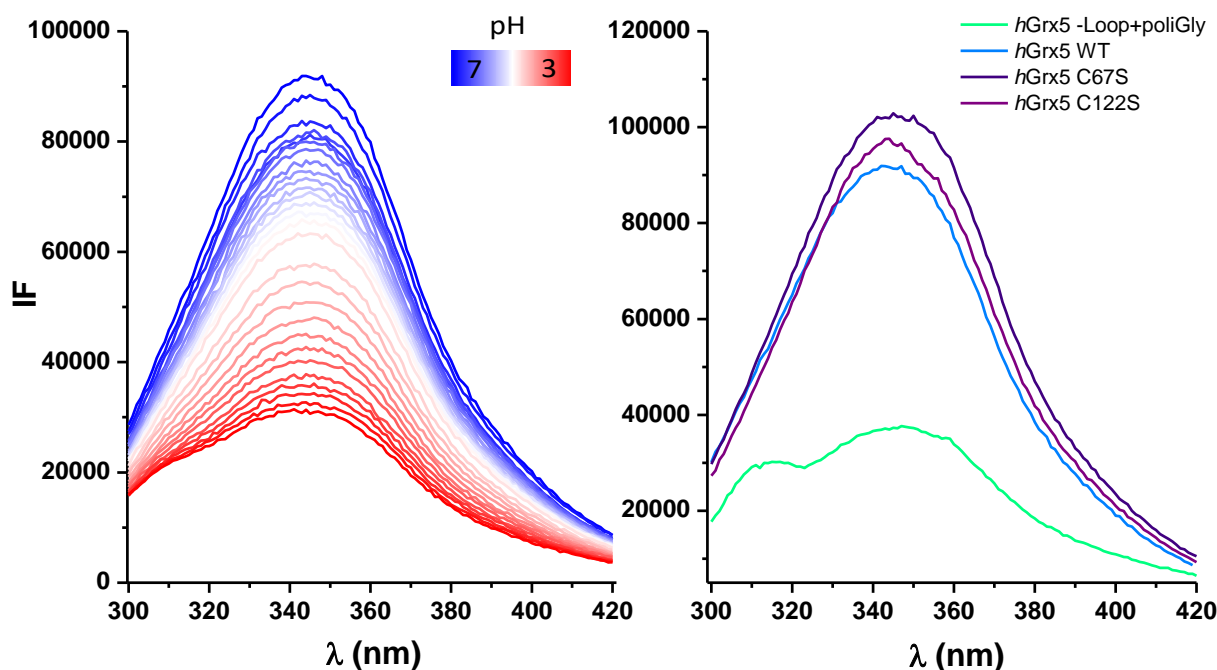


Figura 4.1 Espectros de emisión de fluorescencia de triptófano a distintos pH (λ_{ex} 280 nm). A la izquierda se muestran los espectros de emisión de la *hGrx5* WT, en un rango de pH de 7 a 3; y a la derecha, espectros de emisión de la *hGrx5* WT y variantes a pH 7.

Adentrándonos en el microambiente de la cisteína, o cisteínas, a titular, podríamos decir que, a valores de pH más alcalinos, en los que el grupo tiol de la cisteína se encuentra mayoritariamente en su forma tiolato ($Cys-S^-$), los espectros se ven con un máximo relativamente intenso a 350 nm. A medida que el pH desciende, empieza a disminuir la forma tiolato y aumentar la forma tiol, influyendo la protonación de la cisteína, en la intensidad y el centro de masa del espectro. Siempre observamos que el cambio en la intensidad de fluorescencia fue mayor, en relación al cambio en el centro de masa del espectro.

Viendo que la intensidad y posición de los máximos espectrales dependen del pH, construimos perfiles de centro de masa del espectro en función del último.

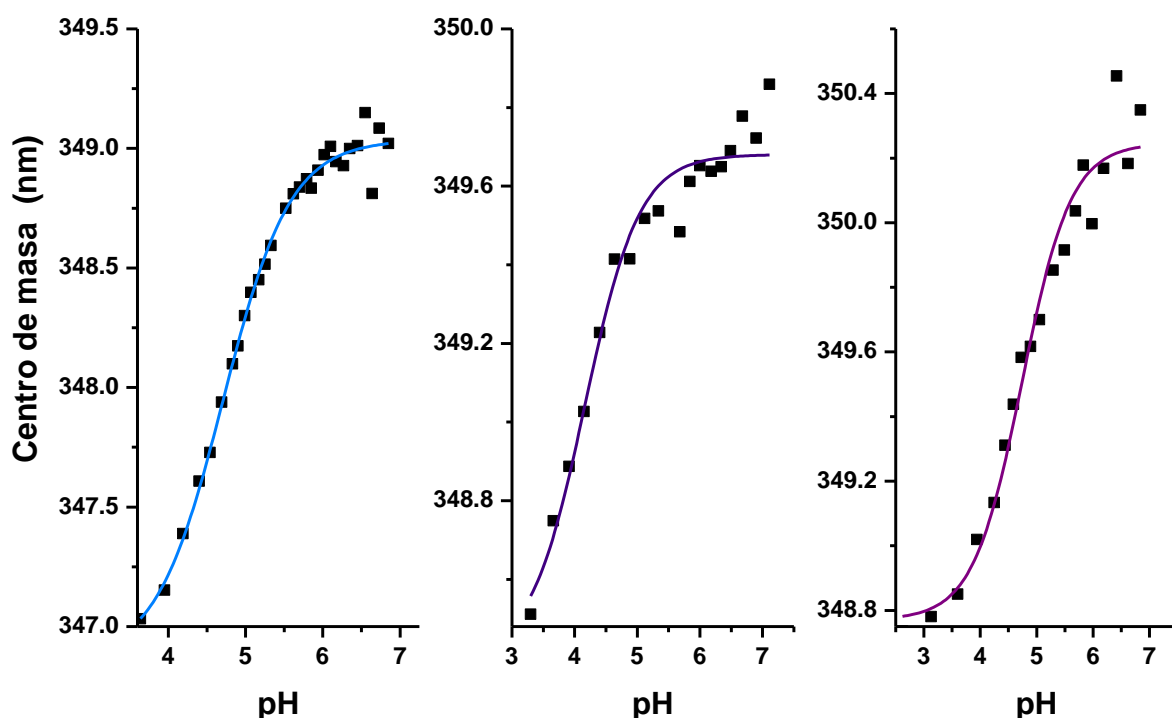


Figura 4.2. Gráfico de centro de masa del espectro en función del pH para *hGrx5* WT y variantes. De izquierda a derecha, *hGrx5* WT, C67S y C122S. Las flechas indican la posición y el valor de pK_a .

A los perfiles obtenidos se les hizo un ajuste sigmoide mediante el uso de la ecuación 3.1, del cual se obtuvieron los valores de pK_a para las tres glutarredoxinas (tabla 4.1). Para el caso de la variante de región (*hGrx5* -Loop+poli-Gly) no se obtuvo el perfil sigmoide que presentaron el resto de las proteínas en este ensayo, posiblemente por cambios importantes en la conformación de la proteína debido a las mutaciones realizadas.

Tabla 4.1 Resultados de pK_a para las glutarredoxinas estudiadas en este ensayo. La sigla "n.d." se utilizó para los valores que no se pudieron determinar.

Proteína	pK_a
<i>hGrx5</i> WT	$4,71 \pm 0,03$
<i>hGrx5</i> C67S	$4,20 \pm 0,10$
<i>hGrx5</i> C122S	$4,74 \pm 0,07$
<i>hGrx5</i> -Loop + poliGly	n.d.

La similitud entre los valores de pK_a de estas proteínas, estaría aportando información desde el punto de vista estructural. Se podría decir que la particular acidez de estas cisteínas es una consecuencia del arreglo tridimensional, es decir,

del plegamiento. A su vez, el valor de pK_a de la mutante C67S, en la cual la única cisteína es la C122, sugiere, que, en la *hGrx5*, ambas cisteínas son ácidas.

En la figura 4.1, a la derecha, se comparan los espectros de triptófano de las *hGrx5* a pH 7. Se puede observar que para la proteína nativa y las mutantes de cisteína, los espectros son similares, concluyendo que el residuo de triptófano se encuentra en un entorno similar en las tres proteínas. La mutante de región, presenta un espectro de emisión particularmente débil, que, si observamos la figura 4.1, a la izquierda, se asemeja al comportamiento esperado a valores de pH ácidos. Esto puede querer decir que el valor de pK_a de esta cisteína se encuentra por arriba de 7, similar a los tioles de bajo peso molecular. En base a esto, proponemos que la estructura alterada de la mutante de región, puede llegar a exponer ambas cisteínas N y C-terminal, al solvente.

Sin embargo, la exposición al solvente no es el único argumento que justifica un valor alto de pK_a . Existen residuos que se han propuesto como determinantes del bajo pK_a de cisteínas de Grx, e incluso, los momentos dipolares de algunas hélices α , han sido propuestos como la causa de la acidez[36]. Es por esto que, en una proteína tan pequeña, cuya estructura sustenta la propiedad ácida de las cisteínas, cualquier alteración a nivel de plegamiento lleve a un cambio en dicha propiedad. Cambios en la posición de residuos y estructuras, que estabilicen al tiolato, o que formen enlaces de hidrógeno con el tiolato, definitivamente van a disminuir el valor de pK_a .

El hecho de observar los cambios de protonación del grupo tiol de residuos de cisteína a través de la señal emitida por un residuo de triptófano “vecino”, hace a esta metodología indirecta. Además, es discutible que el origen del cambio en la emisión del triptófano se deba únicamente a un residuo vecino. El cambio de pH podría afectar a otros residuos cercanos, inclusive a la estructura de la proteína en general; lo que también alteraría la emisión. Esto evidencia que la etiología del cambio espectral contiene muchos componentes, por lo que reportamos estos valores de pK_a como aproximaciones, que más adelante se complementarán con metodologías más directas.

4.1.2 Titulación de *hGrx2* WT, a partir del cambio en la absorbancia del tiolato a 240 nm

Debido a la ausencia de residuos de triptófano en las *hGrx2*, fue imposible titular estas enzimas por el método descrito anteriormente. En esta metodología obtuvimos de manera más directa el pK_a de los residuos de cisteína de sitio activo, gracias a la propiedad de la entidad tiolato (RS^-) de absorber a una longitud de onda de 240 nm. Lo que hace posible seguir por absorbancia la protonación de la especie tiolato, observando un decaimiento en la absorbancia a medida que se acidifica la muestra.

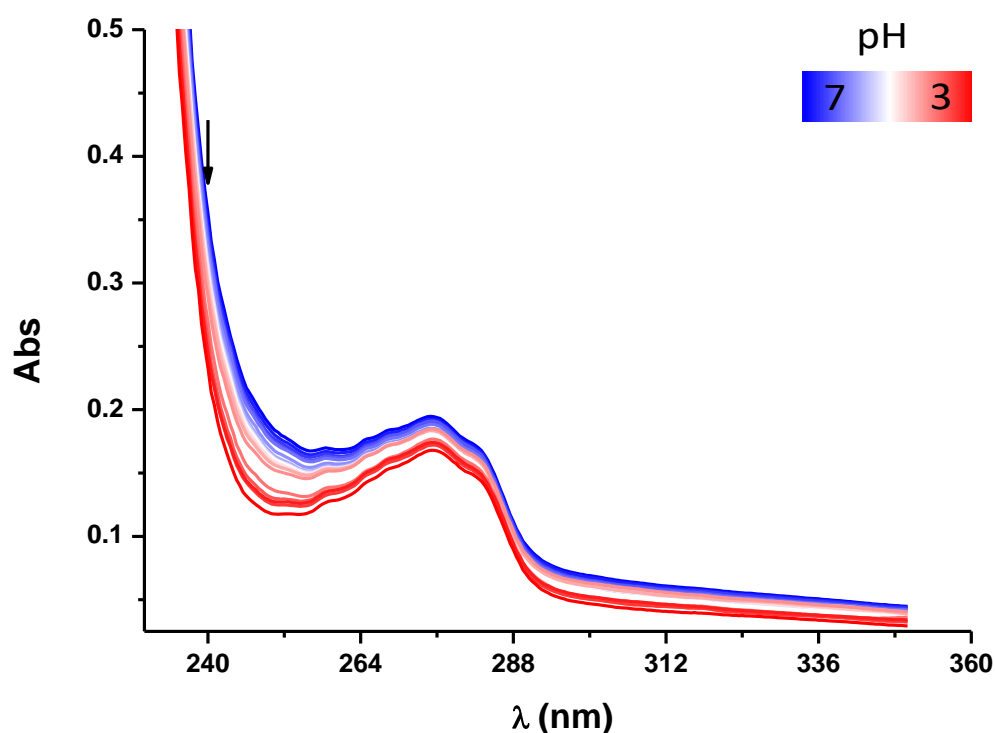


Figura 4.3. Espectros de absorción de *hGrx2* WT, de 230 a 350 nm, a distintos valores pH. La flecha negra indica el descenso en la absorbancia a 240 nm.

En la figura 6 se puede ver el efecto del pH en el espectro de absorción de la *hGrx2* WT de 230 a 350 nm. El cambio más importante se sitúa a la longitud de onda de 240 nm, correspondiente a la absorción del tiolato. Podemos notar un descenso en la absorbancia conforme baja el pH. Como se muestra en la figura 4.4, graficamos los valores de absorbancia a dicha longitud de onda en función del pH, obteniendo un perfil, del cual determinamos el valor de pK_a a partir de un ajuste sigmoide.

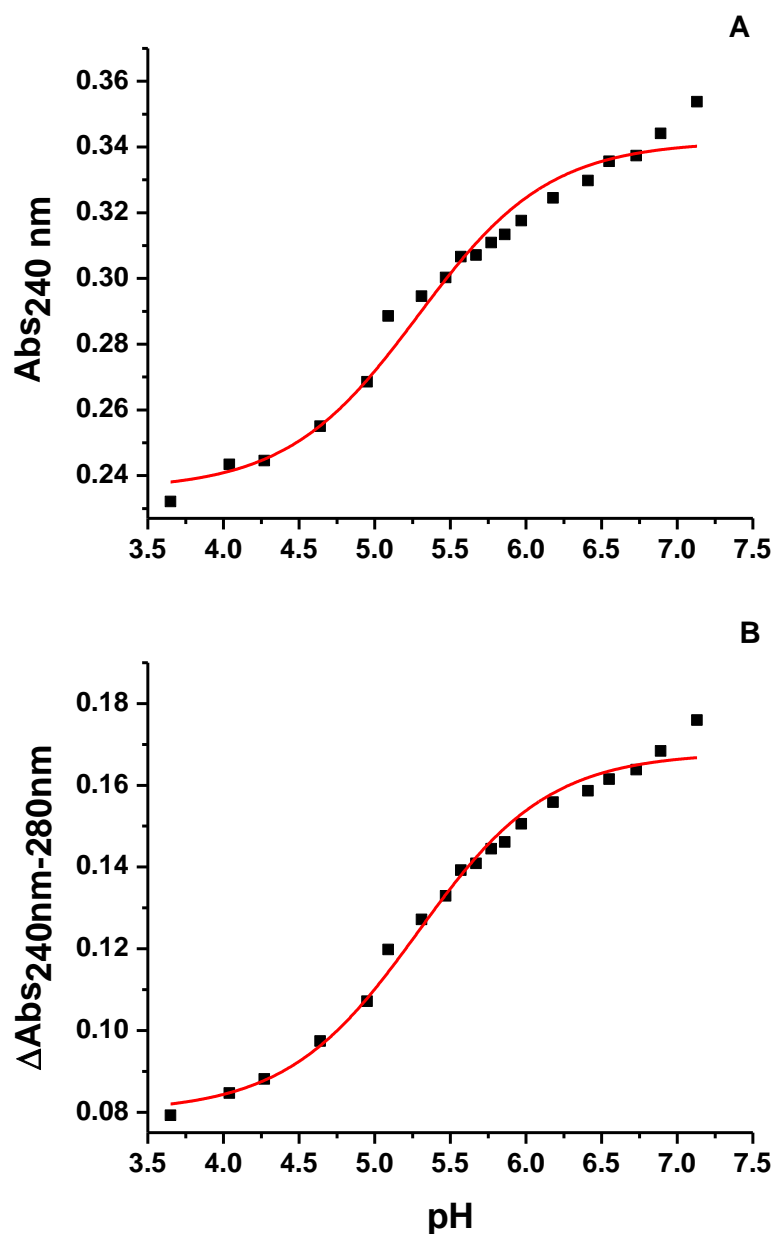


Figura 4.4. (A) Gráfico de absorbancia a 240 nm y (B) gráfico de delta absorbancia 240nm-280nm, en función del pH para la *hGrx2* WT.

Adicionalmente, decidimos restarles a los valores de absorbancia a 240 nm, la contribución de la absorbancia a 280 nm proveniente de los residuos de tirosina proteicos. Es por esto que realizamos un gráfico del delta absorbancia 240nm-280nm, considerando, que sucede con el valor de pK_a . Por lo que se puede ver en la figura 8, el perfil sigmoide se conserva, y el valor de pK_a es el mismo que para el gráfico anterior.

En la siguiente tabla se reportan los valores de pK_a obtenidos a partir de los gráficos de la figura 4.4. Los valores son resultado de un promedio de tres experimentos independientes, realizados bajo las mismas condiciones.

Tabla 4.2 Resultados de pK_a para la *hGrx2* WT.

Gráfico	pK_a
<i>hGrx2</i> WT Abs_{240nm}	5,32 ± 0,08
<i>hGrx2</i> WT ΔAbs_{240nm-280nm}	5,27 ± 0,06

Es importante señalar, que se observó un perfil sigmoide típico de un ácido monoprótico. No obstante, la *hGrx2* tiene dos residuos de cisteína de sitio activo, por lo que se hubiera esperado una curva de pK_a similar a la de un ácido diprótico. Una posibilidad, es que no hayamos alcanzado a ver el pK_a del segundo residuo de cisteína en el rango de pH que estudiamos (7 a 3 aproximadamente). Quizás a valores de pH más alcalinos se hubiera encontrado la segunda meseta, característica de la curva de pK_a de un ácido diprótico. También pudo pasar que ambas cisteínas tengan un valor de pK_a muy similar, que escapó a la sensibilidad de la técnica.

4.1.3 Titulación de glutarredoxinas mediante reactividad con mBBr

En esta oportunidad, decidimos evaluar el efecto del pH en la velocidad de reacción de las glutarredoxinas de este trabajo, con el mBBr; un reactivo alquilante inespecífico, con el cual un grupo tiol puede reaccionar (ver 1.2.3).

La figura 9 evidencia la existencia del cambio de la pendiente inicial en función del pH; tomando como ejemplo a la *hGrx5* WT.

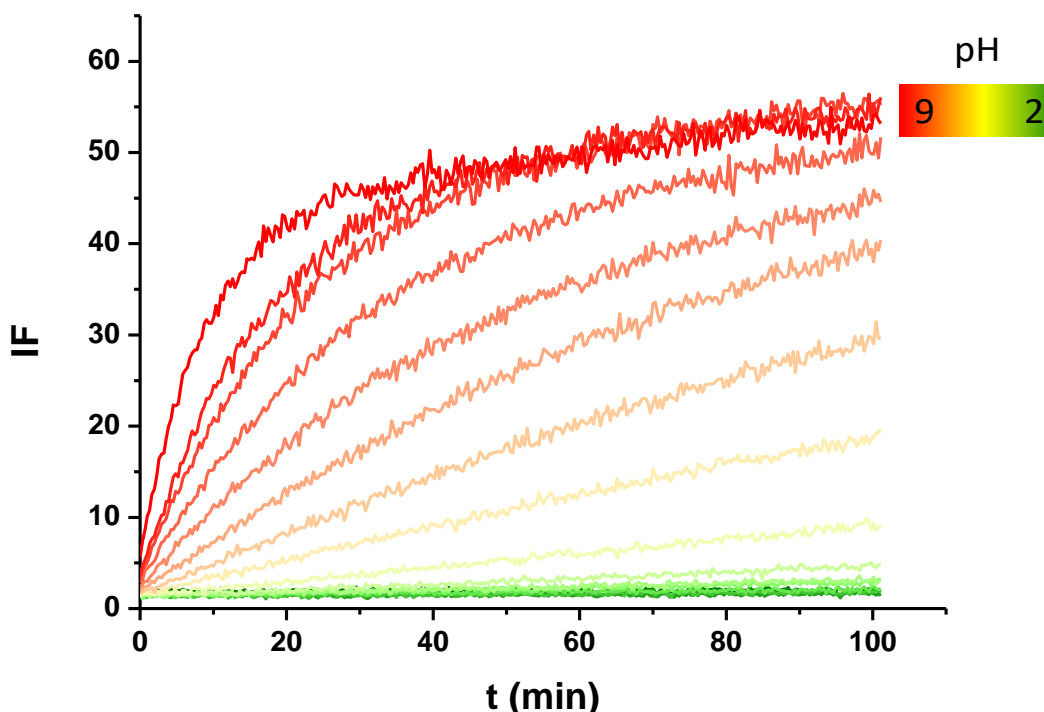


Figura 4.5. Cursos temporales de reacción entre *hGrx5* WT (1 μ M) y mBBr (8 μ M), en un rango de pH de 9 a 2 aproximadamente.

El hecho de observar los cambios en la reactividad del grupo tiolato, a medida que este es protonado, convierte a esta metodología en la más directa para realizar la titulación de residuos de cisteína en proteínas. Principalmente, debido a la especificidad que presenta el reactivo alquilante ante los cisteinatos.

Es notoria la baja velocidad de reacción a valores de pH ácidos, en los que el tiol estaría protonado y por ende imposibilitado para reaccionar con el mBBr. Lo contrario sucede a valores más alcalinos, en los que la cantidad de tiolato aumenta, y lo hace así también la velocidad de reacción. El valor de pH a partir del cual comienza a predominar la especie tiolato reactiva, está dado por el pK_a del/los residuos de cisteína de la proteína.

A continuación, se muestran los perfiles de pendiente inicial en función del pH, obtenidos para todas las proteínas de este trabajo.

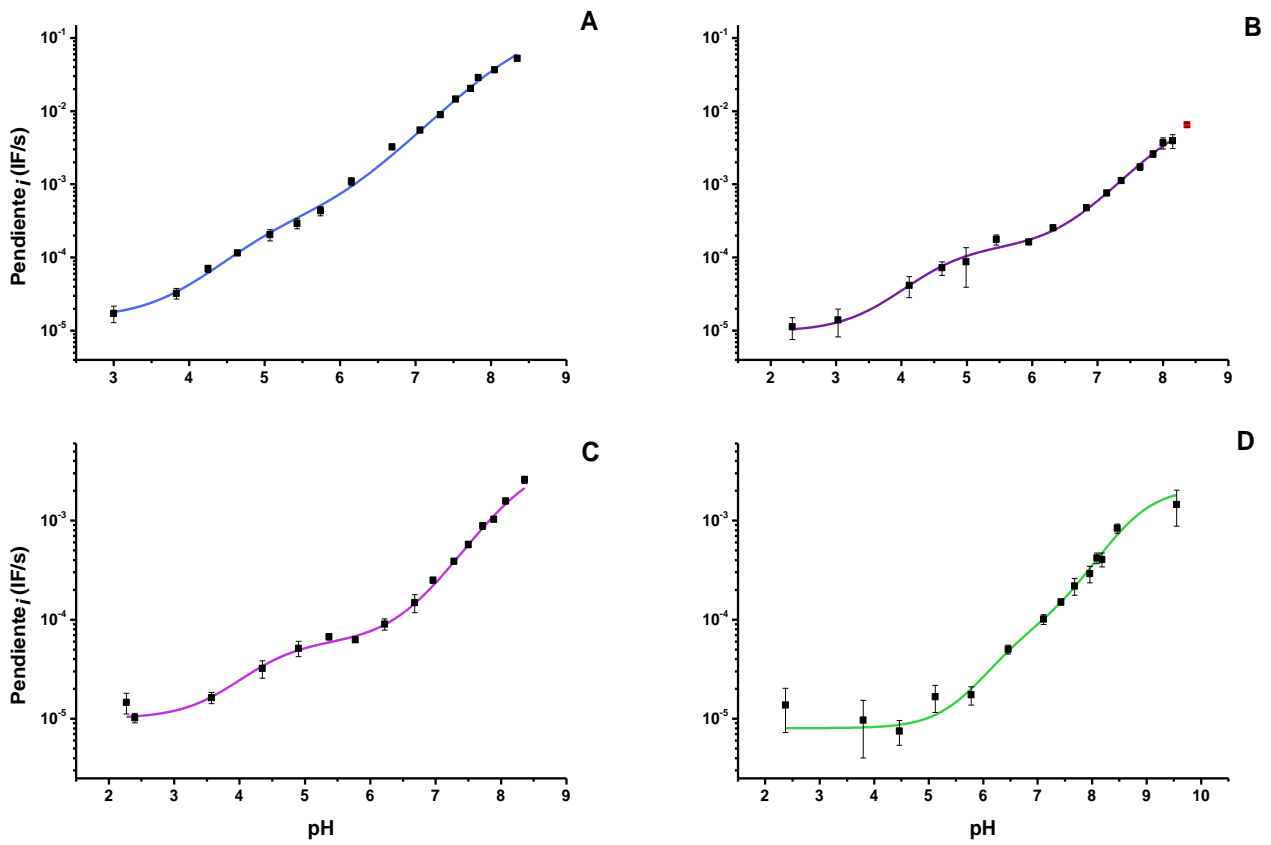


Figura 4.6. Gráficos de pendiente inicial (Pendiente_i) en unidades de intensidad de fluorescencia por segundo (IF/s), en función del pH, para las *hGrx5* (A) WT, (B) C67S, (C) C122S, (D) -Loop + poliGly. Cada punto es el valor promediado resultante de cuadruplicados.

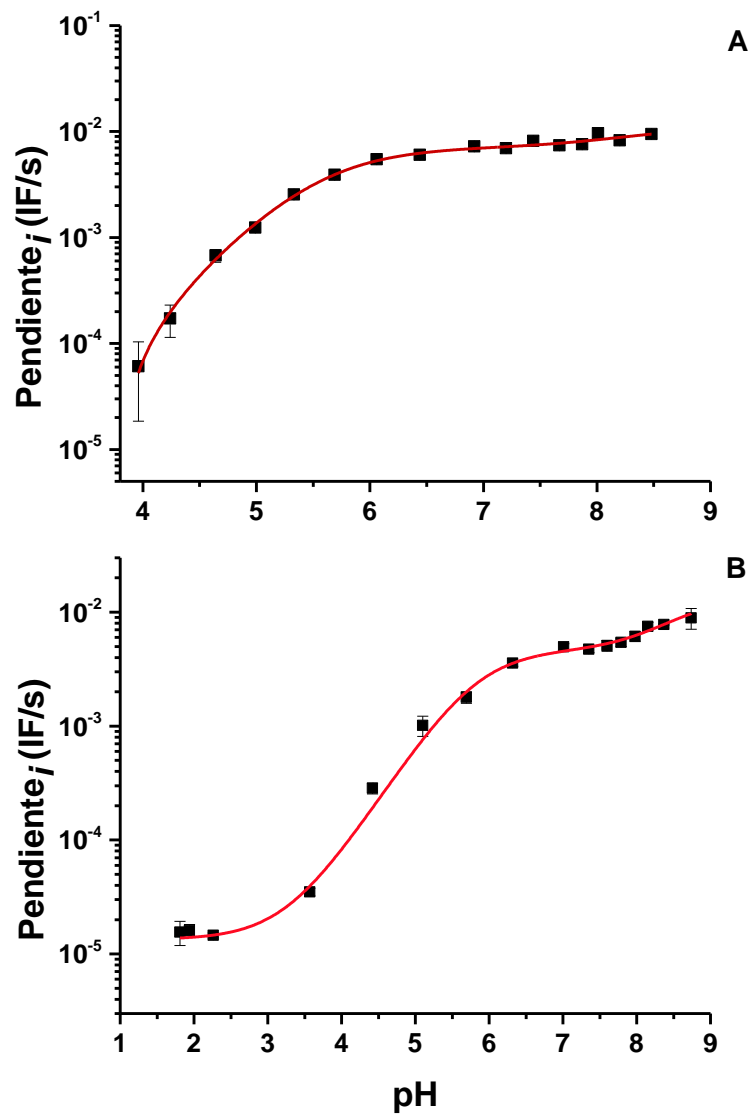


Figura 4.7. Gráficos de pendiente inicial (Pendiente_i) en unidades de intensidad de fluorescencia por segundo (IF/s), en función del pH, para la *hGrx2* WT (A) y C40S (B) respectivamente. Cada punto es el valor promediado resultante de cuadruplicados.

Tabla 4.3. Resultados de pK_a para las glutarredoxinas estudiadas en este ensayo.

Proteína	pK_{a1}	pK_{a2}
<i>hGrx5</i> WT	5.08 ± 0.37	8.49 ± 0.16
<i>hGrx5</i> C67S	4.60 ± 0.17	8.29 ± 0.14
<i>hGrx5</i> C122S	4.39 ± 0.24	8.34 ± 0.13
<i>hGrx5</i> -Loop + poliGly	6.53 ± 0.25	8.80 ± 0.21
<i>hGrx2</i> WT	5.58 ± 0.06	8.32 ± 0.80
<i>hGrx2</i> C40S	5.81 ± 0.07	8.63 ± 0.70

De los gráficos anteriores se puede notar que siempre se obtuvo un perfil de dos pK_a , para todas las proteínas. Esto fue particularmente sorprendente para las que presentan solo un residuo de cisteína, de las cuales esperábamos un perfil sigmoide, correspondiente a un único grupo tiol. Sin embargo, en estos casos el ajuste más correcto, es decir, el que arrojó un R cuadrado más cercano a 1, fue el de una curva doble sigmoide. Esto ocurrió para las *hGrx5* C67S y C122S, y la *hGrx2* C40S.

Las diferencias entre valores de pK_{a2} , teniendo en cuenta los errores, son muy pequeñas entre proteínas. Sin embargo, los residuos de cisteína de las distintas proteínas no se encuentran en entornos químicos similares. Esto nos lleva a plantear que el perfil doble sigmoide obtenido, no indica la titulación de ese segundo residuo (en el caso de las que tienen dos cisteínas), sino que representa formas desnaturalizadas a pH alcalino. De esta manera, también se justifica el comportamiento de las proteínas con un solo residuo de cisteína.

Esta suposición se complementa muy bien con la evidencia existente sobre el alto dinamismo que presentan las Grx en su estructura y con la importancia de la interacción por EdH en la estabilización del tiolato[36]. Estos dos principios se pueden vincular, pensando en que la libertad conformacional de la cisteína en Grx en su estado nativo está estabilizada en su forma tiolato por diversas interacciones incluyendo EdH, lo que da como resultado una cisteína ácida. Ahora bien, la libertad conformacional de la proteína frente a un aumento del pH, posiblemente elimine alguna de esas interacciones, por cambios en la geometría, o, desprotonación de otros residuos. Entonces la segunda meseta que se ve en las gráficas implicaría, según este razonamiento, una estructura alternativa existente a pH alcalino, donde la cisteína ha perdido estabilizaciones por las interacciones mencionadas, y presenta un pK_a aparente mayor.

Los resultados de la tabla 3 muestran la similitud en los valores de pK_a entre proteínas que realizan diferentes funciones con sus cisteínas de sitio activo. Comparando los valores para las proteínas WT, vemos que la diferencia es de apenas medio punto de pK_a . Esto último, comienza a desdibujar el concepto de que la reactividad y nucleofilia de estas proteínas, descansa en el pK_a de la cisteína de sitio activo. Siguiendo la línea de lo que se piensa comúnmente, una enzima como la *hGrx2*, debería presentar una cisteína catalítica con un valor de pK_a considerablemente más bajo que el pH fisiológico, de manera que la forma tiolato

reactiva de dicho residuo sea la mayoritaria a ese valor de pH, y la reacción con disulfuros de glutatión se vea favorecida. En el caso contrario, de una proteína como la *hGrx5*, que no realiza catálisis y cumple un rol más bien estructural, no se esperaría que el pK_a de su cisteína de sitio activo sea similar al de una proteína como la *hGrx2*, que depende de la acidez de sus residuos catalíticos para realizar su función como enzima.

Por otro lado, sabiendo que la formación de complejos entre centros hierro-azufre y Grx monotiólicas depende de un enlace covalente entre la cisteína de sitio activo y el hierro, podría justificarse que una cisteína ácida ayudaría a favorecer la formación de estos complejos. No obstante, la importancia de la acidez a nivel de esta función, en un contexto regulatorio y/o de señalización, sigue siendo desconocida.

Tabla 4.4. Recopilación de los resultados del Estudio de pK_a para todas las glutarredoxinas. La sigla “n.d.” se utilizó para los valores que no se determinaron.

Proteína	Abs 240 nm	mBBr	Espectro W	pK_a
<i>hGrx5</i> WT	n.d.	5,08 ± 0,37	4,71 ± 0,03	
<i>hGrx5</i> C67S	n.d.	4,60 ± 0,17	4,20 ± 0,10	
<i>hGrx5</i> C122S	n.d.	4,39 ± 0,24	4,74 ± 0,07	
<i>hGrx5</i> -Loop + poliGly	n.d.	6,53 ± 0,25	n.d.	
<i>hGrx2</i> WT	5,27 ± 0,06	5,58 ± 0,06	n.d.	
<i>hGrx2</i> C40S	n.d.	5,81 ± 0,07	n.d.	

Los resultados de la tabla 4.4 explicitan qué tanta complementariedad existe entre técnicas cuyo fenómeno observado para determinar el pK_a , es distinto. Comparando los valores obtenidos para la *hGrx2* WT en la titulación a 240 nm y por reactividad con mBBr, se nota que, si bien los valores no son exactamente los mismos, existe una diferencia de apenas 0,3 unidades. Esta diferencia, es lo suficientemente pequeña como para afirmar que las técnicas se complementaron bastante bien, y que, posiblemente el valor de pK_a del residuo de cisteína catalítico se encuentre en un valor próximo a los determinados por los dos enfoques. Al depender ambas técnicas, directamente del estado de protonación del grupo tiol, era de esperar que arrojaran resultados de considerable similitud.

Al comparar los resultados obtenidos por reactividad con mBBr y por cambios en el espectro de emisión de triptófano, vemos una notoria similitud. A diferencia de las técnicas anteriores, la titulación por detección de cambios en la emisión del triptófano vecino al residuo a titular, es completamente indirecta, y no necesariamente

dependiente del estado de protonación del grupo tiol cisteínico. Sin embargo, pese a que es distinto lo que se observa en cada método, las diferencias entre los resultados son menor de lo que uno esperaría.

Es destacable la particular acidez de las glutarredoxinas en cuanto al valor de pK_a de sus cisteínas catalíticas. No obstante, el motivo de esta propiedad, es ciertamente enigmático. Por más de que existan leves diferencias entre los valores determinados y que las aproximaciones usadas fueran distintas, los valores, en su conjunto, apuntan a que la cisteína N-terminal de sitio activo es ácida, independientemente de la función de la Grx en cuestión. Para el caso de la *hGrx5*, se da que ambas cisteínas, N y C-terminal, son ácidas, lo que adiciona complejidad a la hora de buscar un motivo que fundamente la acidez de la C-terminal.

El hecho de poseer cisteínas ácidas, puede llegar a ser una consecuencia estructural de conservar un sitio de unión a GSH a lo largo de la evolución. Es posible que la evolución no haya seleccionado cisteínas particularmente ácidas, sino, estructuras que favorecieran las reacciones de oxidorreducción y la captación de hierro, con el glutatión como sustrato.

Esto lleva a quitarle importancia al valor de pK_a como determinante de reactividad; y que las diferencias estructurales, que, llevan a que glutarredoxinas de clase I y II usen el glutatión para funciones distintas, no implican que las cisteínas de una clase sean más ácidas que las de la otra.

4.2 Cinética bimolecular

4.2.1 Cinética con *mBBr*

Como ya hemos mencionado, la actividad oxidorreductasa dependiente de glutatión, es la característica que separa a la *hGrx2* de la *hGrx5*, en las correspondientes clases, I y II respectivamente. En la búsqueda de los componentes determinantes de la actividad de intercambio tiol-disulfuro, decidimos evaluar la nucleofilia de las cisteínas de sitio activo en igualdad de condiciones. Con igualdad de condiciones, nos referimos a enfrentar a ambas proteínas a un electrófilo inespecífico, como el *mBBr*. Bajo estas condiciones encaramos el tema de la nucleofilia de manera más simple, en una cinética bimolecular entre el tiol de la cisteína de sitio activo y dicho electrófilo. La inespecificidad del *mBBr*, excluye, a priori, la posibilidad de que la arquitectura del sitio activo de cualquiera de ambas proteínas, favorezca la reacción en términos de velocidad. Esto es lo que nos garantiza, en definitiva, la igualdad de condiciones entre las proteínas activas y las que no lo son. Todo lo contemplado nos aproxima a observar la nucleofilia inherente a las cisteínas de sitio activo.

En estos experimentos, nos marcamos como objetivo determinar la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre las *hGrx* y el *mBBr*, con el análisis cinético que se planteó en la sección de materiales y métodos (ver 3.2.1). A este parámetro, lo consideramos como medidor de la nucleofilia; estableciendo que un valor relativamente alto de dicha constante, implicaría una mayor nucleofilia. A modo

de ejemplo, en la figura 4.8, se muestra un curso temporal de reacción de la *hGrx2* WT, a un valor de pH aproximado a 7 y 25°C.

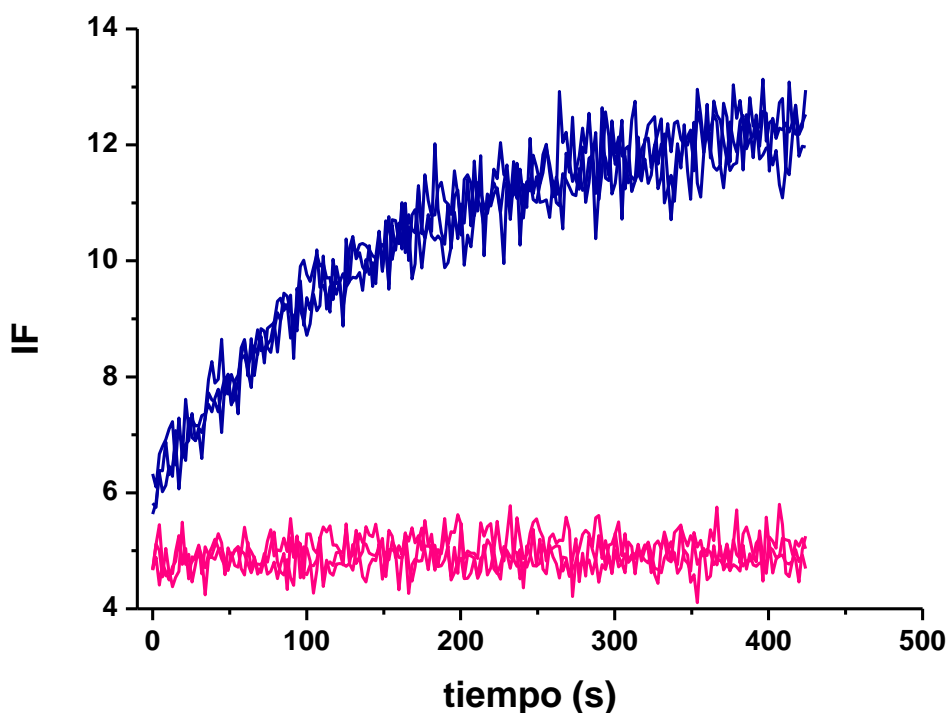


Figura 4.8. Cursos temporales de reacción. En azul se muestra el curso temporal de reacción entre *hGrx2* WT (1,7 μ M) y mBBr (20 μ M). Se registró la intensidad de fluorescencia (IF) en el tiempo. La línea de color rosado es el control sin *hGrx2* WT. El gráfico representa triplicados superpuestos, para ambos casos.

A partir de cursos temporales como los de la figura anterior, se determinó el valor de la k_{OBS} , para cada concentración de mBBr, mediante el análisis cinético explicitado en el punto 3.2.1.2 (Materiales y Métodos). Vale la pena mencionar, que para las *hGrx5* la reacción fue mucho más lenta, y por lo tanto, fue seguida por más tiempo, de manera de ver el final. No obstante, la lentitud de la reacción entre glutarredoxinas y mBBr fue tal, que solo en las concentraciones más altas del último se comienza a ver la finalización.

En las siguientes figuras (15 a 20) se muestran los perfiles de k_{OBS} vs. mBBr, obtenidos para todas las proteínas.

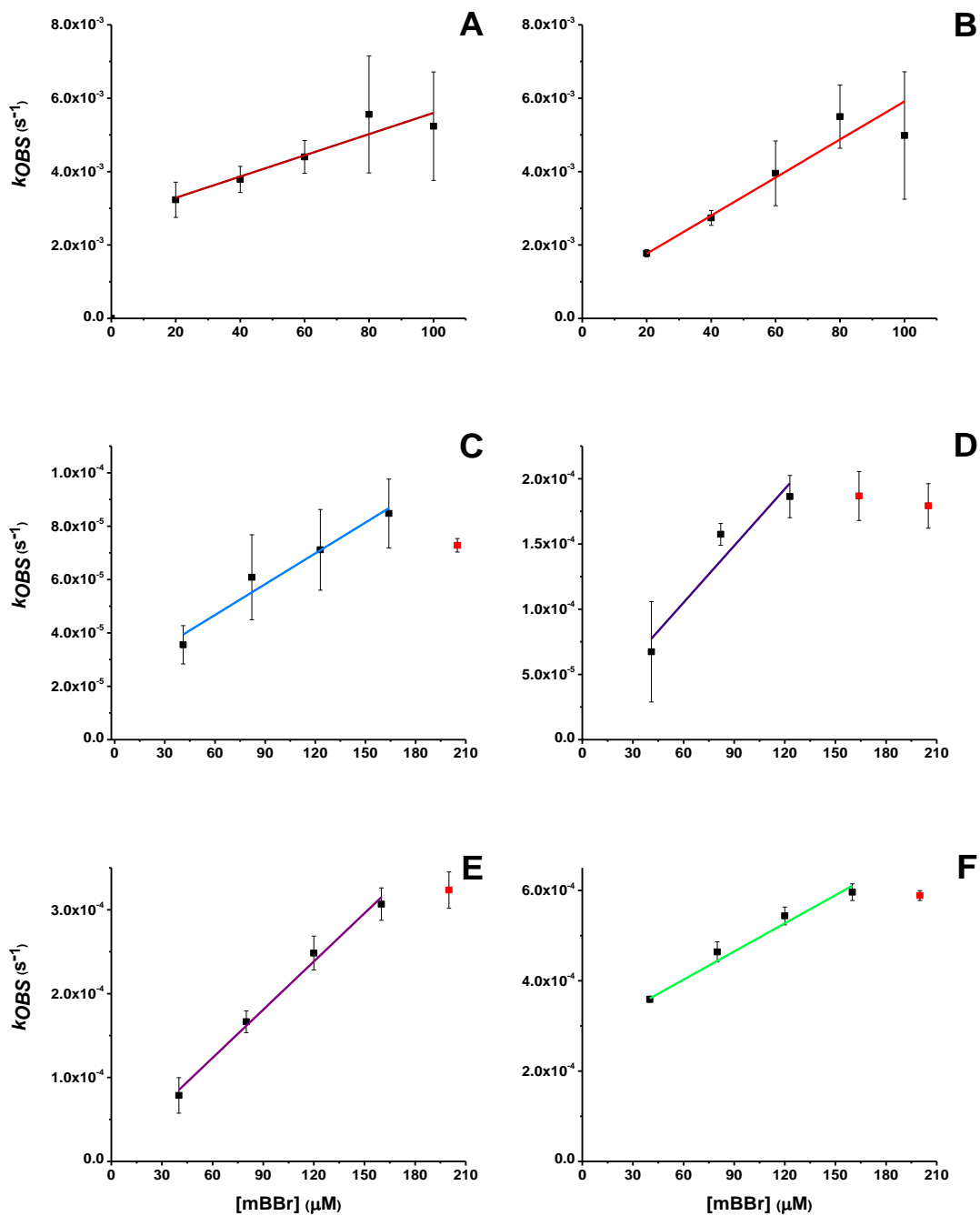


Figura 4.9. Gráficos de constantes observables de la reacción entre Grx ($1 \mu M$) y mBBr, en función de la concentración del último. Cada valor de k_{OBS} , es el promedio resultante de cuadruplicados. Se muestran las tendencias para las Grx2 (A) WT, (B) C40S, y las Grx5(C) WT, (D) C67S, (E) C122S y (F) -Loop + poliGly.

En las figuras anteriores, las distintas glutarredoxinas coinciden en su comportamiento, en las concentraciones más altas de mBBr. Se observa que, en estos puntos, la k_{OBS} no aumenta conforme lo hace la concentración de mBBr, sino que se estanca. Lo cual definitivamente no corresponde con el marco teórico

planteado para estas reacciones, en el que se espera un comportamiento directamente proporcional entre la concentración del reactivo en exceso y la constante observable. Además, en la mayoría de los casos observados en esta figura, las rectas no pasan por el origen, lo que también va en contra de lo planteado, ya que a concentración nula de reactivo no debería suceder la reacción.

Dada esta situación, no se han tenido en cuenta los puntos que no siguen la tendencia esperada (representados en rojo), de manera de obtener un valor de constante de segundo orden dentro de la linealidad.

Lo interesante de estas observaciones, es que son prueba de que existe una dependencia lineal entre la velocidad de reacción y la concentración de mBBr, pero, solo hasta cierto valor de la última. Esto puede ser consecuencia del comportamiento del fluoróforo a partir de cierto valor de concentración, ocasionando el efecto de filtro interno de fluorescencia.

Tabla 4.5. Resultados de k en unidades de $M^{-1}s^{-1}$, para la cinética de reacción con mBBr. Los valores de k se obtuvieron de los ajustes lineales, representados con distintos colores, en la figura 4.9.

Proteína	k ($M^{-1}s^{-1}$)
hGrx2 WT	29,0 ± 6,0
hGrx2 C40S	51,9 ± 4,5
hGrx5 WT	0,38 ± 0,06
hGrx5 C67S	1,5 ± 0,4
hGrx5 C122S	1,9 ± 0,1
hGrx5 -Loop + poliGly	2,1 ± 0,2

Los resultados indican una clara diferencia de un orden de magnitud entre las Grx 2 y 5 (tabla 4.5). Remitiéndonos al criterio de que el valor de k , esta directamente relacionado con la nucleofilia de las cisteínas de sitio activo y también con su reactividad, se puede afirmar que las Grx2 son más nucleófilas, o reactivas, que las 5.

Entre las Grx2, la C40S mostró ser aproximadamente 2 veces más rápida que la WT. Este fenómeno se ha visto para otras glutarredoxinas, en las que la mutación de la cisteína C-terminal de sitio activo, aumenta la velocidad aparente de la reacción catalítica[52]. La presencia de la cisteína carboxiloterminale, está relacionada con la regulación de la cisteína aminoterminale y con la protección de la última, para evitar la formación de las especies sobreoxidadas. Teniendo en cuenta esto, se puede plantear que la presencia de la C40 en la proteína WT podría enlentecer, de alguna manera, la reacción con el mBBr.

Un caso totalmente distinto es el de las *hGrx5*, que mostraron una velocidad muy baja. Sorprende, particularmente, que la WT sea la más lenta de todas y que la mutante de región, la más rápida. También, llama la atención, que las mutantes sin cisteína de sitio activo (C67S) y sin la cisteína alejada del mismo (C122S), sean más rápidas que la canónica.

Se puede llegar a justificar la velocidad de la mutante de región, si recordamos lo discutido en la sección 4.1.1. Como se sospecha que la proteína se encuentra mal plegada, podríamos suponer que los residuos de cisteína se encuentran más expuestos al solvente, de manera similar a tioles de bajo peso molecular, y por lo tanto reaccionen mejor con el mBBr. Esta hipótesis acompaña el resultado de 6,53 para el pK_a , ya que es relativamente cercano a los valores que presentan tioles de bajo peso molecular. De todas maneras, la velocidad de reacción sigue siendo muy pequeña, incluso menor a la de un tiol de bajo peso molecular.

Una buena manera de comparar las reactividades de tioles proteicos y de bajo peso molecular, es mediante la construcción de un gráfico de Brønsted (figura 4.10), a partir de la constante independiente del pH ($k_{i,pH}$), calculada a partir del valor de la asíntota horizontal del primer pK_a de los ajustes de titulación con mBBr, y los valores de pK_a . Los pK_a y $k_{i,pH}$ para los tioles de bajo peso molecular fueron extraídos de la literatura[53].

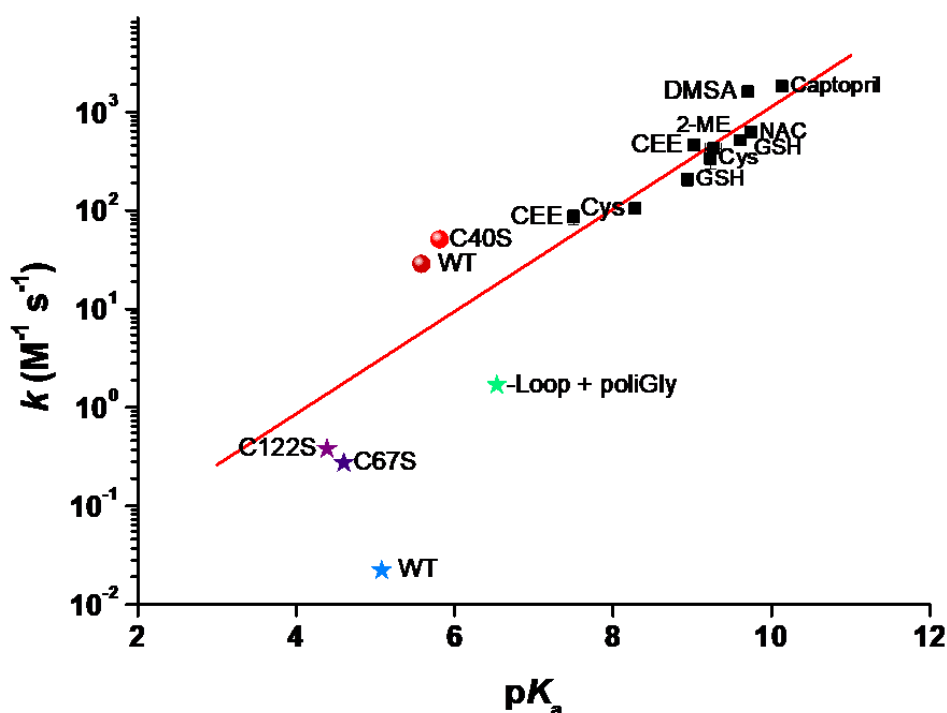


Figura 4.10. Gráfico de Brønsted para la reacción entre distintos tioles de bajo peso molecular y el mBBr. Los tioles utilizados para marcar la tendencia fueron: 2-Mercaptoetanol (2-ME), cisteína (Cys), glutatión (GSH), N-acetilcisteína (NAC), cisteína etil éster (CEE), Captopril y el ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Las proteínas (*hGrx5*, estrellas; *hGrx2*, esferas), fueron agregadas al gráfico, una vez calculada k ($M^{-1}s^{-1}$) independiente del pH, a partir de los valores del ajuste de pK_a y de la constante de reacción de segundo orden con mBBr.

La tendencia de reactividad para tioles de bajo peso molecular, está marcada por la línea roja del ajuste en la figura 4.10. Las Grx2, se encuentran por arriba de la tendencia, lo que significa que sus cisteínas son más reactivas en relación a los tioles no proteicos. Las Grx5 cayeron fuera de la tendencia, por lo que sus cisteínas presentan un importante impedimento a la hora de reaccionar con el mBBr. Posiblemente la naturaleza de este impedimento es que sea estérico, por lo que la reacción estaría espacialmente restringida la mayor parte del tiempo.

Para el caso de la mutante de región, vemos que el gráfico de Brønsted muestra lo contrario a lo discutido anteriormente. La proteína cae fuera de la tendencia, con menor reactividad de la esperada para un tiol de bajo peso molecular con ese valor de pK_a . No obstante, esto no descarta que la proteína se encuentre mal plegada.

La situación de la *hGrx5* WT continúa siendo difícil de descifrar; dado que prácticamente no es reactiva, a pesar de tener las dos cisteínas que por separado son más veloces (la C122 en el caso de C67S y la C67 en el de la mutante C122S).

Por último, se puede afirmar que, en igualdad de condiciones, las *hGrx2* son mejores nucleófilos que las *hGrx5*.

4.2.2 Cinética con FGSSGF

Con el objetivo de estudiar la cinética del primer paso de reacción de deglutationilación, llevamos a cabo la síntesis del sustrato glutatión disulfuro fluoresceína, o como se lo denominó anteriormente, FGSSGF.

A diferencia de la cinética con mBBr, no nos encontramos en igualdad de condiciones. La *hGrx2* asegura que la reacción se vea altamente favorecida, ya que el GSSG es sustrato de la misma. Por lo tanto, llegar a concluir que la rapidez de la reacción se deba a que la cisteína de sitio activo de la *Grx2* tenga un azufre más nucleofílico, o reactivo, no sería adecuado, ya que en este caso existen otros factores que están involucrados en la velocidad de la reacción. Como se mencionó anteriormente, el hecho de que el GSSG sea sustrato favorece ampliamente la reacción con las *hGrx2*; principalmente por las interacciones que se dan entre el sitio activo y el sustrato, que disminuyen la barrera energética para la reacción, llegando a productos con mayor facilidad. Lo contrario sucede con las *hGrx5*, que, al no ser activas, no presentan un sitio activo que favorezca la reducción de disulfuros de glutatión y, en un principio, se espera que sean más lentas.

En este experimento esperamos constantes de segundo orden altas, para las *hGrx2* y pequeñas para las *hGrx5*. Esto se vio reflejado en los tiempos de reacción observados en la figura 4.11 para las *Grx2* y *5* WT. Se nota que la reacción termina en cuestión de décimas de segundo para el caso de la *Grx2*, mientras que, para la *Grx5*, la reacción comienza a finalizar en aproximadamente 3 horas.

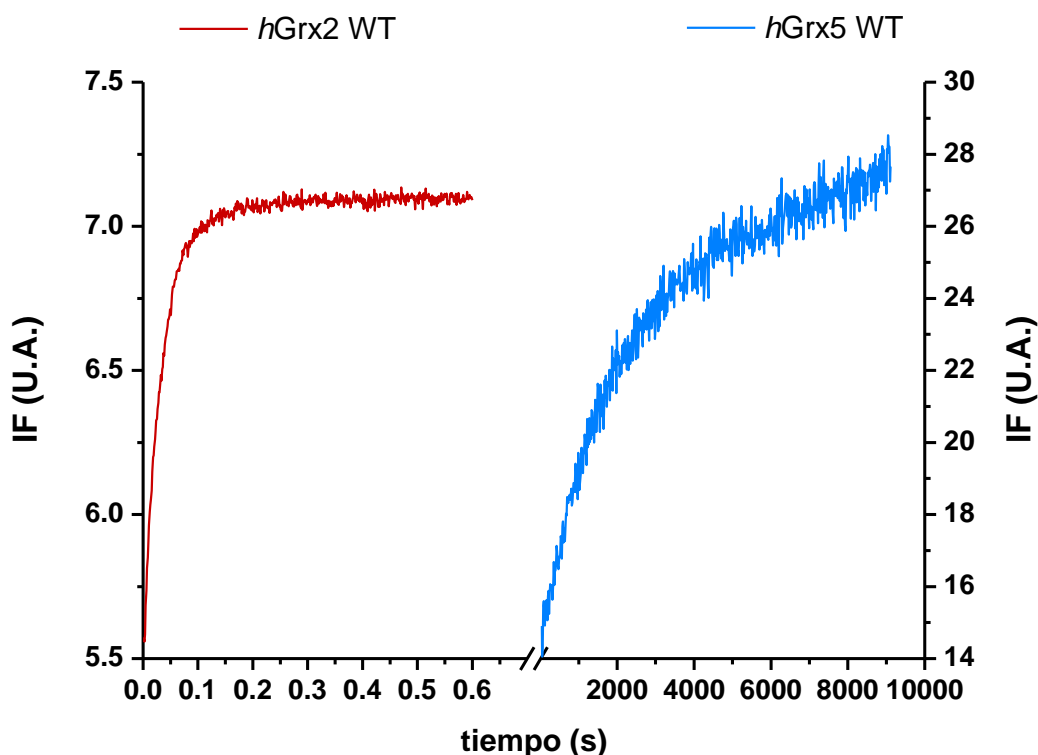


Figura 4.11. Cursos temporales de la reacción de *hGrx5* WT 12 μ M (línea azul) y *hGrx2* WT 10 μ M (línea roja) con FGSSGF, 50 y 100 nM respectivamente. Los valores de IF son de equipos distintos, y los experimentos fueron realizados en distintas condiciones (ver 3.2.1.2).

En este caso también trabajamos en condiciones de cinética de pseudo-primer orden, en las cuales el reactivo variable y en exceso fueron las glutarredoxinas, y el reactivo en defecto el FGSSGF. Aspectos destacables del FGSSGF, como fluoróforo, fueron su capacidad de emitir una muy buena señal, a concentraciones del orden de nM y la observación de un buen cambio de intensidad de fluorescencia entre su forma oxidada (FGSSGF) y reducida (FGSH).

A continuación, se presentan los gráficos de k_{OBS} en función de la concentración de glutarredoxina, para *hGrx2* WT, C40S, *hGrx5* WT y C122S.

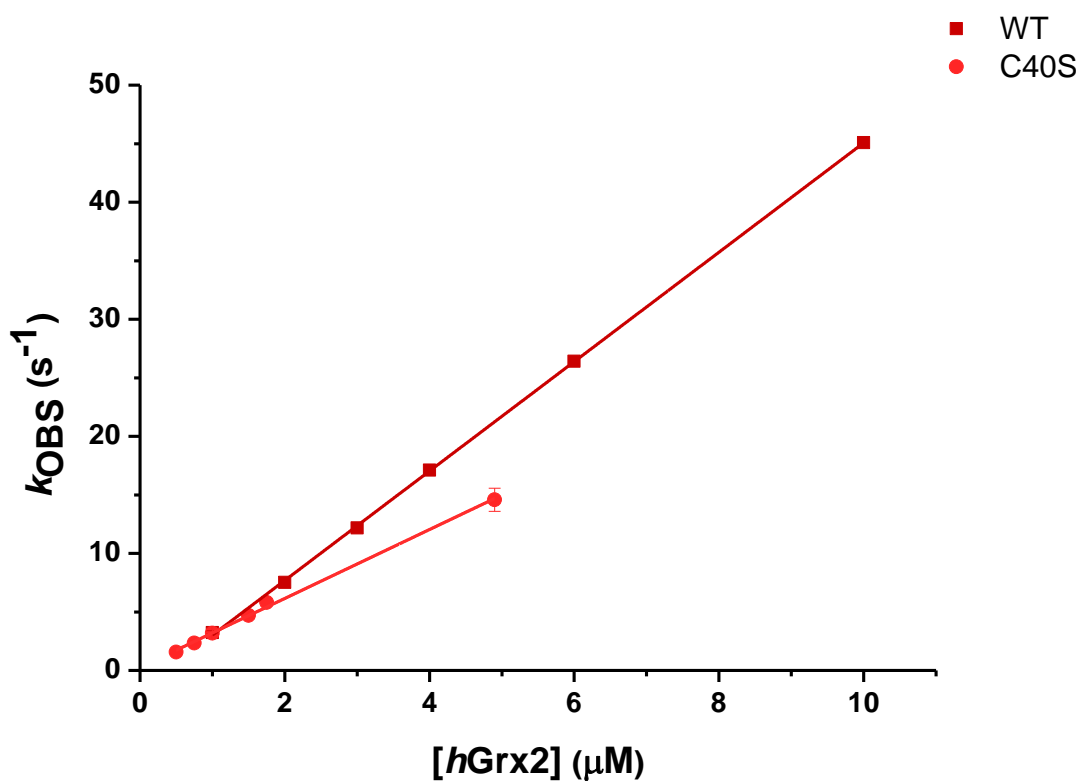


Figura 4.12. Gráfico de constante observable de la reacción entre FGSSGF (100 nM), *hGrx2* WT y C40S, respectivamente, en función de la concentración de proteína. Dada la velocidad de la reacción el experimento se realizó en un equipo de flujo detenido como se indicó en el punto 3.2.1.2. Cada valor de k_{OBS} , es el promedio resultante de 15 cursos temporales.

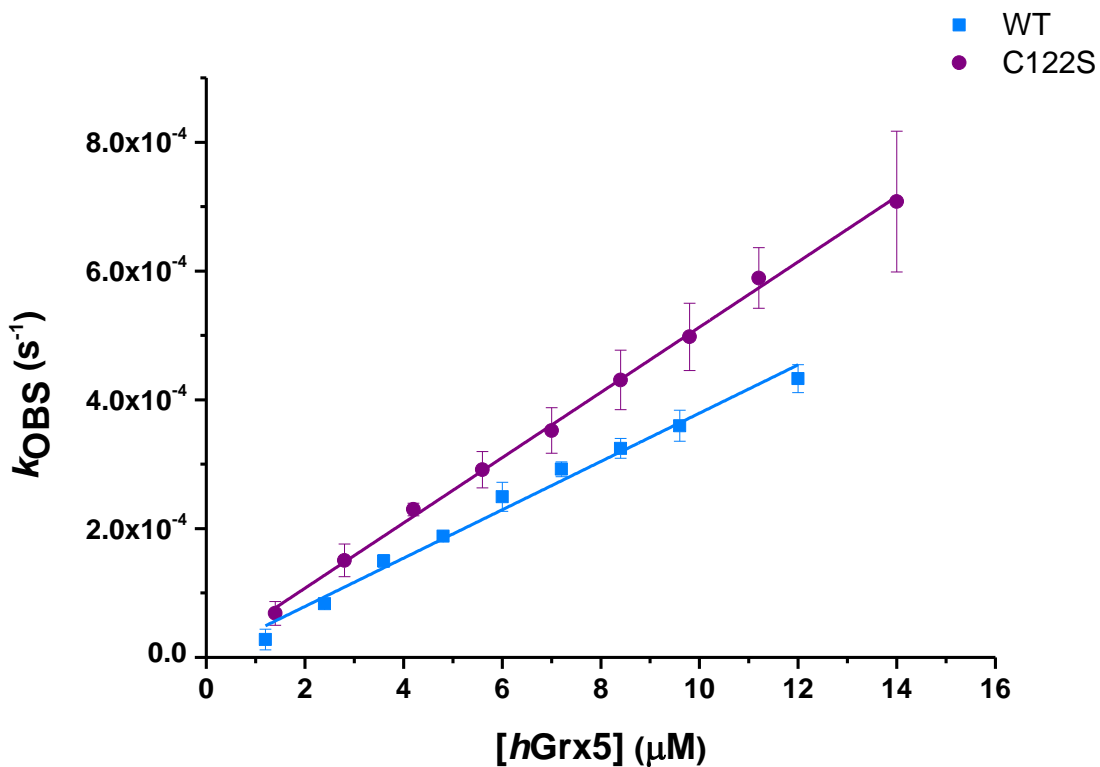


Figura 4.13. Gráfico de constante observable de la reacción entre FGSSGF (50 nM), *hGrx5* WT y C122S, respectivamente, en función de la concentración de proteína. Dada la velocidad de la reacción el experimento se realizó en un lector de placas, como se indicó en el punto 3.2.1.2. Cada valor de k_{OBS} , es el promedio resultante de cuadruplicados.

Para el resto de las proteínas (*hGrx5* C67S y -Loop + poliGly), no se dio la reacción de la forma esperada. En la mayoría de las concentraciones en exceso utilizadas, no se notó un cambio en la intensidad de fluorescencias, que indicara reacción (ver figura 4.14). En consecuencia, no se pudo construir el gráfico secundario de k_{OBS} vs. [*hGrx*].

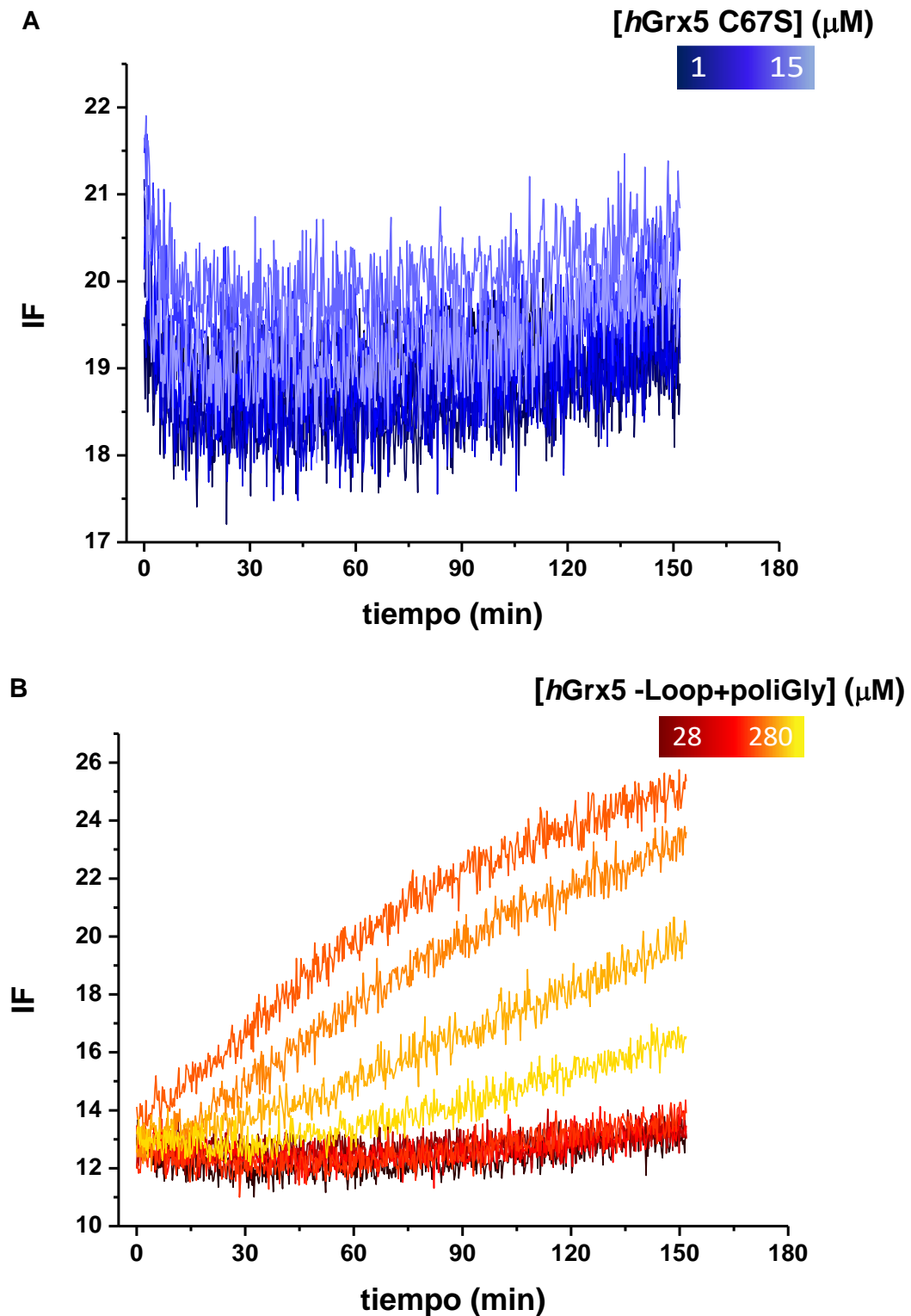


Figura 4.14. Gráficos de cursos temporales de reacción entre FGSSG 50 nM y distintas concentraciones de *hGrx5* C67S (**A**); y FGSSGF 25 nM, contra distintas concentraciones de *hGrx5* -Loop + poliGly (**B**).

Para la parte A de la figura anterior, queda claro que, en casi 3 horas de observación, no hay un patrón que dé pauta de la ocurrencia de reacción con la *hGrx5* C67S. Teniendo en cuenta que se trata de la mutante de cisteína de sitio activo de la *hGrx5*, es fácil imaginarse que la falta de la misma implique que no haya reducción del

sustrato. Sin embargo, visto que la segunda cisteína libre de la Grx5, C122, presenta una acidez particular, ($pK_a \sim 4,6$), podría haberse visto reacción en las condiciones de pH en las que se realizó la experiencia (pH $\sim 7,1$), ya que la forma tiolato sería la predominante. El hecho de que esto no haya sucedido, demuestra nuevamente que la acidez de una cisteína no asegura reactividad. Para el caso de Grx, claramente hacen falta otras interacciones a nivel de sitio activo, que favorezcan la reducción de sustrato.

En el caso de la *hGrx5* -Loop + poliGly, se nota la existencia de reacción solo para los últimos valores de concentración. A partir de 168 nM de proteína, se observa reacción, pero luego, conforme sigue aumentando la concentración de proteína, la velocidad de reacción baja. Este comportamiento impide cualquier intento de analizar la cinética de reacción a través las condiciones hasta ahora utilizadas. Nuevamente, podemos justificar lo observado, considerando que la proteína no se encuentra correctamente plegada. Esto puede implicar que la estructura del sitio activo se encuentre alterada. También el hecho de que la proteína presente una secuencia de seis residuos de glicina, puede adjudicarle mayor libertad y flexibilidad a la estructura proteica, causando que en la minoría de los casos, la proteína este en la conformación correcta como para reaccionar. Otro aspecto que vale la pena destacar, es que para este caso la diferencia entre los reactivos en defecto y en exceso es de apenas un orden de magnitud para la máxima concentración de proteína. Para trabajar en condiciones de pseudo-primer orden, generalmente se recomienda una diferencia de al menos dos órdenes de magnitud entre reactivos. Entonces en este caso podríamos estar viendo las consecuencias de no estar en las condiciones óptimas. Esto fue debido a que el stock de proteína de partida, fue de baja concentración.

Tabla 6. Resultados de k en unidades de $M^{-1}s^{-1}$, para la cinética de reacción con FGSSGF. Los valores de k se obtuvieron de los ajustes lineales, representados con distintos colores, en las figuras 23 a 26. La sigla "n.d." se utilizó para aquellas proteínas cuyo valor de k no se pudo determinar.

Proteína	k ($M^{-1}s^{-1}$)
<i>hGrx2</i> WT	$4,67 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$
<i>hGrx2</i> C40S	$2,94 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$
<i>hGrx5</i> WT	$37,5 \pm 1,7$
<i>hGrx5</i> C67S	n.d.
<i>hGrx5</i> C122S	$50,7 \pm 0,8$
<i>hGrx5</i> -Loop + poliGly	n.d.

Los resultados de constantes de velocidad de la tabla 6, reafirman lo que se viene discutiendo en esta sección. Existe una enorme diferencia en la velocidad de oxidación de las cisteínas de sitio activo (5 órdenes de magnitud), entre glutarredoxinas 2 y 5. Teniendo en cuenta los resultados de la cinética con mBBR, la diferencia no alcanza a justificarse por una reactividad inherente a las cisteínas. Aquí queda en evidencia, que el aspecto que marca la diferencia, es la estructura del sitio activo y sus interacciones con la entidad glutatión. Y, por lo tanto, este resultado respalda la hipótesis, de que la diferencia entre las funciones que realizan estas dos glutarredoxinas, tendría su origen en sitios diferentes de unión a GSH, que modularían

la nucleofilia hacia diferentes reacciones: reducción de disulfuros en clase I y adición a centros Fe-S en clase II.

Sin embargo, vale la pena destacar, que el FGSSGF, como sustrato, pierde un par de interacciones, relevantes en el denominado surco del glutatión (ver intro), debido a que la fluoresceína se incorpora en el grupo amino del γ -glutamato. Esto puede verse claramente en la figura 4.15.

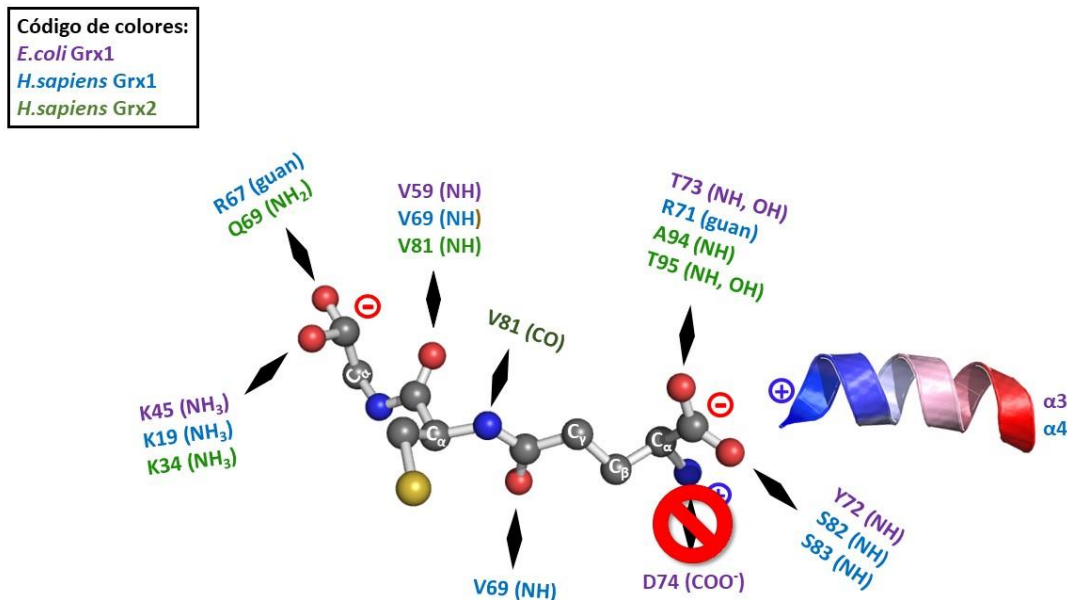


Figura 4.15. Mapa de interacciones conservadas entre Grx y el glutatión. Entre paréntesis se indican los grupos funcionales de los residuos que participan en la interacción. La figura es una adaptación de Gallogly et al., 2009 [31]. Con el símbolo rojo se indica la interacción que se pierde a la hora de introducir Fluoresceína en el GSSG.

A pesar de que se pierde la interacción, la reacción sigue siendo asombrosamente rápida, lo que sugiere que el sitio de unión, reconocimiento, o surco, de glutatión es bastante flexible permitiendo compensar la pérdida de determinadas interacciones. Otro aspecto debatible, es plantearse que tan relevantes son estas interacciones en el surco, o si existe de verdad un sitio de unión al glutatión. Lo que se sabe es que a pesar de que ciertos residuos son conservados en este sitio de unión, su ausencia o presencia, no demarca una relación evidente con la catálisis.

4.3 Cinética enzimática

4.3.1 Medidas de actividad enzimática

El criterio de clasificación más general para glutarredoxinas, hace una distinción entre las que presentan actividad en el ensayo de deglutinationilación (ver 1.1.2), y las que no. De esta manera evaluamos la presencia o ausencia de actividad para la *hGrx2* y 5 WT. El sustrato disulfuro para glutarredoxinas en este ensayo, fue el disulfuro mixto entre glutatión y β -mercaptoetanol (GSSEtOH), el cual fue sintetizado para este trabajo (ver procedimiento en 3.2.1).

Para la construcción del gráfico de la figura 4.16 se definió la velocidad inicial, como la pendiente del tramo lineal del curso temporal de reacción, seguido por absorbancia a 340 nm (figura 4.16 A). El rango lineal se delimitó como los primeros 150 segundos de reacción. El valor de la pendiente en unidades de Abs/s, lo transformamos a valores de concentración por segundo, mediante el coeficiente de extinción del NADPH a esa longitud de onda. Teniendo en cuenta las concentraciones de proteína usadas, asumimos encontrarnos en condiciones de estado estacionario con exceso de ambos sustratos: GSSEtOH 0,2 mM y GSH 1,8 mM.

Se puede observar que la pendiente correspondiente a la reacción con Grx2, es mucho más pronunciada que el control en ausencia de la misma (4.16 A). En cambio, para la Grx5, la diferencia entre el control y la reacción con proteína es mucho más sutil (4.17 A), dando pauta de la ausencia de actividad en este caso (4.17 B).

Para estas medidas esperamos un comportamiento lineal entre la velocidad inicial y la concentración de proteína. La pendiente del ajuste lineal que se ve en las gráficas 4.16 y 4.17, representan un coeficiente proporcional a la actividad específica de la enzima, ya que no se graficó la actividad en función de la concentración de enzima, sino la velocidad inicial de reacción.

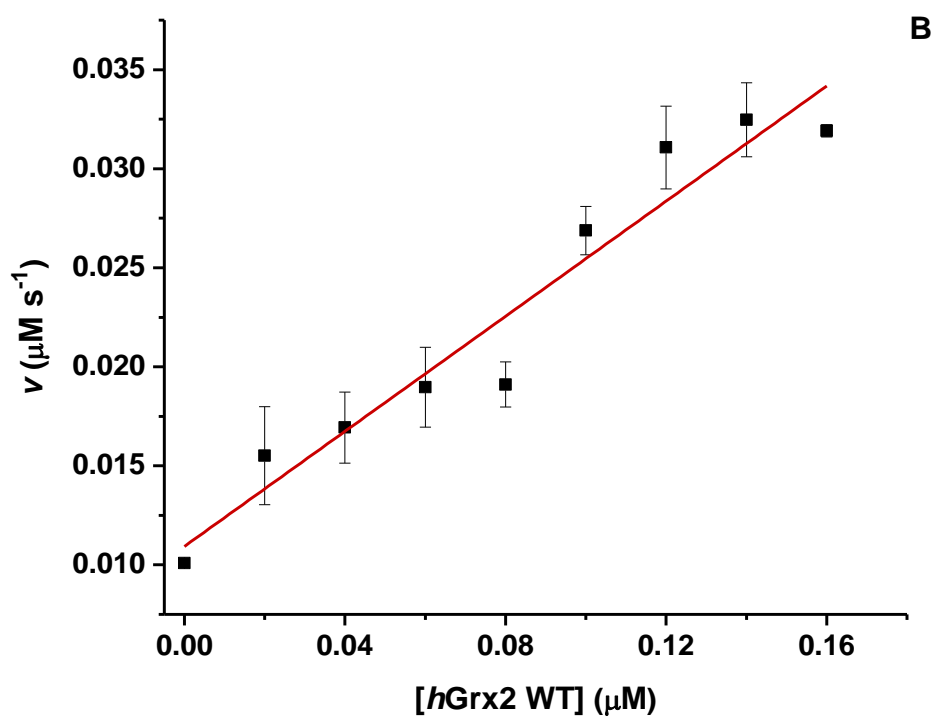
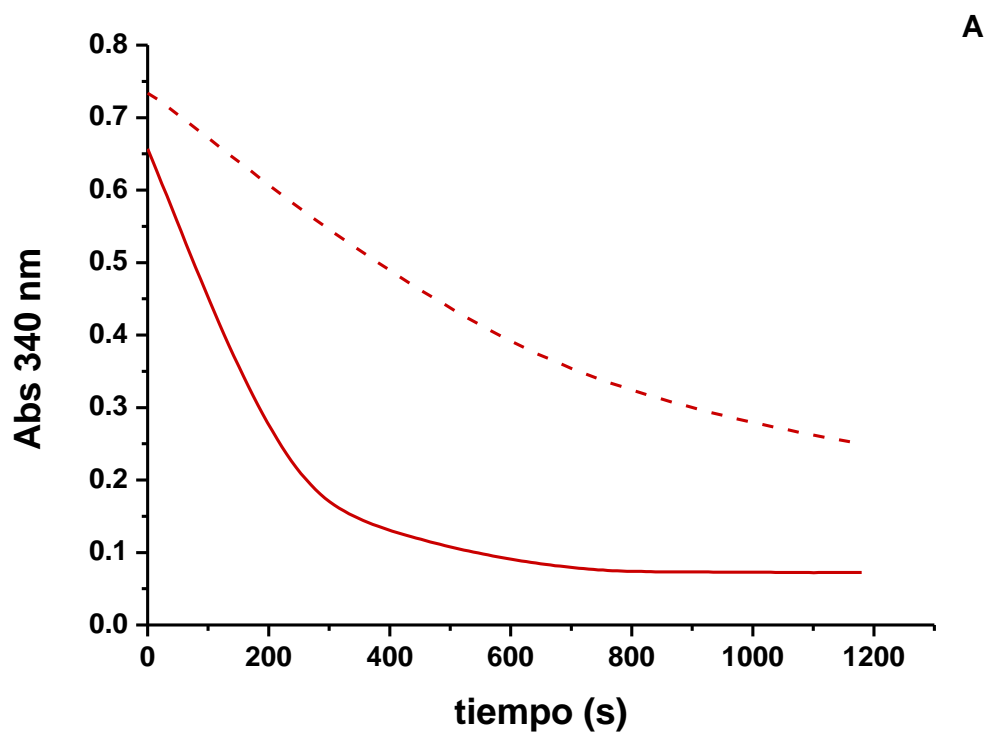


Figura 4.16. (A) curso temporal de reacción de *hGrx2* WT, seguido por el descenso en la absorbancia a 340 nm correspondiente al consumo NADPH. Las líneas sólida y discontinua, representan el control sin y el ensayo con 0,16 μM de *hGrx2* WT, respectivamente. (B) gráfico de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de proteína.

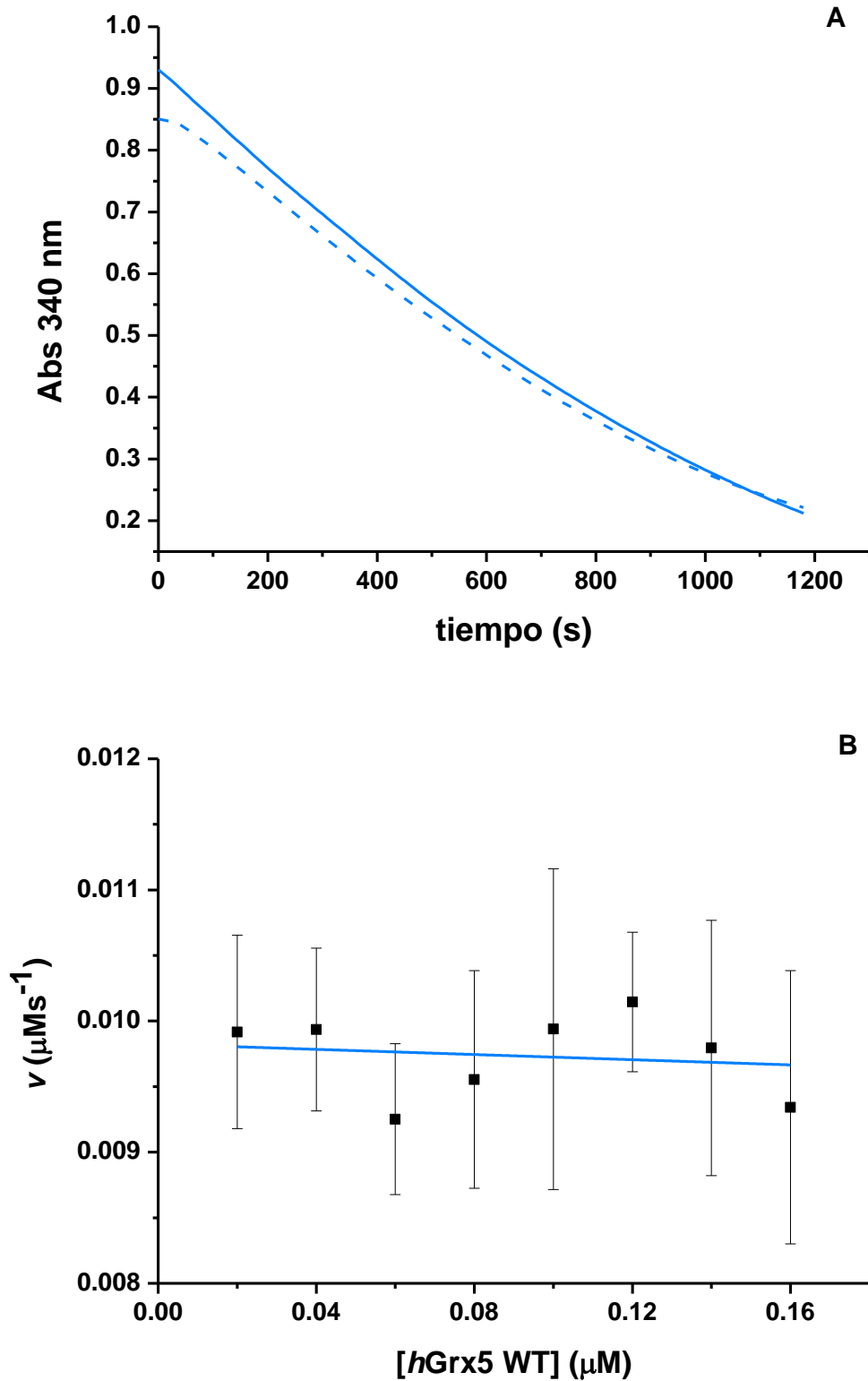


Figura 4.17. (A) cursos temporales seguidos por el descenso en la absorbancia correspondiente al NADPH (Abs 340 nm). Las líneas sólida y discontinua, representan el control sin y el ensayo con 0,16 μM de *hGrx5* WT, respectivamente. (B) gráfico de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de proteína.

Como era de esperarse, según su clasificación y reportes de la literatura, la *hGrx2* demostró ser activa en este ensayo, registrándose un valor de k_{CAT} aparente de $0,15 \pm 0,01$, en unidades de $\mu\text{M NADPH } \mu\text{M Enzima}^{-1}\text{s}^{-1}$, obtenido del ajuste lineal de la figura 4.16 B. Para la *hGrx5*, no se vio actividad, como también era de esperar, para Grx de clase II monotiólicas. La pendiente que aparece en la gráfica de la figura 4.17 B, fue realizada para demostrar gráficamente la ausencia de actividad. El gran error que se obtuvo para cada punto, refleja la oscilación producida por la inexistencia de reacción enzimática.

4.3.2 Cinética michaeliana

Teniendo en cuenta el tipo de mecanismo de la reacción estudiada (ver 1.2.2), realizamos un análisis cinético característico de enzimas bisustráticas. En estos casos se realizan dos series de experimentos: en una primera instancia, se varía la concentración de uno de los sustratos (GSH) manteniendo la concentración del otro (GSSEtOH) fija, repitiendo a diferentes concentraciones de último. La segunda serie consiste en el experimento inverso, es decir, se varía la concentración de GSSEtOH para distintas concentraciones fijas de GSH.

Para cada una de estas series se obtienen perfiles hiperbólicos, típicos de cinética estacionaria de Michaelis-Menten, los que se consiguen graficando velocidad inicial de reacción en función de distintas concentraciones de sustrato (variable) GSSEtOH o GSH. El perfil obtenido se ajusta a la ecuación de cinética de estado estacionario (Ec.4.1), a partir de la cual obtenemos los valores de velocidad máxima (V_{MAX}) y K_M aparentes, para el sustrato variable, en todas las concentraciones de sustrato fijo que se utilizaron.

$$v_0 = \frac{V_{MAX}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec 4.1}$$

En nuestro caso llevamos a cabo este procedimiento para la *hGrx2WT*; en el cual solo realizamos la primera serie de experimentos, variando el glutatión a distintas concentraciones fijas de GSSEtOH. En la figura 4.17, se muestran los perfiles hiperbólicos obtenidos a partir de concentraciones variables de GSH, y distintas concentraciones fijas de GSSEtOH. Los mismos fueron ajustados a la ecuación 4.1, obteniendo así, los valores de V_{MAX} y K_M aparentes que aparecen en la tabla 4.7.

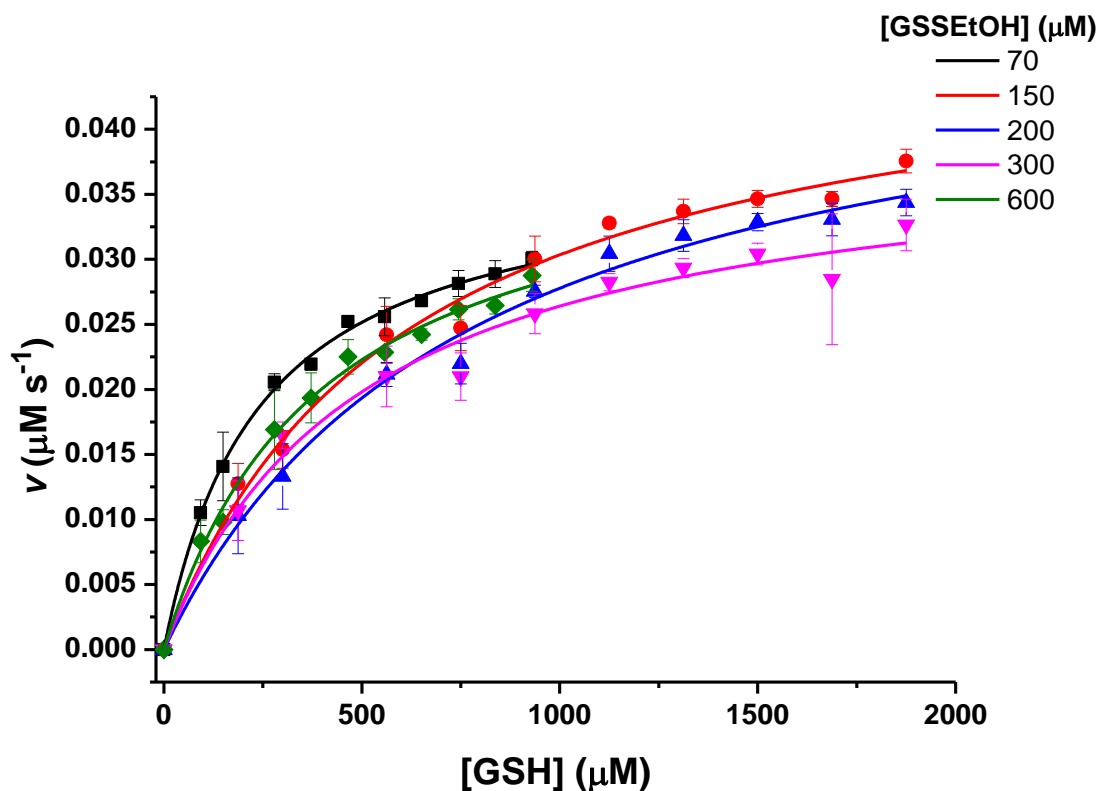


Figura 4.18. Perfiles de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de GSH, para determinadas concentraciones fijas de GSSEtOH (líneas de distintos colores). La concentración de hGrx2 WT fue de 160 nM, y no varió durante el experimento.

Tabla 4.7. Resultados de K_M y V_{MAX} aparentes, obtenidos de los ajustes de los perfiles hiperbólicos, para las distintas concentraciones de GSSEtOH. Los valores de V_{MAX} , fueron convertidos de $\mu M s^{-1}$, a $nM s^{-1}$.

[GSSEtOH] (μM)	K_M^{Ap} (μM)	V_{MAX}^{Ap} ($nM s^{-1}$)
30	226 ± 36	22 ± 1
70	241 ± 13	37 ± 1
100	338 ± 58	43 ± 3
150	605 ± 66	48 ± 2
200	775 ± 87	49 ± 2
300	499 ± 80	39 ± 2
400	414 ± 39	43 ± 2
600	396 ± 38	40 ± 2
800	442 ± 107	34 ± 5

Continuando con el análisis, se procede a realizar gráficos secundarios, los cuales consisten en graficar los parámetros aparentes, ya sea V_{MAX} o K_M , en función de las distintas concentraciones de GSSEtOH usadas. El comportamiento esperado para estos gráficos se muestra en la simulación de la figura 4.19.

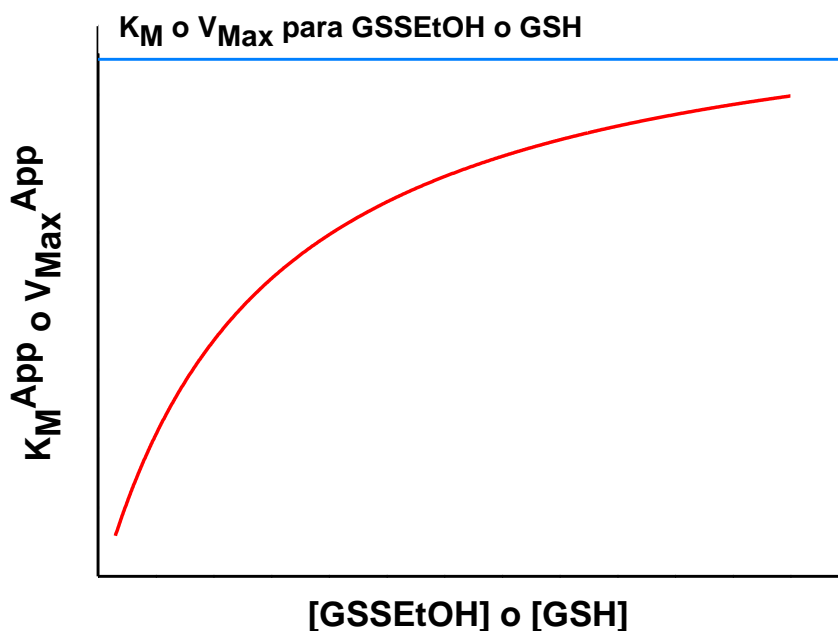


Figura 4.19. Simulación del gráfico secundario esperado para el análisis de enzimas bisustráticas. Con la línea azul se indica la asíntota horizontal de la función.

Ajustando el perfil obtenido a partir de los gráficos secundarios a una hipérbola (del estilo de la ecuación 4.1), se obtienen los parámetros cinéticos independientes de la concentración de sustrato, a partir de la asíntota horizontal de la función. Por ejemplo, si se grafica en función del sustrato GSSEtOH, se obtienen los parámetros independientes de la concentración del mismo, V_{MAX} y K_M para el GSH. Por otro lado, al graficar en función del GSH, se obtienen la V_{MAX} y el K_M para el GSSEtOH, independientes de la concentración de GSH.

Ahora bien, lo esperado no es siempre lo que se encuentra. Tanto, de los perfiles que se muestran en la figura 4.18, como, de los resultados de la tabla 4.7, se observa que los parámetros aparentes van incrementando su valor conforme aumenta la concentración de GSSEtOH hasta cierto punto, a partir del cual, comienzan a disminuir. Dicho máximo, se encuentra a 200 μM de GSSEtOH.

Para observar que les sucede a los parámetros aparentes a las distintas concentraciones de sustrato fijo, se llevaron a cabo gráficos de V_{MAX} y K_M aparentes para el GSH en función de la concentración de GSSEtOH. Como se puede apreciar en la figura 4.20, para ambos parámetros se observa la tendencia descrita

anteriormente: los valores aumentan hasta un máximo en 200 μM de GSSEtOH, a partir del cual disminuyen.

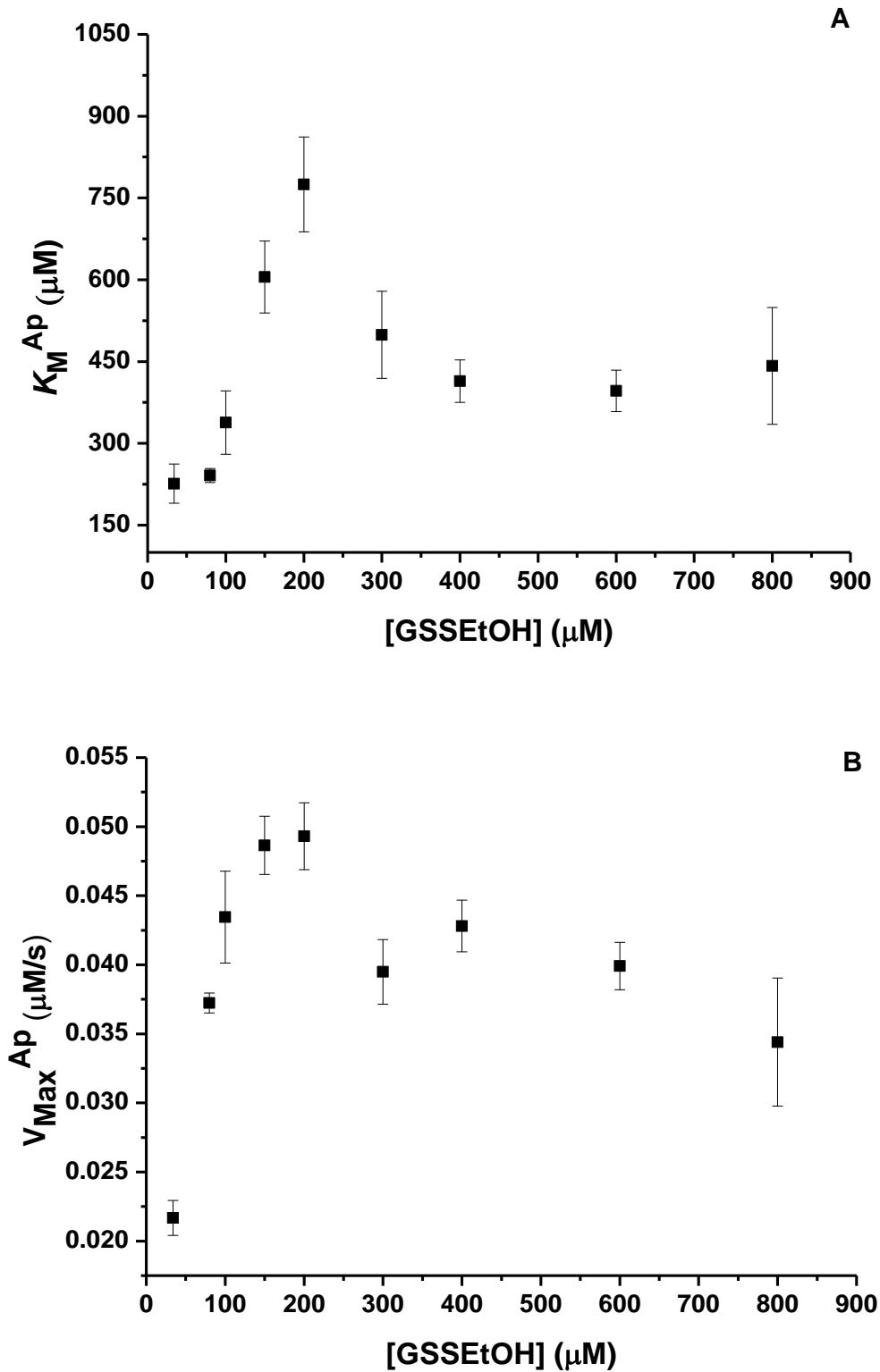


Figura 4.20. Gráficos secundarios de V_{MAX} o K_M en función de las distintas concentraciones fijas de GSSEtOH.

Este panorama dificulta el análisis cinético, siendo particularmente difícil asignarle un comportamiento, o un modelo, a lo observado. Dado que se observa disminución en la V_{MAX} para concentraciones altas de GSSEtOH, sugerimos que se está dando una inhibición por exceso de este sustrato. Para la K_M sucede exactamente lo mismo, indicando que el efecto de la inhibición de GSSEtOH repercute en ambos parámetros, lo que generalmente se vincula a un efecto de inhibición mixta.

Decidimos centrarnos en el efecto del GSSEtOH sobre la V_{MAX} , introduciendo el modelo de Haldane para inhibición por exceso de sustrato[54], que se describe con la ecuación 4.2.

$$v = \frac{V_{Max}}{1 + \frac{K_M}{S} + \frac{S}{K_i^S}} \quad \text{Ec. 4.2}$$

Este modelo contiene el término K_i^S , que representa la constante de inhibición del sustrato a altas concentraciones. La idea detrás del modelo, es la suposición de la formación de complejos improductivos, entre la enzima y el sustrato. Dicho modelo, solo contempla el caso de enzimas monosustráticas, por lo que los valores de V_{MAX} , K_M y K_i^S obtenidos del ajuste, son aparentes, en nuestro sistema experimental. A pesar de que el modelo no fuera el más adecuado para nuestra situación, logramos ajustar el perfil obtenido en la figura 4.20 B con la ecuación 4.2.

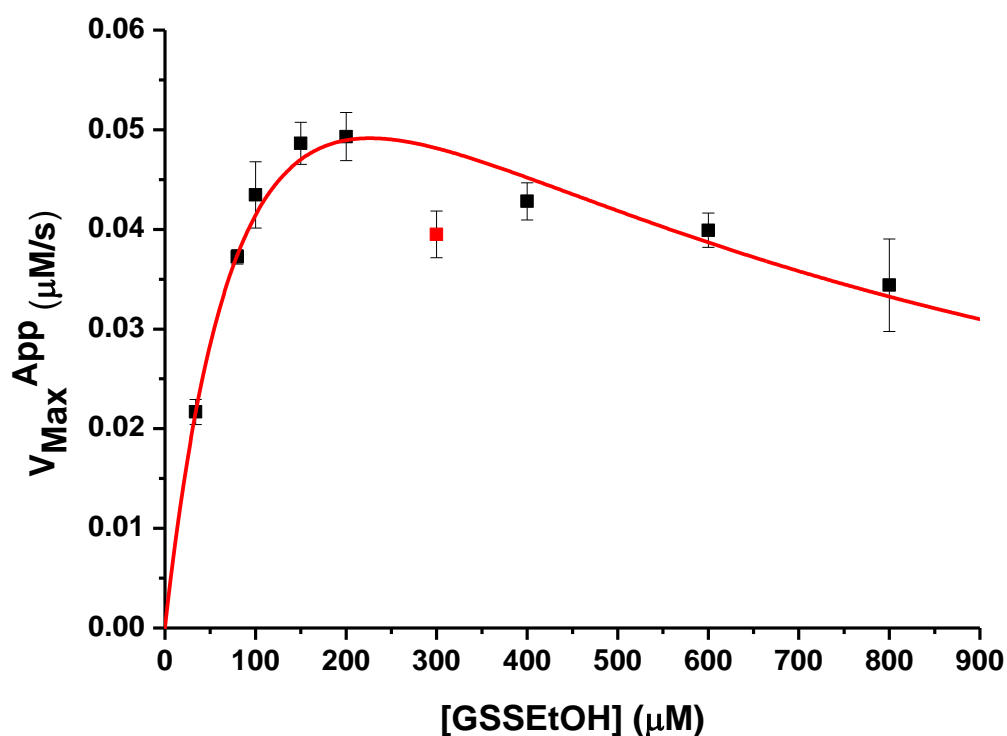


Figura 4.21. Gráfico secundario de V_{MAX} en función de las distintas concentraciones fijas de GSSEtOH, ajustado a la ecuación del modelo de Haldane (Ec. 4.2). El punto rojo no fue tenido en cuenta para el ajuste.

Sorprende, principalmente, que el ajuste haya sido bueno, a pesar de que nuestro sistema no se viera completamente amparado por el modelo. Pensando en lo que podría querer decir este comportamiento en un contexto celular o fisiológico, vemos que en realidad no tiene mucha relevancia. Una mitocondria con más de 200 μM de componentes glutationilados, sería un caso particularmente extremo, y al mismo tiempo indefinido, ya que no se conocen las concentraciones a las cuales puedan llegar este tipo de sustratos. Se podría decir que lo que se determinó, fue el comportamiento un tanto virtual, de la enzima, como consecuencia de haber llegado a concentraciones exageradas. Revisando la literatura, se ve que la mayoría de los autores que emprendieron este tipo de experimentos con glutarredoxinas, llegan hasta menos de 200 μM del sustrato fijo, disulfuro mixto de glutatión, que da la “casualidad” que es justamente el punto a partir del cual el comportamiento de la enzima deja de ser el esperado.

Sin duda, para tener una idea de hasta qué punto es de utilidad desglosar la catálisis de una enzima, hay que saber, aunque sea aproximadamente, las concentraciones fisiológicas de sustrato. Esto permite sacar conclusiones sobre el rol celular de dicha enzima, y su importancia en una determinada vía metabólica, así esclareciendo su función, para darle significado a todo el conjunto de información experimental que se conoce sobre la enzima (estructura, interactoma, cinética, etc).

Esta aparente inhibición por sustrato en ésta Grx, sumada al enigma de las altas concentraciones celulares de GSH[18], dejan en claro que existe un universo bastante grande detrás del problema de la interacción entre glutarredoxinas y glutatión.

Conclusiones y Perspectivas

Los ensayos de titulación revelaron dos aspectos interesantes sobre el pK_a de glutarredoxinas. Por un lado, la similitud en los valores determinados a través de enfoques experimentales totalmente distintos, nos ayuda a afirmar con seguridad que las Grx son proteínas ácidas. Sería muy difícil encontrar un motivo por el cual estos valores determinados observando fenómenos que no tienen nada que ver entre sí, en equipos y días distintos, fuera una mera casualidad. Por otro lado, descubrimos que la Grx5 presenta un segundo residuo de cisteína ácido (C122), con un valor de pK_a prácticamente igual al de la de sitio activo. Esto demuestra la complejidad a la hora de tratar de encontrar determinantes del bajo pK_a en cisteínas de Grx. Uno podría tratar de explicar la importancia de la acidez en cisteínas funcionales de sitio activo, que a nivel del mismo existan diversos tipos de interacciones que estabilicen al tiolato significando un descenso en el pK_a . Pero a la hora de fundamentar la acidez de un residuo de cisteína que no se ha visto implicado en ninguna función para estas proteínas, el asunto se torna complejo.

Vinculando este último concepto, con los resultados de nucleofilia inespecífica en la cinética con mBBr, llegamos a la siguiente conclusión. Lo que con frecuencia se cree sobre cisteínas con bajo pK_a , es que son especialmente reactivas ya que a pH fisiológica predominaría la forma tiolato. Entonces esto se vería reflejado en una importante nucleofilia en la reacción con mBBr. Este no fue el caso, ya que las Grx5 demostraron ser demasiado lentas en la reacción, inclusive quedaron por debajo de la tendencia de lo esperado para tioles de bajo peso molecular, mientras que las Grx2 fueron más rápidas y quedaron por arriba de la tendencia. A partir de esto, vemos que, en proteínas con cisteínas funcionales, el pK_a no es garantía de reactividad o nucleofilia, principalmente debido a que estos dos últimos conceptos están muy lejos de ser generales. La nucleofilia o reactividad, dependen exclusivamente de quienes sean las especies de la reacción, es decir, de quien sea el electrófilo y el nucleófilo.

Entonces, ya que el motivo de la acidez de Grx no parece ser generar una cisteína con aumentada reactividad intrínseca, ¿cuál es la ventaja evolutiva?, o una mejor pregunta, ¿Existe una ventaja evolutiva? Se puede plantear que la acidez de Grx es una consecuencia de la estructura que presentan en cuanto a la interacción con el glutatión. Estaríamos viendo un epifenómeno de la selección del sitio de unión al GSH.

La diferencia de aproximadamente 10^5 en la velocidad de reducción de FGSSGF entre Grx2 y 5 WT, nos lleva a creer que existe un mayor número de interacciones con la entidad GSH en el sitio de unión de Grx de clase I que de clase II. También la orientación o distribución espacial de la cisteína N-terminal, podría influir en este aumento en de velocidad en la Grx2, suponiendo que para esta proteína la cisteína estaría la mayor parte del tiempo disponible para llevar a cabo la reducción del disulfuro, mientras que para las Grx5 no. Como se ha dicho un par de líneas atrás, podríamos creer que el GSH está mejor estabilizado en Grx de clase I. Este sustrato que sintetizamos, impide una de las interacciones más conservadas en el sitio de unión al GSH (ver figura 4.15) y, sin embargo, la reacción sigue siendo bastante rápida. Por lo tanto, la dependencia de la velocidad de este paso, con el número de

interacciones que existan con el GSH en el sitio de unión, no es clara, pero si parece ser bastante versátil. Para abordar este problema de mejor manera, harían falta experimentos que tengan en cuenta la estructura en el momento de la medición de velocidad; esto puede ser realizado por resonancia magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular, entre otros.

Teniendo en cuenta la hipótesis de este trabajo, comprobamos que cambiar la identidad de los residuos del Loop, no le confiere actividad redox a Grx de clase II. Pero tampoco sirve rendirse tan pronto. Tal vez lo que hace falta para generar el cambio de función es directamente quitar esos 5 residuos, y dejar a la *hGrx5* igual a la *hGrx2* en esa región. De generarse problemas de plegamiento a la hora de la expresión de la proteína, podría favorecerse el plegamiento mediante el agregado de una proteína de fusión, u optimizar el uso de codones en la secuencia para que se de un plegamiento más “cuidadoso”.

El estudio cinético de la Grx2 WT, llegó a resultados interesantes ya que se vio un efecto de inhibición por el sustrato GSSEtOH a partir de determinada concentración. Esta información es de gran utilidad, para futuros investigadores en el área de glutarredoxinas, que se topen en algún momento con esta situación sin saber que sucede. Por más de que este fenómeno no tenga una relevancia a nivel fisiológico, el aporte en cuanto al conocimiento sobre la catálisis de estas enzimas es importante. Por otro lado, algo que hace falta realizar es el experimento inverso, es decir, realizar los experimentos esta vez variando GSSEtOH a distintas concentraciones fijas de GSH. De observar un efecto inhibitorio similar para el caso del GSH, podría ser interesante a nivel de lo que ocurre dentro de la célula.

Por último, opino que la elucidación de los orígenes estructurales de las diferencias funcionales entre glutarredoxinas, es un problema que requiere de más trabajo desde las áreas de la biología estructural y la cinética enzimática, y que conocer más sobre la interacción entre GSH y Grx, nos ayudaría a entender mejor la importancia del glutatión a nivel fisiológico y evolutivo.

Bibliografía

1. Racker, E., *Glutathione-homocystine transhydrogenase*. J Biol Chem, 1955. **217**(2): p. 867-74.
2. Askelof, P., et al., *Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide interchange. Thioltransferases rather than transhydrogenases*. FEBS Lett, 1974. **38**(3): p. 263-7.
3. Holmgren, A., *Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2275-9.
4. Rouhier, N., et al., *Glutaredoxins: roles in iron homeostasis*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(1): p. 43-52.
5. Rodriguez-Manzaneque, M.T., et al., *Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8180-90.
6. Rodriguez-Manzaneque, M.T., et al., *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1109-21.
7. Stroher, E. and A.H. Millar, *The biological roles of glutaredoxins*. Biochem J, 2012. **446**(3): p. 333-48.
8. Holmgren, A., et al., *Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(6): p. 2305-9.
9. Lillig, C.H., C. Berndt, and A. Holmgren, *Glutaredoxin systems*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1304-17.
10. Lillig, C.H. and C. Berndt, *Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(13): p. 1654-65.
11. Couturier, J., J.P. Jacquot, and N. Rouhier, *Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(15): p. 2539-57.
12. Holmgren, A., *Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin*. J Biol Chem, 1979. **254**(9): p. 3672-8.
13. Gladyshev, V.N., et al., *Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30374-80.
14. Lillig, C.H., et al., *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8168-73.
15. Johansson, C., et al., *The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity*. Biochem J, 2011. **433**(2): p. 303-11.
16. Shenton, D., et al., *Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16853-9.
17. Van Laer, K., C.J. Hamilton, and J. Messens, *Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(13): p. 1642-53.
18. Deponte, M., *The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures?* Antioxid Redox Signal, 2017. **27**(15): p. 1130-1161.

19. Montero, D., et al., *Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 508-13.
20. Ostergaard, H., C. Tachibana, and J.R. Winther, *Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol*. J Cell Biol, 2004. **166**(3): p. 337-45.
21. McLaggan, D., et al., *Glutathione-dependent conversion of N-ethylmaleimide to the maleamic acid by Escherichia coli: an intracellular detoxification process*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1393-9.
22. Kojer, K., et al., *Glutathione redox potential in the mitochondrial intermembrane space is linked to the cytosol and impacts the Mia40 redox state*. EMBO J, 2012. **31**(14): p. 3169-82.
23. Morgan, B., et al., *Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(2): p. 119-25.
24. Schwarzlander, M., et al., *Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors*. Antioxid Redox Signal, 2016. **24**(13): p. 680-712.
25. Martin, J.L., *Thioredoxin--a fold for all reasons*. Structure, 1995. **3**(3): p. 245-50.
26. Eklund, H., et al., *Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins*. EMBO J, 1984. **3**(7): p. 1443-9.
27. Ren, G., et al., *Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10150-9.
28. Su, D., et al., *A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins*. Biochemistry, 2007. **46**(23): p. 6903-10.
29. Gravina, S.A. and J.J. Mieyal, *Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxidoreductase*. Biochemistry, 1993. **32**(13): p. 3368-76.
30. Peltoniemi, M.J., et al., *Insights into deglutathionylation reactions. Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the gamma-linkage present in glutathione*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33107-14.
31. Gallogly, M.M., D.W. Starke, and J.J. Mieyal, *Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(5): p. 1059-81.
32. Bushweller, J.H., et al., *The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between Escherichia coli glutaredoxin(C14S) and glutathione*. J Mol Biol, 1994. **235**(5): p. 1585-97.
33. Gilbert, H.F., *Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability*. Methods Enzymol, 1995. **251**: p. 8-28.
34. Berardi, M.J., C.L. Pendred, and J.H. Bushweller, *Preparation, characterization, and complete heteronuclear NMR resonance assignments of the glutaredoxin (C14S)-ribonucleotide reductase B1 737-761 (C754S) mixed disulfide*. Biochemistry, 1998. **37**(17): p. 5849-57.
35. Begas, P., V. Staudacher, and M. Deponte, *Systematic re-evaluation of the bis(2-hydroxyethyl)disulfide (HEDS) assay reveals an alternative mechanism and activity of glutaredoxins*. Chemical Science, 2015. **6**(7): p. 3788-3796.
36. Roos, G., N. Foloppe, and J. Messens, *Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(1): p. 94-127.
37. Benesch, R.E., *The Acid Strength of the SH Group in Cysteine and Related Compounds*. Contribution from the Department of Biochemistry, State University of Iowa, 1955. **77**: p. 5877-5881.

38. Holmgren, A., *Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin*. J Biol Chem, 1972. **247**(7): p. 1992-8.
39. Kosower, N.S., et al., *Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3382-6.
40. Sardi, F., et al., *Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection*. Anal Biochem, 2013. **435**(1): p. 74-82.
41. Gilbert, H.F., *Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1990. **63**: p. 69-172.
42. Szajewski, R.P., *Rate Constants and Equilibrium Constants for Thiol-Disulfide Interchange Reactions Involving Oxidized Glutathione*. Journal of the American Chemical Society, 1980: p. 2011-2026.
43. Srinivasan, U., P.A. Mieyal, and J.J. Mieyal, *pH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis*. Biochemistry, 1997. **36**(11): p. 3199-206.
44. Mieyal, J.J., et al., *Thioltransferase in human red blood cells: kinetics and equilibrium*. Biochemistry, 1991. **30**(36): p. 8883-91.
45. Gan, Z.R. and W.W. Wells, *Identification and reactivity of the catalytic site of pig liver thioltransferase*. J Biol Chem, 1987. **262**(14): p. 6704-7.
46. Gan, Z.R., et al., *Yeast thioltransferase--the active site cysteines display differential reactivity*. Arch Biochem Biophys, 1990. **282**(1): p. 110-5.
47. Ellis, K.J. and J.F. Morrison, *Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes*. Methods Enzymol, 1982. **87**: p. 405-26.
48. Grunberg, K., *Ingenieria de proteinas para elucidar el mecanismo de glutaredoxinas*, in *Universidad Ort del Uruguay Facultad de Ingenieria*. 2016, Universidad Ort del Uruguay. p. 77.
49. Grassetti, D.R. and J.F. Murray, Jr., *Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine*. Arch Biochem Biophys, 1967. **119**(1): p. 41-9.
50. Johnson, E.A., *UV Atlas of Organic Compounds*. 1971. **5**.
51. Invitrogen, *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. The Molecular Probes Handbook, 2010. **1**(11): p. 162-163.
52. Discola, K.F., et al., *Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol, 2009. **385**(3): p. 889-901.
53. Portillo-Ledesma, S., et al., *Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine*. Biochemistry, 2014. **53**(38): p. 6113-25.
54. Dixon, M., *Inhibition by High Substrate Concentrations*. Enzymes, 1979. **1**(3): p. 126-128.