



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Institut Pasteur
de Montevideo



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica

Caracterización de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa de *Trypanosoma brucei brucei*

María Victoria Gutiérrez Acevedo

Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos

Tutora: Dra. Mariana Bonilla

Montevideo, Uruguay

2022

Agradecimientos

En primer lugar, agradecerle a Mariana por la oportunidad de realizar mi pasantía de grado en el laboratorio. Por la paciencia, la motivación, la dedicación, el apoyo y por todo lo que aprendí en este tiempo.

A Marcelo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por el tiempo y los conocimientos dedicados.

A todos mis compañeros del lab BRT, por la buena onda siempre y por estar ahí dándome una mano cuando lo necesitaba.

A toda persona que contribuyó directa o indirectamente a esta tesina.

A mi familia, por el apoyo diario y por animarme para seguir intentando aún cuando las cosas no salían como uno quería. Por escucharme siempre aunque no entendieran de lo que les hablaba.

A mis amigos, por acompañarme y darme para adelante cuando les contaba resultados desalentadores.

A mi novio, por apoyarme incondicionalmente durante toda la carrera y siempre escuchar todo lo que tenía para contarle. Por creer en mí y aconsejarme en las buenas y en las malas.

Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. A todos, ¡Muchas gracias!

Tabla de contenido

Resumen	5
Palabras clave	5
1. Objetivos	6
1.1 Objetivo general	6
1.2 Objetivos específicos	6
2. Introducción	7
2.1 Tripanosomas y Tripanosomiasis africana humana	7
2.2 Ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	10
2.3 Detalles destacados de la organización subcelular y metabolismo	12
2.4 Metabolismo redox de tripanosomátidos	14
2.5 Generalidades de las 3-mercaptopiruvato azufretransferasas (MSTs)	16
2.6 MSTs y su rol en el metabolismo de azufre	18
2.7 MSTs en tripanosomátidos	22
2.7.1 Generalidades de la MST de <i>Leishmania major</i>	22
2.7.2 MST, procesos relacionados y relevancia fisiológica en tripanosomátidos	24
3. Materiales y métodos	26
3.1 Amplificación y clonado de la <i>TbMST</i> en un vector T	26
3.2 Diseño de construcciones	28
3.2.1 Construcción para la expresión de <i>TbMST</i> en <i>Escherichia coli</i>	28
3.2.2 Construcción para la sobreexpresión de <i>TbMST</i> en <i>T. b. brucei</i>	29
3.2.3 Construcción para silenciamiento de <i>TbMST</i> en <i>T. b. brucei</i> mediante ARNi	30
3.3 Expresión en <i>E. coli</i> y purificación de la <i>TbMST</i> recombinante	31
3.3.1 Expresión de la <i>TbMST</i> recombinante en <i>E. coli</i>	31
3.3.2 Purificación de la <i>TbMST</i> recombinante	32
3.3.3 Cuantificación de la <i>TbMST</i> recombinante	33
3.4 Caracterización bioquímica de la <i>TbMST</i> recombinante	34
3.4.1 Ensayos de actividad enzimática	34
3.4.2 Cromatografía de exclusión molecular	35
3.5 Producción de anticuerpos anti- <i>TbMST</i> en ratón	35
3.6 Cultivos celulares de <i>T. b. brucei</i>	36
3.6.1 Inducción in vitro de la sobreexpresión de <i>TbMST</i> o del sistema ARNi	37
3.6.2 Efectos del estrés oxidativo e inhibidor de la MST en el crecimiento de la línea shRNAi <i>TbMST</i>	38
3.7 Transfección de líneas celulares de <i>T. b. brucei</i>	38
3.8 Inmunoensayos	39
3.8.1 Cosecha de parásitos	39

3.8.2 Western blot	39
3.8.3 Inmunofluorescencia indirecta	40
4. Resultados y Discusión	43
4.1 Amplificación y clonado de la secuencia codificante de la <i>TbMST</i> en un vector T	43
4.2 Expresión y purificación de <i>TbMST</i> recombinante en <i>E. coli</i>	46
4.3 Caracterización bioquímica de la <i>TbMST</i> recombinante	50
4.3.1 Ensayos de actividad enzimática	50
4.3.2 Cromatografía de exclusión molecular	52
4.4 Producción de anticuerpos anti- <i>TbMST</i> en ratones	55
4.5 Generación y caracterización in vitro de una línea de <i>T. b. brucei</i> sobreexpresante para <i>TbMST</i>	57
4.6 Generación y caracterización fenotípica in vitro de una línea de <i>T. b. brucei</i> ARNi para <i>TbMST</i>	60
4.7 Determinación de la concentración intracelular de la <i>TbMST</i>	67
4.8 Localización subcelular de la <i>TbMST</i> endógena	69
5. Conclusiones y Perspectivas	73
Bibliografía	76
Anexos	83
Anexo 1	83
Anexo 2	84
Anexo 3	85
Anexo 4	87
Anexo 5	88
Anexo 6	89
Lista de abreviaturas	95

Resumen

La 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST) es una enzima que participa del metabolismo de azufre de las células, catalizando la transferencia de un átomo de azufre desde el 3-mercaptopiruvato hasta una molécula aceptora. El gen correspondiente se encuentra conservado entre eucariotas, y también está presente en algunos procariotas. Su rol principal aún se desconoce, aunque se sabe que participa en distintas vías de relevancia fisiológica como en la producción de H₂S, la urmilación de proteínas y la tiolación de tRNAs. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar la MST del parásito *Trypanosoma brucei brucei* (*TbMST*). Los organismos del género *Trypanosoma* causan enfermedades en humanos y otros mamíferos, catalogadas como enfermedades tropicales desatendidas. Se caracterizó la forma recombinante de la *TbMST* por gel filtración y el radio hidrodinámico obtenido sugiere que la proteína presenta una conformación incompatible con un monómero globular. Empleando esta proteína se generó un suero anti-*TbMST* que permitió la caracterización de la forma endógena de la proteína en la forma infectiva del parásito, determinándose que ésta es poco abundante y de localización citosólica. Al regular a la baja la expresión de la *TbMST* mediante un sistema ARNi, se logró reducir eficientemente su expresión al 10%. Sin embargo, en las diferentes condiciones de cultivo *in vitro* ensayadas en este trabajo, no se observó un fenotipo diferencial. Esto podría deberse a que el remanente de enzima es suficiente para el crecimiento normal del parásito, o que la *TbMST* no sea una proteína esencial para su forma infectiva, al menos en condiciones *in vitro*.

Palabras clave

3-mercaptopiruvato azufretransferasa; 3-mercaptopiruvato; cisteína; *Trypanosoma brucei*; tripanosomiasis; H₂S; urmilación; tiolación.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Caracterización de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa de *Trypanosoma brucei brucei* (*TbMST*).

1.2 Objetivos específicos

- Expresión de la *TbMST* recombinante en *E. coli* y posterior purificación de la misma.
- Caracterización bioquímica de la forma recombinante de *TbMST* mediante cromatografía de exclusión molecular y ensayos de actividad enzimática.
- Producción de un suero anti-*TbMST* en ratones.
- Generación y caracterización fenotípica *in vitro* de una línea de *T. b. brucei* sobreexpresante para *TbMST*.
- Generación y caracterización fenotípica *in vitro* de una línea de *T. b. brucei* ARNi para la *TbMST*.
- Determinación de la concentración intracelular de la *TbMST* endógena.
- Determinación de la localización subcelular de la *TbMST* endógena.

2. Introducción

2.1 Tripanosomas y Tripanosomiasis africana humana

Los tripanosomátidos constituyen un grupo diverso de parásitos protozoarios¹ que pertenecen al supergrupo Excavata, Filo *Euglenozoa*, Orden *Kinetoplastida* (**Figura 1**) y comparten la característica particular de ser organismos flagelados cuyo ADN mitocondrial se encuentra organizado en una estructura compacta denominada kinetoplasto^{2,3}. Los tripanosomátidos ganaron popularidad por los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, por su rol como patógenos humanos¹.

El género *Trypanosoma* representa un conjunto de parásitos de vertebrados, que durante su ciclo de vida se hospedan también en insectos hematóforos que actúan como vectores⁴. Dentro de este género, existen dos clados principales: el clado *Trypanosoma brucei*, que contiene a los tripanosomas africanos o del Viejo Mundo y el clado *Trypanosoma cruzi*, que engloba a los tripanosomas del Nuevo Mundo⁵. Estudios filogenéticos apoyan la teoría de un origen monofilético del género *Trypanosoma*^{6,7}, y se estima que la divergencia entre *T. brucei* y *T. cruzi* data del Cretácico, hace aproximadamente 100 millones de años, siguiendo la separación de África, América del Sur y Euramérica⁵. Los organismos del género *Trypanosoma* causan enfermedades en humanos como la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y la enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*). Varias especies de animales de interés productivo son afectadas por parásitos del clado *T. brucei*. Estas enfermedades (cerca de 20 diferentes formas) son catalogadas como enfermedades tropicales zoonóticas desatendidas, que prevalecen principalmente en áreas tropicales y afectan a más de mil millones de personas, la mayoría de ellas pertenecientes a comunidades empobrecidas⁸.

La enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana humana (HAT, por sus siglas en inglés) es causada por *T. brucei* y transmitida por la mosca tsé-tsé (*Glossina spp.*). La enfermedad es actualmente endémica en 36 países⁹ y debido a la distribución de su vector, se encuentra confinada a la región de África subsahariana^{10,11}. Más allá de su persistencia en focos geográficos específicos, las condiciones ambientales, sanitarias y sociales actuales sugieren

que una nueva epidemia podría surgir en cualquier momento, lo cual tendría consecuencias severas en la salud pública y económica de los países afectados¹². Desde el comienzo del Siglo XX, la HAT mató a millones de personas. Gracias a un arsenal de medidas y herramientas, que continúan siendo insuficientes, los casos reportados han caído a niveles históricamente bajos. Según datos de la DNDi, menos de 600 casos causados por una cepa de *T. brucei* fueron diagnosticados en 2020, frente a los más de 38.000 diagnosticados en 1998. Sin embargo, se estima que actualmente 3 millones de personas viven en áreas de riesgo moderado a muy alto de contraer HAT¹⁴.

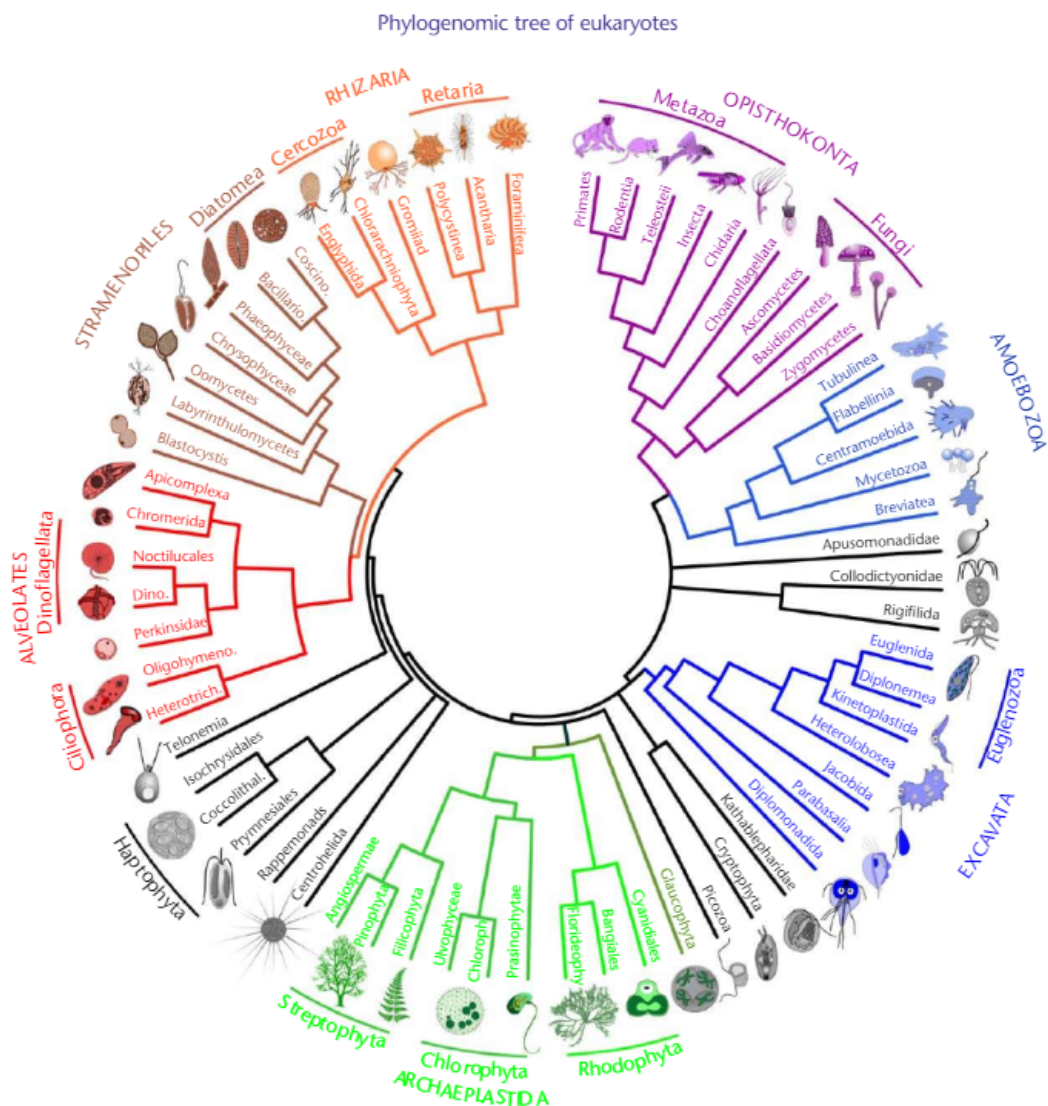


Figura 1. Árbol filogenómico de los eucariotas. Los Tripanosomas pertenecen al supergrupo Excavata (en azul oscuro), Filo *Euglenozoa*, Orden *Kinetoplastida*. Tomado de¹⁵.

A menudo, las personas en la etapa temprana de HAT no son diagnosticadas. Los síntomas que se presentan son poco específicos, como fiebre y debilidad. Si no se trata, el parásito tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica e invadir el sistema nervioso, causando la etapa avanzada en la que se desarrollan los síntomas neuropsiquiátricos. Sin tratamiento, la enfermedad es usualmente fatal¹⁴.

Taxonómicamente, *T. brucei* se divide en tres subespecies morfológicamente indistinguibles³, clasificadas según su origen geográfico, infectividad en humanos y la severidad de la enfermedad que causan. *T. b. gambiense* (*Tbg*) se encuentra restringida a África Oeste y Central (**Figura 2**), donde causa una forma crónica de la enfermedad del sueño y también infecta animales domésticos. Una segunda subespecie infectiva para humanos, *T. b. rhodesiense* (*Tbr*) se encuentra en África del Este y Sur (**Figura 2**) y causa una forma aguda de la enfermedad del sueño aunque su principal reservorio son los vertebrados no humanos. La tercera subespecie, *T. b. brucei* (*Tbb*) se encuentra distribuida a lo largo de toda el África subsahariana y solamente parasita animales domésticos y salvajes, causando la tripanosomiasis animal o nagana^{12,16}. Junto con la HAT, la nagana es una de las mayores causas de pérdidas económicas y del subdesarrollo rural en estas áreas de África¹⁷, ya que es un obstáculo serio para la producción agropecuaria y para la introducción de ganado que no se encuentra adaptado a esta enfermedad¹⁰.

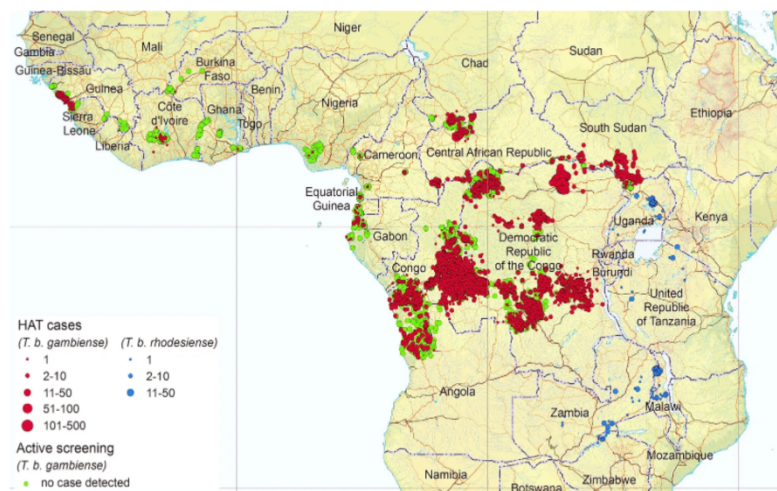


Figura 2. Distribución geográfica de casos confirmados de la enfermedad del sueño. En rojo y azul se muestran los casos confirmados de *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, respectivamente. En verde se señalan lugares con screening activo sin detección de casos. Tomado de¹⁴.

El plasma humano contiene un factor tripanolítico que destruye a los tripanosomas patógenos de mamíferos no humanos como *T. b. brucei*, mientras que *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* son resistentes a él¹⁷, lo que les permite a estas dos subespecies establecer infecciones en seres humanos. Según un estudio de relacionamiento filogeográfico, un subgrupo de *Tbg* se encuentra estrechamente relacionado con *Tbb*, mientras que *Tbr* sería una variante de *Tbb*, no un taxón aislado; diferenciándose únicamente en su fenotipo de infectividad en humanos¹². Dado que los tripanosomas infectivos de mamíferos no humanos son fáciles de cultivar y se multiplican rápido, sumado a que no son patógenos de humanos, han resultado ser un buen modelo de investigación de las variantes patogénicas para los seres humanos^{2,10}.

2.2 Ciclo de vida de *T. brucei*

Los parásitos protozoarios son un excelente ejemplo de organismos con una adaptación extrema al ambiente¹⁸. Exhiben un ciclo de vida complejo, exigencia propia de los patógenos transmitidos por vectores, que al cambiar de hospedero deben afrontar ambientes sumamente distintos. Las diferentes formas de *T. brucei* han evolucionado para optimizar la supervivencia y para asegurar la transmisión al próximo huésped¹⁹.

Mediante un eficiente mecanismo de evasión del sistema inmune del hospedero mamífero, el patógeno logra persistir y establecer infecciones crónicas. Esto es gracias a que su membrana celular se halla recubierta de una densa capa de proteínas denominadas glicoproteínas variables de superficie (VSG), que protege a los parásitos de la acción lítica de la inmunidad innata. Además, de manera estocástica el parásito recambia sus VSG por nuevas variantes, logrando de esta forma sortear la respuesta adaptativa humoral del huésped. Esto contribuye al típico patrón ondulante de parasitemia, con picos elevados seguidos de pronunciados descensos.^{2,18-20}

Otro factor que contribuye a la persistencia del patógeno en el huésped mamífero es la transición entre formas replicativas y no replicativas. En su estadio sanguíneo (BSF, del inglés *bloodstream forms*), *T. brucei* puede existir en dos formas: una alargada y fina conocida como *long slender* y otra corta y más compacta conocida como *short stumpy* (**Figura 3**). La forma *slender* es proliferativa y por el contrario, la forma *stumpy* es no

proliferativa. La replicación de la forma *slender* se encuentra finamente regulada, ya que una proliferación descontrolada mataría rápidamente al huésped. Para extender la supervivencia poblacional y así maximizar el potencial de transmisión, las células *slender* responden a la acumulación de un factor llamado *stumpy induction factor* (SIF), y se diferencian irreversiblemente a las células *stumpy*. Esta diferenciación es regulada por un mecanismo de *quorum sensing*²¹, y mediada por la acción de peptidasas secretadas por el parásito. Las peptidasas degradan proteínas del medio (del hospedero y el parásito) generando oligopéptidos (SIF), que a través de una cascada de señalización activan el proceso de diferenciación^{2,3,22}. Las líneas celulares con capacidad de diferenciación intacta se describen como pleomórficas. Esta característica se puede perder mediante el crecimiento prolongado de las líneas celulares en medios de cultivo definidos o en animales^{19,23}.

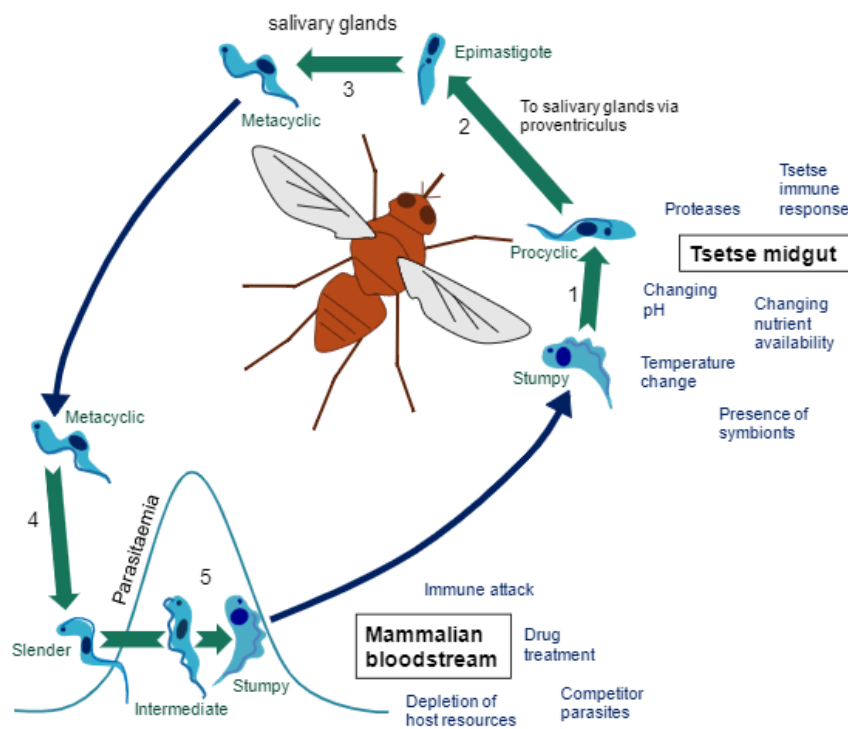


Figura 3. El ciclo de vida de *T. brucei* y los cambios ambientales a los que se enfrenta en cada etapa. (1) Luego de la ingesta de sangre de un animal infectado por parte de la mosca tse-tse, las células *short stumpy* que llegan al intestino de la mosca se diferencian en células procíclicas. **(2)** Migración de *T. brucei* hasta las glándulas salivales de la mosca. **(3)** Diferenciación a epimastigota, seguida de la producción de células metacíclicas infectivas. **(4)** En la transferencia al hospedero mamífero, las células metacíclicas se diferencian a la forma sanguínea. **(5)** En el torrente sanguíneo, las células *slender* replicativas elevan la parasitemia hasta que la acumulación celular desencadena la diferenciación a la forma *stumpy*, no replicativa. Tomada de¹⁹.

Luego de la ingesta por el vector, los parásitos se enfrentan a un ambiente desfavorable en el intestino de la mosca. Las células de la forma *slender* se mueren rápidamente y las *stumpy* sobreviven para diferenciarse al estadio procíclico (PF, del inglés *procyclic form*). Algunas características que les permiten sobrevivir a estas células en las condiciones hostiles a las que se enfrentan, son su resistencia al estrés ácido y proteolítico. Las células PF adquieren la capacidad de migrar a las glándulas salivales de la mosca, donde se diferenciarán a la principal forma replicativa epimastigota (**Figura 3**). Estas células poseen un flagelipodio, que les confiere la capacidad de adherirse a las células epiteliales de este órgano, proceso que sería necesario para la generación de la forma infectiva metacíclica. Esta última forma es no replicativa, pero tiene la capacidad de infectar al hospedero mamífero luego de la picadura por la mosca, migrando desde el tejido conectivo a la sangre y otros fluidos (linfa o líquido intersticial), para luego diferenciarse a la forma *slender* y repetir el ciclo infeccioso³.

2.3 Detalles destacados de la organización subcelular y metabolismo

La célula del tripanosoma es elongada y posee un citoesqueleto de microtúbulos altamente polarizado, lo que define la forma celular. Los organelos de única copia que posee, como ser el bolsillo flagelar, flagelo, kinetoplasto, lisosoma, mitocondria y núcleo se encuentran posicionados con gran precisión respecto al *corset* de citoesqueleto¹⁸ (**Figura 4**).

La estructura más posterior de la célula es el bolsillo flagelar, una invaginación de la membrana plasmática²⁴. Este es el punto de salida de flagelo, y es el único lugar de endo- y exocitosis. Es un sitio particularmente importante en la forma sanguínea del parásito, donde la superficie de la membrana se encuentra densamente empaquetada con VSG, que contribuye al reciclaje rápido de estas glicoproteínas^{18,21} (como se mencionó en la sección anterior). El flagelo del tripanosoma es el responsable de la motilidad celular, y se encuentra presente a lo largo de todo el ciclo. Se origina en el cuerpo basal, que se encuentra conectado a través de la membrana mitocondrial al kinetoplasto. La posición del kinetoplasto constituye la diferencia morfológica más obvia entre las diferentes formas de *T. brucei*: su posición es anterior al núcleo en la epimastigota, se encuentra entre el núcleo y el extremo posterior en la procíclica y se posiciona en el extremo posterior de la célula en la forma sanguínea¹⁸.

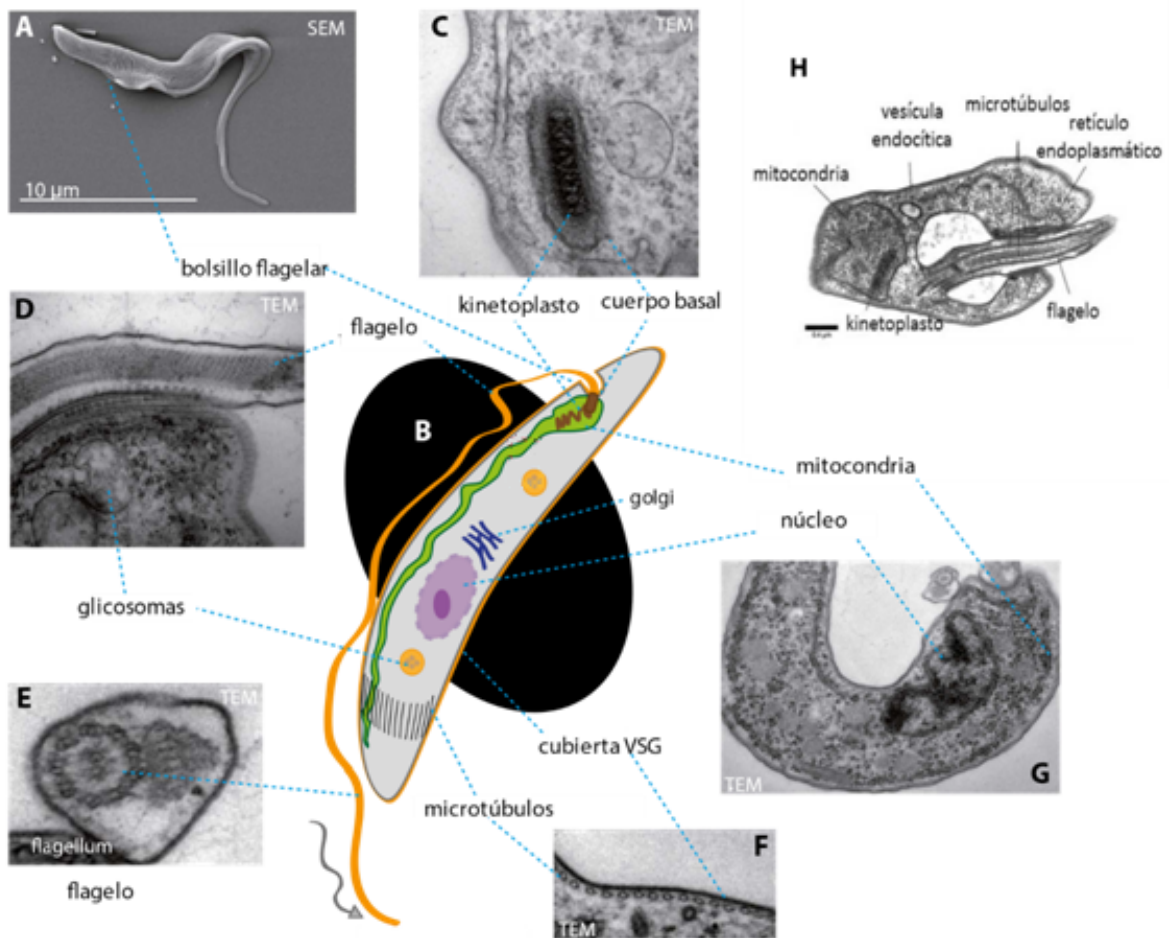


Figura 4. Esquema de los principales organelos y estructuras subcelulares de la forma infectiva del parásito. (A) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *T. brucei*. **(B)** Esquema de algunos componentes subcelulares, para los cuales se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) **(C-G)**. **(H)** Imagen de TEM del bolsillo flagelar. Las imágenes de SEM y TEM fueron obtenidas por Marcelo Comini. Tomada y adaptada de²⁵.

La mitocondria es una estructura elongada que se extiende desde la parte posterior hasta la anterior de la célula. En la forma sanguínea, la mitocondria es una estructura simple y tubular, sin crestas, con escasa contribución al metabolismo energético de la célula. En ese sentido, en este estadio la generación de energía depende de reacciones glicolíticas que se encuentran compartimentalizadas en organelos especializados llamados glicosomas¹⁸. La forma *slender* consume la glucosa proveniente de los fluidos del hospedero mamífero, convirtiendo un 98% de esta en piruvato en lugar de a lactato debido a la ausencia de la enzima lactato deshidrogenasa²⁶. La mayor parte del piruvato producido es excretado en lugar de ser metabolizado en la mitoncodria²⁷. Para oxidar el NADH producido durante la glicólisis, la forma *slender* consume grandes cantidades de oxígeno, que actúa como aceptor

de electrones en una reacción catalizada por una Oxidasa Alternativa, la cual está presente en la mitocondria de organismos fototrópicos, hongos y algunos protistas (TAO: trypanosome alternative oxidase)²¹. Por otro lado, en la forma procíclica la prolina desplaza a la glucosa como principal fuente de energía, lo cual requiere de una robusta función metabólica de la mitocondria (ej. ciclo de ácido tricarboxílicos y cadena respiratoria)^{18, 19}.

2.4 Metabolismo redox de tripanosomátidos

La homeostasis redox en tripanosomátidos parece estar regulada de manera eficiente, ya que son capaces de soportar el estrés oxidativo durante la infección en mamíferos, y pueden adaptarse perfectamente a las diferentes condiciones metabólicas impuestas durante su ciclo de vida²⁸.

Sin excepción, todos los organismos contienen concentraciones altas de al menos un tiol de bajo peso molecular para el mantenimiento del ambiente intracelular reductor. Aunque en casi todos los casos esto se alcanza a expensas del glutati6n (GSH: forma reducida, GSSG: forma oxidada), algunos organismos utilizan an6logos²⁹. En los tripanosomátidos, el tripanoti6n (T(SH)₂: forma reducida o dihidrotriplanoti6n, TS₂: forma oxidada) reemplaza al glutati6n en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que ocurren a nivel celular. El T(SH)₂ es más reactivo que el GSH, una propiedad fundamentada en su naturaleza diti6lica y en el hecho que a pH fisiol6gico sus cisteínas se hallan en su forma desprotonada, tiolato, la cual es más reactiva para intervenir en reacciones de intercambio tiol-disulfuro³⁰.

El tripanoti6n está formado por dos moléculas de GSH unidas covalentemente a una molécula de espermidina (**Figura 5**) y se sintetiza en dos reacciones dependientes de ATP y catalizadas por enzimas específicas y exclusivas de kinetoplástidos³¹. La primera reacción determina la formación de mono-glutationileespermidina y la segunda da como producto el T(SH)₂. En los tripanosomas africanos ambas reacciones son catalizadas por la enzima tripanoti6n sintetasa²⁵.

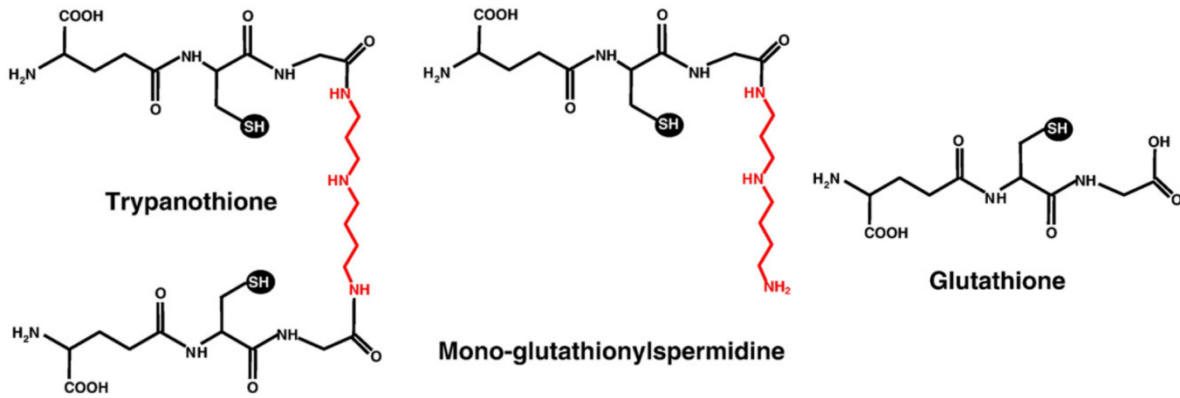


Figura 5. Algunos de los tioles de bajo peso molecular presentes en tripanosomátidos. Se muestran el tripanotión en su forma reducida, la mono-glutationilespermidina (intermediario en el proceso de formación de tripanotión) y el glutatión también en su forma reducida. El tripanotión o bis-glutationilespermidina se compone de dos moléculas de glutatión unidas covalentemente a una de espermidina (en rojo). Tomada y adaptada de²⁸.

El sistema básico con el que cuenta el parásito para mantener su balance redox se completa con la flavoenzima encargada de reducir al TS_2 , la tripanotión reductasa (TR), y una oxidoreductasa, la triparredoxina (TXN), que aporta control catalítico a las reacciones de oxidorreducción dependientes del tripanotión sobre diversos blancos moleculares. Estos parásitos, carecen de genes para la glutatión reductasa (GR) y la tiorredoxina reductasa (TrxR), las cuales son responsables de conservar los distintos tioles celulares en forma reducida. Dado que los tripanosomas carecen de GR y TrxR, la TR es la única enzima capaz de conectar los sistemas del NADPH con el metabolismo redox dependiente de tioles (**Figura 6**).^{28,32}

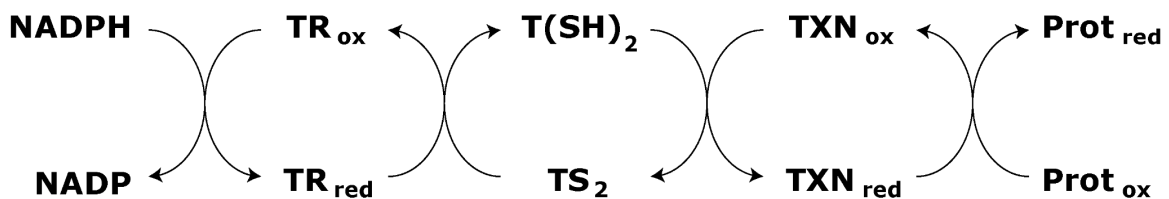


Figura 6. El metabolismo redox dependiente de tioles mediado por tripanotión en tripanosomátidos. Distintas proteínas efectoras obtienen sus equivalentes de reducción de una cascada compuesta por triparredoxina (TXN), tripanotión $[T(SH)_2]$ y tripanotión reductasa (TR) con NADPH como la fuente primaria de electrones. Los subíndices “red” y “ox” hacen referencia al estado redox ditiol o disulfuro, respectivamente de las proteínas. Adaptada de²⁸.

2.5 Generalidades de las 3-mercaptopiruvato azufretransferasas (MSTs)

Las azufretransferasas (STRs) son un grupo de proteínas que catalizan la reacciones de transferencia de átomos de azufre presentes en compuestos de bajo peso molecular a grupos aceptores nucleofílicos³³. Las MSTs o MPSTs (del inglés *mercaptopyruvate sulfurtransferase*) (EC 2.8.1.2) catalizan la transferencia de un átomo de azufre desde el 3-mercaptopiruvato (3MP) hasta una molécula aceptora utilizando un mecanismo ping-pong con dos reacciones consecutivas. Primero, el 3MP (**Figura 7, panel A**) es desulfurado por la enzima para generar piruvato (**Figura 7, panel A**) y un persulfuro (RSSH) en la cisteína del sitio activo. El piruvato es liberado del sitio activo, y en un segundo paso, la enzima facilita la transferencia del átomo externo de azufre del persulfuro a una molécula aceptora, que es liberada, y el sitio activo de la enzima es restaurado (**Figura 7, panel B**). El sitio activo de la enzima previene estéricamente el ataque nucleofílico al átomo interno de azufre, mientras que al mismo tiempo incrementa la electrofilia del átomo externo. Como resultado, el átomo de azufre del persulfuro que es transferido es siempre el externo, contrario a lo que sucede en reacciones con otros persulfuros³⁴.

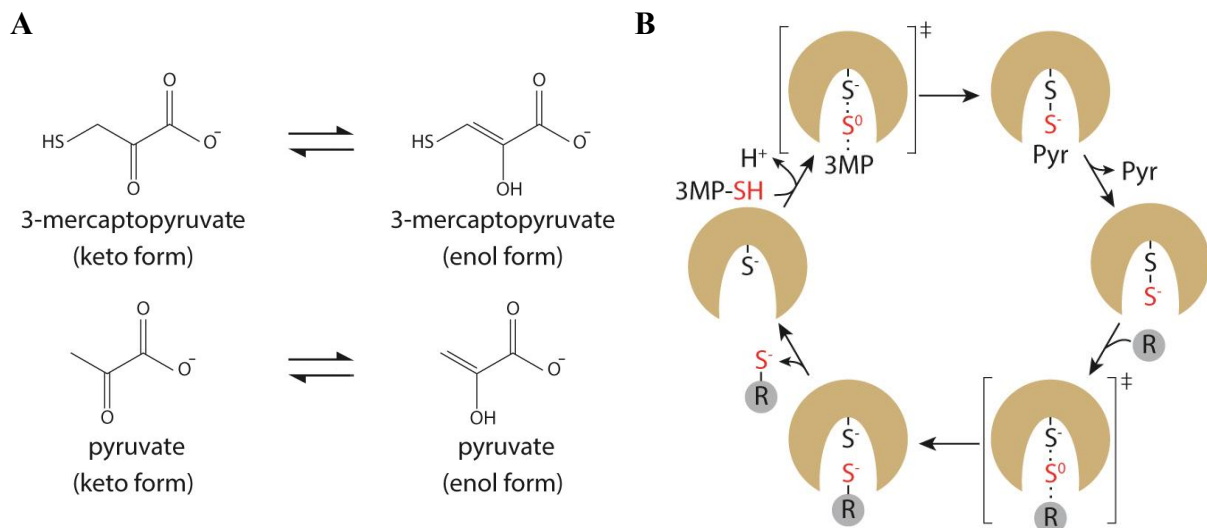


Figura 7. Ciclo catalítico de las MSTs y metabolitos involucrados en el proceso. (A) estructura del 3-mercaptopiruvato y piruvato, en cada caso se muestra el correspondiente equilibrio ceto-enólico. (B) Ciclo catalítico de la MST: el 3MP es desulfurado por parte de la enzima, generando como productos piruvato y un persulfuro en el sitio activo de la enzima. Luego de la liberación del piruvato, la enzima transfiere el azufre externo del persulfuro a una molécula aceptora (R) y el sitio activo se restaura. Tomada y adaptada de³⁴.

Todas las MSTs conocidas contienen dos dominios rodanesa y el sitio activo se encuentra en la interfase de ambos, aunque la mayoría de los residuos involucrados en la catálisis se localizan en el dominio C-terminal^{34,35} (**Figura 8**). Los dominios rodanesa son módulos estructurales ubicuos que poseen una topología central con cinco hojas β rodeadas por cuatro o cinco hélices α ³⁶ y están presentes en una gran variedad de proteínas. Estos dominios pueden identificarse gracias a secuencias aminoacídicas características conocidas como *rhodanese signature*. Sin embargo, en el sentido estricto, las rodanesas o TSTs (del inglés *thiosulfate sulfurtransferase*) (EC 2.8.1.1) son azufretransferasas que catalizan la transferencia de un átomo de azufre desde el tiosulfato al cianuro *in vitro*. Las MSTs comparten características estructurales y funcionales con las TSTs, pero utilizan el 3MP en lugar del tiosulfato como donante específico de azufre para catalizar la reacción de transferencia³⁷. La especificidad de sustrato es atribuible a las diferencias en su sitio activo. En las TSTs, dos residuos básicos en el motivo hexapeptídico Cys-**Arg-Lys**-Gly-Val-Thr suceden a la cisteína catalítica, mientras que en las MSTs, el par Arg-Lys es reemplazado por **Gly-Ser** o **Gly-Thr**. Se ha demostrado experimentalmente que la mutación de estos residuos en particular, transforma parcialmente a la MST en rodanesa y *vice versa*³⁸. En cuanto a la estructura cuaternaria, las MSTs suelen existir como monoméricas³⁸, o en el caso de mamíferos, existir en un equilibrio monómero-dímero. En este último caso, la enzima monomérica es la activa, y la forma dimérica es inactiva.^{39,40}.

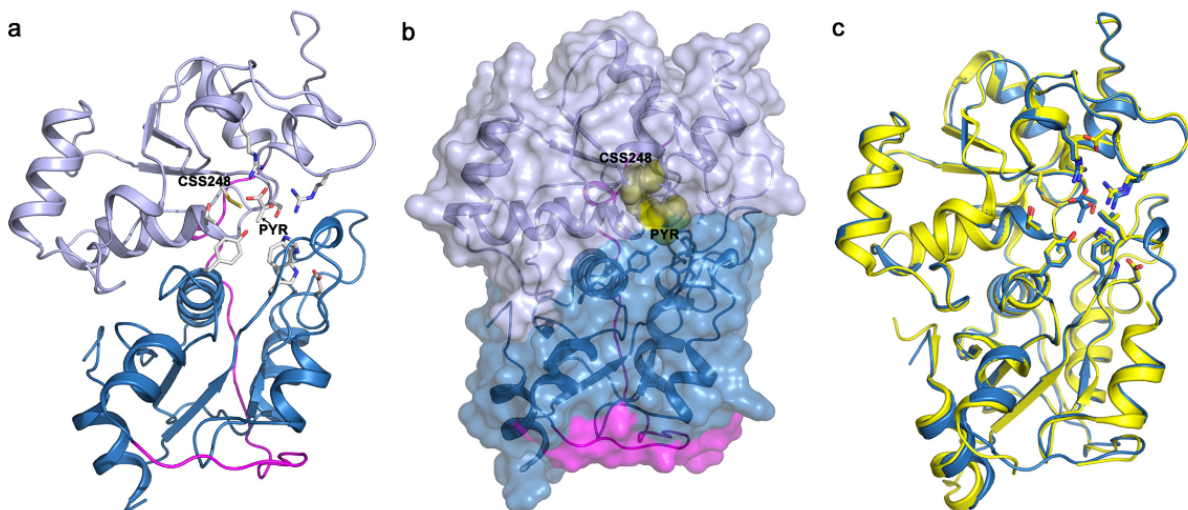


Figura 8. Estructura de la MST humana. (a) Estructura cristalográfica de la MST representada en forma de cinta (dominio N-terminal en azul; dominio C-terminal en lila; región *linker* en magenta). El persulfuro, el piruvato y los residuos aminoacídicos del sitio activo se representan en forma de varillas. (b) Modelo estructural de superficie de la MST, con el persulfuro, piruvato y sitio activo de la enzima en amarillo. (c) Superposición

del esqueleto de átomos de carbono de la enzima con el persulfuro y el piruvato unido (azul) con la enzima sin ligando (amarillo). Los residuos aminoacídicos del sitio activo se muestran con el modelo de varillas. Tomada de⁴¹

Los genes que codifican para las MSTs no parecen estar universalmente conservados: no estaría presente en Archaea, su distribución no es pareja en Eubacteria, y en Eukaryota se encuentra en la mayoría de los filos³⁴. La localización subcelular también varía según el organismo; en mamíferos existen dos isoformas por splicing alternativo del mismo gen, una de localización citosólica y la otra de localización dual citosol-mitocondria³⁴, mientras que en plantas es mitocondrial⁴² y en *Leishmania major*, un tripanosomátido, la MST se localiza en el citosol⁴³.

En mamíferos, una insuficiencia o deficiencia congénita de la actividad de la MST causa un desorden metabólico conocido como mercaptolactato-cisteína disulfiduria⁴⁰. Esta insuficiencia fue descrita por primera vez en 1969, y se caracteriza por una mayor eliminación en la orina del metabolito mercaptolactato disulfuro⁴⁴. Las personas que presentan este desorden además pueden o no presentar otros síntomas como retardo mental u otras alteraciones físicas y del comportamiento. La patogénesis de esta enfermedad se desconoce aún⁴⁵.

2.6 MSTs y su rol en el metabolismo de azufre

El 3MP, primer sustrato de la MST es producido a partir de la cisteína. Una de las tantas vías del catabolismo de este aminoácido, la ruta de desaminación, es la que conduce a la generación de 3MP, y esta es favorecida cuando existe baja disponibilidad de aminoácidos azufrados⁴⁶. La principal fuente celular de 3MP es la transaminación de la L-Cisteína, catalizada por la glutamato-oxalacetato aminotransferasa (GOT), también llamada aspartato aminotransferasa (AST) o cisteína aminotransferasa (CAT)³⁴. GOT es una enzima promiscua dependiente de piridoxal fosfato que cataliza la reacción de transaminación entre pares de aminoácidos y alfa-cetoácidos. Además de catalizar la reacción entre aspartato y α -cetoglutarato para dar glutamato y oxalacetato, puede catalizar la transferencia del grupo amino de la L-Cys al α -cetoglutarato, generando 3MP y glutamato como productos⁴⁷. Dos parálogos se encuentran presentes en todos los eucariotas, GOT1 citosólica y GOT2

mitocondrial³⁴. El 3MP también puede ser sintetizado por desaminación oxidativa de la D-Cisteína, vía la acción de la D-aminoácido oxidasa (DAO)⁴⁸. La DAO a diferencia de la MST se encuentra en el peroxisoma, y se desconoce si el 3MP se mueve entre compartimentos subcelulares³⁴.

La MST es una de las enzimas involucradas en la generación de H₂S, considerada originalmente como una molécula tóxica incluso a bajas concentraciones. Sin embargo, hoy en día se sabe que, en determinado rango de concentraciones fisiológicas, el H₂S cumple funciones como una importante molécula señalizadora⁴⁹. Se encuentra implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos en múltiples tipos celulares y organismos, como la vasodilatación o regulación de la proliferación en algunos tipos celulares en mamíferos^{41,50}, o incluso en la protección contra estrés oxidativo en bacterias y resistencia a antibióticos^{51,52}. Las funciones fisiológicas del H₂S están mediadas por diferentes moléculas blanco, como canales iónicos y otras proteínas señalizadoras⁵³.

Las otras enzimas productoras de H₂S no se encuentran relacionadas, y pueden catalizar funciones metabólicas alternativas. La cistationina β-sintasa (CBS) y la cistationina γ-liasa (CGL) están involucradas en la vía citosólica de transulfuración reversa (RTS, del inglés *reverse trans-sulfuration*), que produce cisteína a partir de homocisteína derivada de la metionina, pero también pueden producir H₂S mediante la catálisis de otras reacciones. La CBS y la CGL producen H₂S empleando de cisteína y/o homocisteína y cistationina respectivamente, como sustratos⁵⁴ (**Figura 9**). El sistema CBS/CGL es considerado como el responsable de la mayor parte de la producción endógena de H₂S. Se ha reportado que la deficiencia de CGL en ratones disminuye la concentración de H₂S endógeno, que concuerda con el importante rol de esta enzima en la producción de esta molécula⁵⁵.

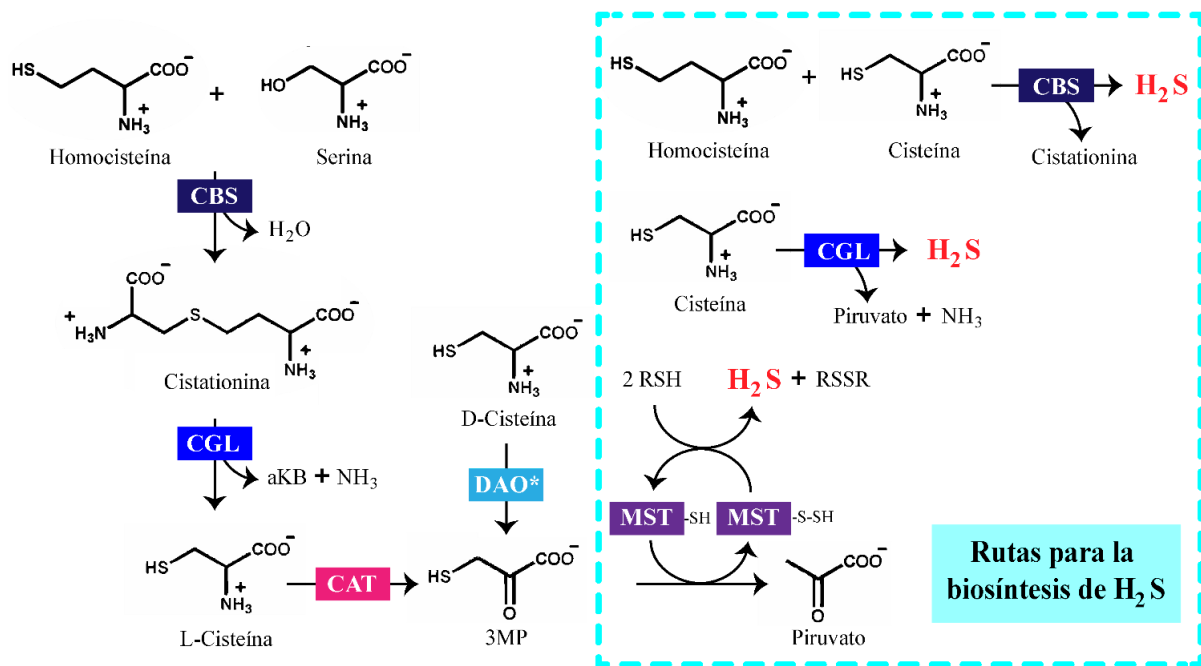


Figura 9. El H_2S puede ser sintetizado por enzimas de la vía de transulfuración reversa, CBS y CGL o por las enzimas del catabolismo de la cisteína, CAT y MST. Las reacciones canónicas catalizadas por la CBS y la CGL implican la conversión de serina y homocisteína a cisteína. Sin embargo, estas enzimas también pueden utilizar cisteína y/o homocisteína y cistionina para generar H_2S mediante diferentes reacciones secundarias (en la figura se muestran algunos ejemplos). La MST también produce H_2S al catalizar la transferencia de un átomo de azufre desde el mercaptopiruvato (3MP) a un ditiol. aKB denota alfa-cetobutirato. *Reacción confinada a los peroxisomas.

En cuanto a los aceptores de azufre de la MST, se han descrito a moléculas como el cianuro, a tioles de bajo peso molecular como L-Cys, GSH o el ácido dihidrolipoico (DHLLA), y también a proteínas que contienen tioles, como la tiorredoxina (Trx) y Mocs3³⁴ (**Figura 10**). Dependiendo de la molécula aceptora, se le atribuyen diferentes roles a la MST. Por ejemplo, se cree que la transferencia del azufre al cianuro funciona como mecanismo de detoxificación, ya que se produce tiocianato, una molécula de menor toxicidad que el cianuro⁵⁶. Por su lado, la transferencia del azufre externo del persulfuro de la MST a ditiolos como DHLLA y Trx, da como resultado un persulfuro, que es rápidamente atacado por el tiol vecino, generando un disulfuro intramolecular y liberación de sulfuro de hidrógeno (H_2S)³⁴, cuya relevancia ya fue descrita. También, a través de la transferencia de un átomo de azufre a la proteína Mocs3, la MST se encuentra relacionada con dos procesos fisiológicos conservados desde levaduras hasta humanos, la urmilación de proteínas y la tiolación de ARN de transferencia (ARNt)⁵⁷. Mocs3, otra azufretransferasa, transfiere el átomo de azufre externo del persulfuro a la proteína Urm1, activándola al formar un tiocarboxilato en su

extremo C-terminal³⁴. Urm1 (*Ubiquitin-related modifier-1*) es una proteína bifuncional, que actúa como un donante de azufre para la tiolación de ARNt y también como un modificador de proteínas en un proceso conocido como urmilación⁵⁷. La tiolación del uracilo en la posición 34 (U34) del ARNt (posición de balanceo del anticodón) para dar 2-tiouridina se encuentra conservada desde el punto de vista evolutivo⁵⁸. Esta modificación se sabe que asegura el descifrado preciso del código genético, además de colaborar en la estabilidad de la estructura del ARNt⁵⁹. Por su lado, la urmilación consiste en la conjugación de la proteína Urm1 a sus proteínas blanco a través de un residuo de lisina. Si bien se desconoce como la urmilación afecta la función de su blanco, se sabe que este proceso es desencadenado por el estrés oxidativo⁵⁷.

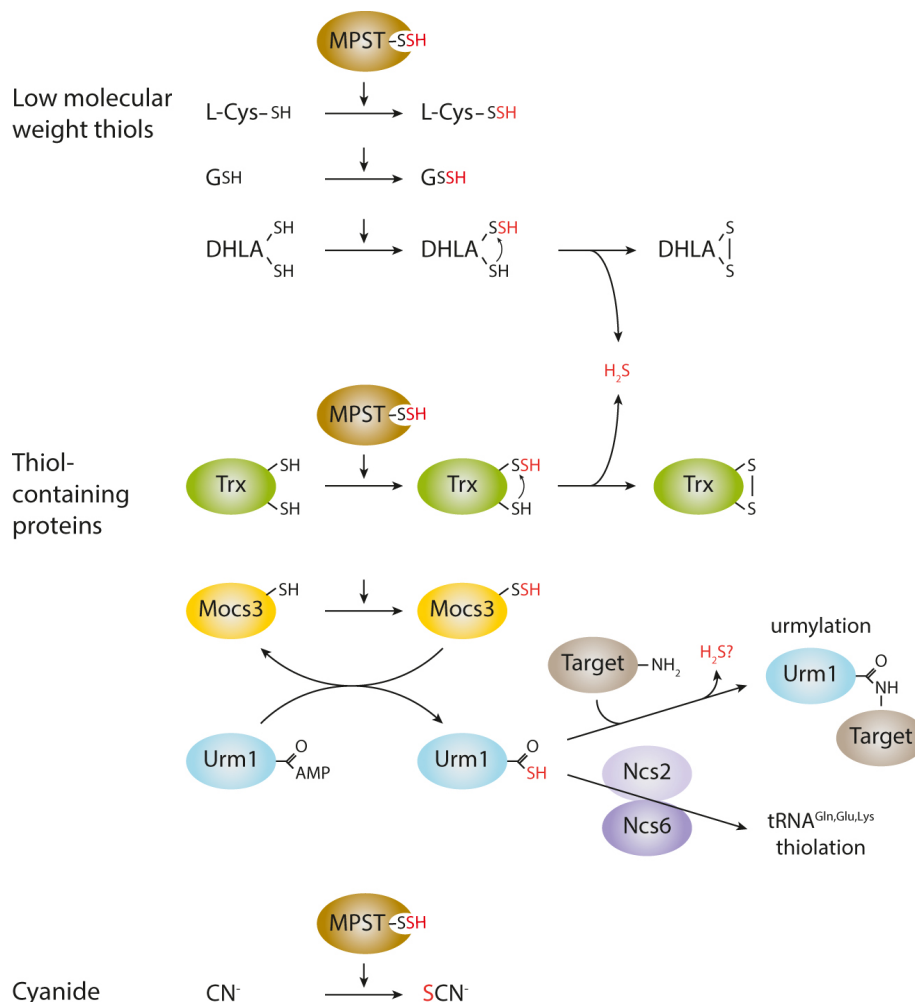


Figura 10. Aceptores de azufre descritos para las MSTs. L-cisteína (L-Cys), glutatión (GSH) y el ácido dihidrolipoico (DHLA) son los tioles de bajo peso molecular más conocidos como aceptores de azufre. Entre las proteínas que contienen tioles, la tioredoxina (Trx) y la azufretransferasa Mocs3 son las únicas conocidas que actúan comoceptoras. En el caso de DHLA y Trx, el persulfuro es rápidamente atacado por el tiol vecino,

conduciendo a la liberación de H₂S y formación de un disulfuro intramolecular. En el caso de Mocs3, el azufre externo del persulfuro es transferido a la proteína Urm1, formando un tiocarboxilato en el extremo C-terminal. Urm1 tiocarboxilada puede participar en la urmilación de proteínas o transferir el sulfuro a tRNAs. El cianuro (CN⁻) también es un aceptor del azufre de la MST, formando tiocianato (SCN⁻) de menor toxicidad. Tomada de³⁴.

2.7 MSTs en tripanosomátidos

2.7.1 Generalidades de la MST de *Leishmania major*

Las MSTs de tripanosomátidos no se encuentran igual de bien caracterizadas como las de mamíferos. Según las anotaciones de los genomas de diferentes tripanosomátidos en la base de datos TrytripDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>), estos organismos poseen una única copia de esta enzima, siendo la MST de *Leishmania major* (*LmMST*) la enzima mejor caracterizada.

Se ha reportado que la *LmMST* es citosólica según ensayos de inmunofluorescencia indirecta y análisis por *Western blot* de fracciones celulares, si bien estos resultados no se muestran en el artículo⁴³. En cuanto a sus características estructurales, cuenta con dos dominios rodanesa como todas las MSTs. Sin embargo, esta enzima posee una característica peculiar que parece compartir solo con las otras MSTs de tripanosomátidos: una extensión C-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos, que forma un dominio C-terminal distintivo, adyacente a los dominios rodanesa (**Figura 11 paneles A y B**). Este dominio sería importante para el plegamiento, dado que proteínas con el dominio C-terminal truncado, presentaron un plegamiento no satisfactorio de acuerdo a estudios de diroísmo circular. Además, estas variantes eran insolubles y carecían de actividad⁴³.

En el mismo trabajo, los autores observaron que en *L. major*, la expresión de la MST aumenta en condiciones de estrés oxidativo. Luego de 24 horas de incubación con oxidantes como hidropéroxido de cumeno, hidropéroxido de tert-butilo y peróxido de hidrógeno, el crecimiento se vió inhibido un 50%, y en presencia del hidropéroxido de cumeno, la expresión de MST aumentó (aunque no se cuantificó el incremento), al igual que su actividad enzimática (el incremento con respecto a la condición control fue de aproximadamente un

50%). De manera similar, el cultivo de este parásito en un medio sin cisteína durante 24 hs también indujo un aumento de la expresión de la MST⁴³.

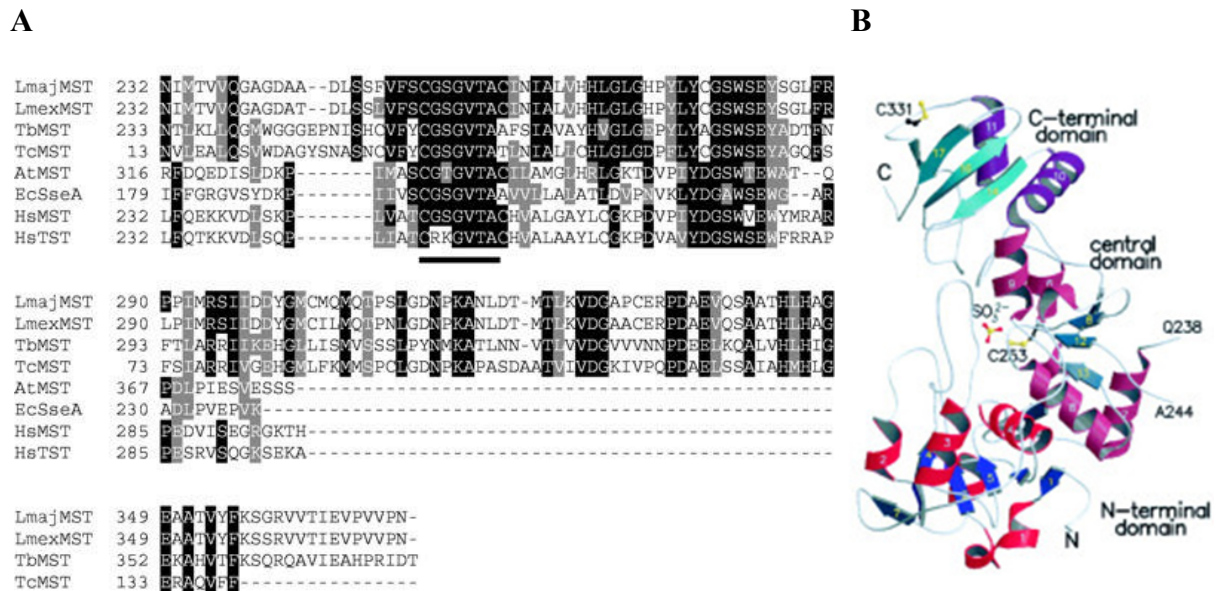


Figura 11. Secuencias y estructura de azufretransferasas (A) Alineamiento parcial de las secuencia aminoacídica de la porción C-terminal de azufretransferasas de diferentes organismos. Se incluyeron las secuencias de las MSTs de: *Leishmania major* (Lmaj), *Leishmania mexicana* (Lmex), *Trypanosoma brucei* (Tb), *Trypanosoma cruzi* (Tc), *Arabidopsis thaliana* (At), *Escherichia coli* (Ec), *H. sapiens* (Hs), además de la secuencia de la TST de *H. sapiens*. El sombreado en negro o en gris indica aminoácidos idénticos o conservados, respectivamente en al menos 4 de las secuencias analizadas. Subrayada se encuentra la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio activo. **(B)** Diagrama de la estructura de la MST de *L. major* (LmMST) obtenida por cristalografía. Se marcan los dominios N-terminal, dominio central y C-terminal. Tomado de^{38,43}.

Así como en mamíferos, un sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, en este caso de *Trichomonas vaginalis*, fue capaz de reducir a la MST de *L. major*⁴³. Esto sugiere que la tiorredoxina de tripanosomátidos, o su equivalente que funciona eficientemente con T(SH)₂, la triparredoxina podrían actuar como sustratos reductores o aceptores nucleofílicos del persulfuro formado en la MST para luego del ciclo catalítico (**Figura 7**) liberar sulfuro de hidrógeno.

2.7.2 MST, procesos relacionados y relevancia fisiológica en tripanosomátidos

El piruvato, uno de los principales productos de las MSTs, es un metabolito central involucrado en muchas vías catabólicas y anabólicas. El destino de este varía drásticamente dependiendo de la especie y su ciclo de vida. En la forma procíclica de *T. brucei*, el piruvato es metabolizado en la mitocondria para producir ATP, mientras que en la forma sanguínea la mayoría del piruvato es producido durante la glicólisis y es excretado y no metabolizado en la mitocondria²⁷. Aún así, el piruvato parece ser un metabolito relevante en la forma sanguínea ya que la producción de acetato a partir de glucosa a través de piruvato importado a la mitocondria es un proceso esencial que alimenta la síntesis de ácidos grasos⁶⁰. Se han descrito dos transportadores de piruvato en la mitocondria de *T. brucei*, *mpc1* y *mpc2*, que se expresan tanto en la forma PF como en BSF, y estos transportadores serían esenciales en la forma BSF⁶¹.

Además de la MST, los tripanosomátidos también poseen genes que codifican para las enzimas de la vía de la transulfuración reversa, CBS y CGL, que producen cisteína a partir de homocisteína derivada de la metionina. A pesar de contar con estas enzimas, en *T. brucei* la cisteína es un nutriente esencial, lo que sugiere que la vía RTS no satisface los requerimientos de cisteína en esta especie. Además de estas enzimas, otros tripanosomátidos como *L. major* y *T. cruzi* cuentan con otras dos, la serina acetil-transferasa (SAT) y la cisteína sintasa (CS), para sintetizar *de novo* la cisteína⁶² (**Figura 12**). Al igual que en mamíferos, las CBSs y CGLs de tripanosomátidos podrían participar de la producción de H₂S catalizando reacciones alternativas. La CBS de *T. cruzi* produce H₂S mediante la condensación de cisteína con homocisteína. Sin embargo, la CGL de este organismo cliva específicamente cistationina en cisteína, y no es capaz de producir H₂S⁶³.

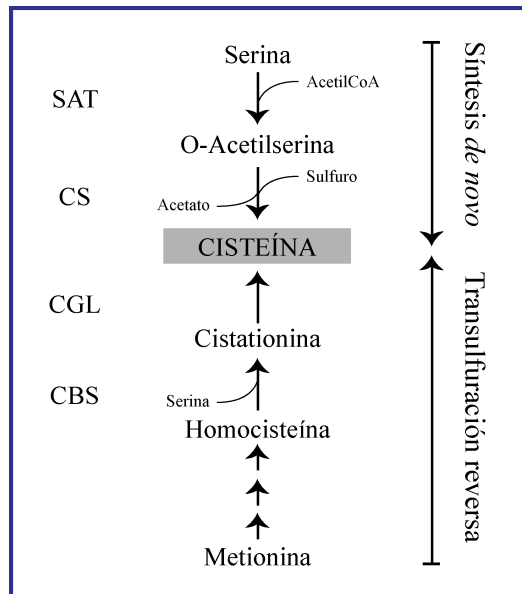


Figura 12. Esquema simplificado de la síntesis de cisteína en diferentes tripanosomátidos. *T. brucei* posee los genes que codifican para CGL y CBS que participan en la vía de la transulfuración reversa, pero aún así la cisteína es un nutriente esencial que debe ser incorporado del medio extracelular. *L. major* y *T. cruzi* poseen además la vía de síntesis *de novo* de cisteína que depende de las enzimas SAT y CS. Adaptada de⁶²

Otra proteína relacionada con la MST es Urm1, que también se encuentra en tripanosomátidos. De hecho, un ortólogo de Urm1 existe en todos los protozoarios, pero sus funciones en estos organismos se desconocen⁶⁵. En *Leishmania donovani*, se han identificado blancos putativos de esta proteína. Estas proteínas urmiladas incluían proteínas asociadas al tráfico vesicular mediado por endosomas, y también a proteínas del citoesqueleto. Urm1 es esencial para el crecimiento de *L. donovani*⁶⁶.

3. Materiales y métodos

3.1 Amplificación y clonado de la *TbMST* en un vector T

A partir del ADN genómico de *T. b. brucei* (cepa 427) disponible en el laboratorio, se amplificó por PCR la secuencia codificante de la *TbMST* y posteriormente se clonó en un vector T, usando cebadores específicos para la MST (ver **Anexo 1**) previamente diseñados por Marcelo Comini y sintetizados por IDT. Para el diseño de cebadores, se tomó como referencia la secuencia codificante de la *TbMST* incluida en la base de datos TriTryp DB⁶⁷ (ver **Anexo 2**).

La composición de la mezcla de PCR (volumen de reacción 20 μ L) fue la siguiente: 200 μ M de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,5 μ M de cada cebador, 40 ng de ADN genómico, 1 U de Pfx50 ADN polimerasa (Invitrogen) y su correspondiente amortiguador a concentración 1X. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos, seguido de treinta ciclos de a) desnaturalización a 98°C por 10 segundos, b) hibridación a 59°C o 62°C por 30 segundos y c) extensión a 72°C por 30 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de las reacciones de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en amortiguador TAE 0,5X (20 mM Tris base pH 8.0, 20 mM ácido acético y 0,5 mM EDTA), y los amplicones fueron purificados a partir de bandas de agarosa mediante kit comercial (PureLink™ Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se adicionaron adeninas en los extremos 3' del producto de PCR para permitir el clonado en el vector T. Para esto, se utilizó 7 μ L producto de PCR, amortiguador 1X(-) MgCl₂, 4 mM MgCl₂, 200 μ M dATP y 5 U Taq polimerasa (Invitrogen), incubándose a 72°C por 30 minutos. El producto resultante se ligó al vector pCR2.1-TOPO (TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning, without competent cells, Invitrogen) incubando a temperatura ambiente por 30 minutos 5 μ L del producto con adeninas en los extremos, 1 μ L de solución salina y 1 μ L del vector.

A continuación, se transformaron 50 μ L de células quimiocompetentes comerciales (Subcloning efficiency DH5 α Competent Cells, Invitrogen) con 3 μ L de la mezcla de ligación

descrita anteriormente. Se incubaron las células con el ADN en hielo por 30 min, posteriormente se realizó un shock térmico a 42°C durante 20 segundos, y se volvió a incubar la mezcla 2 minutos más en hielo. Se agregaron 950 µL de medio SOC (Triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 3,6 g/L, KCl 0,186 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl₂ 0,96 g/L) y se incubó 1 hora a 37°C en agitación a 225 rpm. La transformación se plaqueó en LB-agar (10 g/L Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl) con kanamicina (50 µg/mL) al cual se le había agregado previamente 32 µL de una solución 50 mg/mL de X-gal, para permitir la selección blanco-azul por el sistema de complementación en alfa, y se incubaron toda la noche (O/N) en estufa a 37°C.

Posteriormente se pasó por un paso de amplificación a partir de 11 colonias blancas con el fin de realizar un cribado inicial para detectar colonias que contengan el plásmido con el inserto de interés. A partir de un cultivo para cada una de estas colonias se realizó una PCR con las siguientes condiciones (10 µL de reacción): 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 0,5 µM de cada cebador (los mismos utilizados para la primera PCR), 1 µL del cultivo, 1,5 mM de MgCl₂, 4 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y su correspondiente amortiguador sin MgCl₂ a concentración 1X. El programa de PCR consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de a) desnaturalización a 94°C por 45 segundos, b) hibridación a 56°C por 30 segundos y c) extensión a 72°C por 100 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en amortiguador TAE 0,5X.

A partir de 5 de los 11 cultivos generados anteriormente, se realizó la extracción y purificación del ADN plasmídico usando un kit comercial (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen). El plásmido se secuenció en el Institut Pasteur de Montevideo utilizando los cebadores M13 (directo y reverso), luego de verificar con enzimas de restricción la identidad del inserto, su tamaño y la direccionalidad del mismo. Para esto, se utilizaron las enzimas de digestión EcoRI (Thermo) y HindIII (Roche) y el patrón de digestión fue analizado por electroforesis en gel de agarosa en las mismas condiciones descritas anteriormente.

3.2 Diseño de construcciones

Todas las construcciones utilizadas fueron diseñadas especialmente para este trabajo, y fueron sintetizadas o los insertos sub-clonados por la compañía GenScript.

3.2.1 Construcción para la expresión de *TbMST* en *Escherichia coli*

El vector de expresión utilizado fue pET-Trx1b, derivado de pETM20, desarrollado por el Dr. Günther Stier (EMBL-Heidelberg, Alemania)²⁵. Un inserto conteniendo la secuencia nucleotídica de la *TbMST* fue clonada en fase con la Trx de *E. coli* ya presente en el esqueleto del plásmido, utilizando los sitios 5' NcoI y 3' KpnI (**Figura 13**). Para poder clonar con la enzima NcoI y no duplicar la metionina inicial, se modificó ligeramente el inicio del marco abierto de lectura, eliminándose el segundo aminoácido, una histidina (ver **Anexo 3**). Como resultado, este vector permite la expresión de *TbMST* como proteína de fusión conteniendo la Trx de *E. coli* en N-terminal. Entre ambas proteínas, existe una cola de histidina para la purificación, seguida de un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp), que permite obtener la proteína de interés libre de fusión y de cola de histidinas.

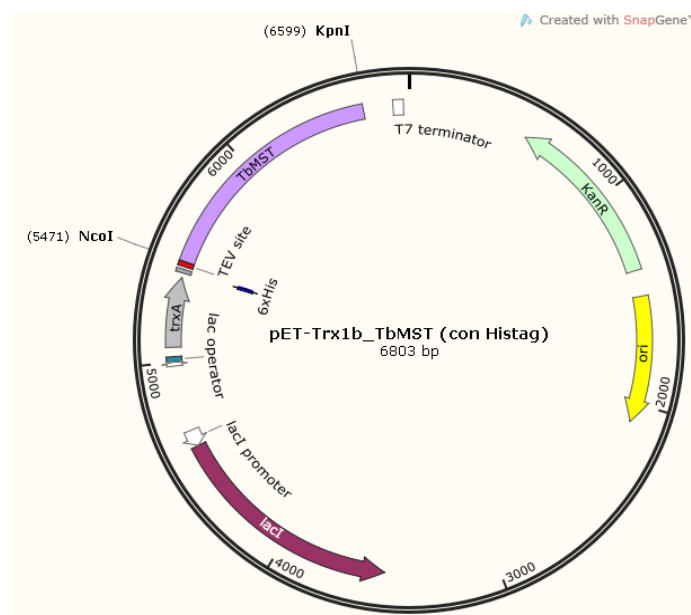


Figura 13. Plásmido de expresión en *E. coli* pET-Trx1b_TbMST (con histag) y sus componentes. Se muestra la proteína de fusión (TrxA-TbMST). Además, se esquematizan el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV, la cola de histidinas, el gen lacI (represor lac) y su promotor, el operador lac, el promotor T7 y su terminador, el origen de replicación (ori), el marcador de selección (gen de resistencia a kanamicina) y los sitios de corte de las enzimas de restricción NcoI y KpnI.

3.2.2 Construcción para la sobreexpresión de TbMST en *T. b. brucei*

Para la sobreexpresión de la TbMST, se empleó el vector pHD 1700 de expresión en *T. brucei*, cedido gentilmente por la Dra. Christine Clayton (ZMBH, Heidelberg, Alemania). Un inserto conteniendo la secuencia codificante de la TbMST modificada en el inicio del marco abierto de lectura como se describe en la subsección anterior y sin el codón stop se introdujo en el vector usando las enzimas HindIII y BamHI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Luego de la secuencia proteica, en el mismo marco abierto de lectura, existe una doble etiqueta de c-myc, que permite la inmunodetección con un anticuerpo específico para este tag (ver secuencia en el Anexo 4). La expresión génica se encuentra bajo el control del promotor PARP (*procyclic acidic repetitive protein*), endógeno de *T. b. brucei*^{68,69} e ingenierizado para ser inducible por tetraciclina⁷⁰ (Figura 14).

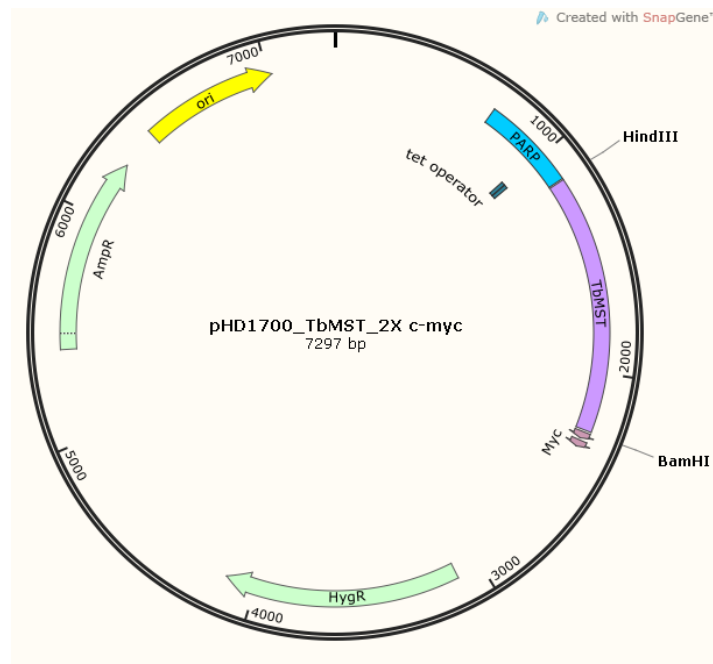


Figura 14. Plásmido de expresión en *T. brucei* pHD 1700_TbMST_2X c-myc y sus componentes. Se muestran los genes que otorgan resistencia a ampicilina e higromicina, el origen de replicación (ori), el promotor

PARP inducible por tetraciclina, el operador Tet, la *TbMST* seguida de las etiquetas de c-myc y los sitios de corte de las enzimas de restricción HindIII y BamHI.

3.2.3 Construcción para silenciamiento de *TbMST* en *T. b. brucei* mediante ARNi

La construcción que se diseñó fue de tipo tallo-bucle (shRNAi), a modo de expresar una molécula de ARN que contenga una porción de la secuencia codificante de *TbMST* (sentido) separada por un bucle de su secuencia complementaria y antiparalela (antisentido). Está reportado que los tallos de los shRNAi que van desde 100 pb a más de 1500 pb son los más eficientes en el silenciamiento por ARNi en tripanosomátidos⁷¹, por lo que en este caso se generó uno de 250 pb (ver **Anexo 5**). El vector utilizado fue el pHD677 de expresión en *T. brucei*, cedido gentilmente por la Dra. Christine Clayton (ZMBH, Heidelberg, Alemania). El fragmento de ADN conteniendo esta secuencia se insertó usando las enzimas HindIII y HpaI en los sitios 5' y 3' respectivamente. La transcripción del shRNAi se encuentra bajo el control de un promotor PARP, inducible por tetraciclina (**Figura 15**) tal como se mencionó antes para el vector pHD 1700.

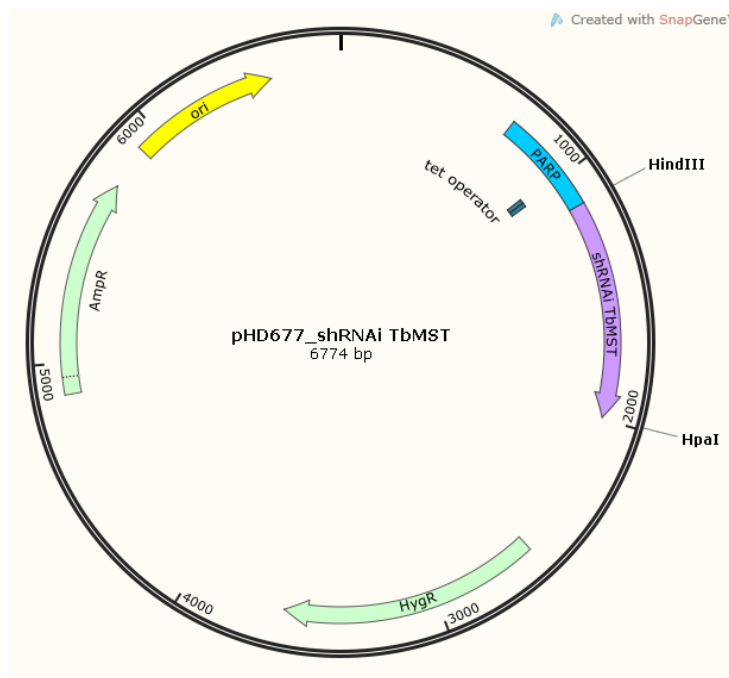


Figura 15. Plásmido para expresión en *T. brucei* pHD 677_shRNAi *TbMST* y sus componentes. Se muestran los genes que otorgan resistencia a ampicilina e higromicina, el origen de replicación (ori), el promotor PARP inducible por tetraciclina, el operador Tet, la secuencia shRNAi *TbMST* y los sitios de corte de las enzimas de restricción HindIII y HpaI.

3.3 Expresión en *E. coli* y purificación de la *TbMST* recombinante

3.3.1 Expresión de la *TbMST* recombinante en *E. coli*

Para la expresión de la forma recombinante de *TbMST* se usaron las cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) y BL21 CodonPlus (Agilent). Esta última contiene copias extra de algunos tRNAs de uso poco frecuente en *E. coli* en un plásmido, con el fin de mejorar la eficiencia de la producción de proteínas heterólogas en este organismo.

Las células quimiocompetentes fueron preparadas en el laboratorio usando el método descrito en⁷². Para esto, se crecieron colonias en placas de Petri con LB-agar (10 g/L Triptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl y 15 g/L agar), se tomó una de las colonias con el extremo de una punta para micropipeta y se subcultivó en 10 mL de medio LB con incubación O/N a 37°C. Luego, 500 µL de este cultivo se transfirieron a 50 mL del mismo medio y se incubó a 37°C con agitación vigorosa y se monitoreó la absorbancia a 600 nm. Al alcanzar una absorbancia de 0,4, el cultivo se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente, las células se cosecharon mediante centrifugación a 1.000 g por 10 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 25 mL de medio LB frío usando agitación suave. La suspensión celular se centrifugó a 1.000 g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 mL de solución fría de TSS (*transformation and storage solution*: 50 mM MgSO₄, 5% (v/v) DMSO y 10% (p/v) PEG) en medio líquido LB por agitación suave. Esta suspensión se centrifugó a 1.000 g por 10 minutos a 4°C y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio LB y se repartió la suspensión resultante en alícuotas de 50 µL, que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La forma quimiocompetente de cada cepa fue transformada con el plásmido de expresión de *TbMST* (en una relación de 0,4 µg ADN/50 µL de bacterias) mediante incubación en hielo de 30 minutos, seguida de un shock térmico (90 segundos a 42°C) y la posterior resuspensión en 200 µL de medio de cultivo SOC. La mezcla de transformación fue incubada 60 minutos a 37°C con agitación para permitir su recuperación y la expresión del gen de resistencia a ampicilina, y luego sembradas sobre placas de LB agar conteniendo kanamicina 50 µg/µL. La cepa BL21 CodonPlus fue cultivada además en presencia del antibiótico cloranfenicol (34 µg/µL) para que las células mantengan el plásmido que codifica para los tRNA.

A partir de 2 de las colonias obtenidas, se inoculó un precultivo de 10 mL en medio 2YT con kanamicina o kanamicina y cloranfenicol, según corresponda. El precultivo fue incubado a 37°C O/N y a 220 rpm. Al día siguiente, utilizando una dilución 1/100 de los precultivos se escaló cada uno de ellos a 2 matraces de 2 L conteniendo 700 mL de medio 2YT y los antibióticos correspondientes. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,8 se procedió a la inducción de la expresión de la proteína de interés. Para este propósito, se agregó IPTG a concentración final 700 µM y se incubó a 15°C O/N a 150 rpm. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5.000 g durante 20 minutos a 4°C y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su uso. Luego, el pellet se resuspendió en el amortiguador de lisis (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,4 suplementado con inhibidores de proteasas (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante y 1 mg/mL de lisozima) a razón de 5 mL/g de pellet celular.

A esta suspensión se la trató con ADNasa (Invitrogen) 95 U/mL y 10 mM de MgCl₂ para el correcto funcionamiento de la ADNasa. Luego, se procedió a la disrupción celular mediante tres ciclos de sonicado en baño de hielo (Sonicador Branson 450, EUA) con descansos en hielo entre cada uno. Cada ciclo consiste en un programa de 1 segundo ON y 1 segundo OFF hasta alcanzar 2 minutos totales en modo ON, empleando el macrotip al 40% de potencia. Posteriormente, se realizaron dos centrifugaciones sucesivas a 30.000 g por 20 minutos a 4°C, conservando en ambas el sobrenadante. Para finalizar, se llevó a cabo una un análisis por SDS-PAGE al 10% para evaluar la distribución de proteínas entre la fracción soluble e insoluble.

3.3.2 Purificación de la *Tb*MST recombinante

Para purificar la proteína de interés de la fracción soluble, se filtró con un filtro de 0,22 µm el sobrenadante obtenido de la última centrifugación y se cargó en una columna para cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) conteniendo 1 mL de resina con iones níquel inmovilizados (HisTrap™ Fast Flow, Cytiva), previamente equilibrada con amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,4). La columna fue primero lavada con 10 volúmenes de columna de amortiguador A y luego con 15 volúmenes de columna de amortiguador de lavado (amortiguador A conteniendo 20 mM

de imidazol). La proteína fue eluida con 5 volúmenes de columna de amortiguador B (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM, 500 mM imidazol pH 7,4) en fracciones de 500 μ L. En todas las etapas se mantuvo un flujo de 1 mL/min. Estas fracciones fueron posteriormente diluidas al medio en amortiguador A dado que se observó turbidez en los tubos cuando fueron dejados a temperatura ambiente gracias a que la proteína había comenzado a precipitar.

Luego de la primera ronda de purificación, se eliminó el imidazol del amortiguador en el que se encontraba la proteína, utilizando una columna de desalado PD-10 (Cytiva), y amortiguador A. Para la remoción de los tags, la proteína se incubó con TEVp recombinante que posee cola de histidina, obtenida y producida anteriormente en el laboratorio según indica²⁵. Previo a la incubación se centrifugaron las fracciones a 16.000g por 10 minutos a 4°C para eliminar el posible precipitado. Luego, se añadió 1,5 mg de TEV cada 35 mg de proteína presente en la muestra medido por absorbancia a 280 nm junto con EDTA 2 mM y DTT 5 mM. La digestión se llevó a cabo a 4°C O/N.

En el caso de la segunda purificación, se siguieron los mismos pasos que para la primera, salvo que la proteína en este caso fue colectada en la fracción no unida con amortiguador A, en alícuotas de 500 μ L. Posteriormente, estas fracciones fueron filtradas en esterilidad empleando un filtro de 0,22 μ m y almacenadas a 4°C o -20°C hasta su uso. La identidad y pureza de la proteína de interés fue confirmada SDS-PAGE al 10%.

3.3.3 Cuantificación de la *TbMST* recombinante

La cuantificación de la *TbMST* se realizó mediante la absorbancia a 280 nm, cuyo coeficiente de extinción molar fue obtenido a través de la herramienta ProtParam de la página web ExPASy (coeficiente de extinción molar = 60.445 $M^{-1}cm^{-1}$ ó 59.820 $M^{-1}cm^{-1}$ asumiendo que todas las cisteínas se encuentren oxidadas o reducidas respectivamente). A su vez, se realizó una confirmación mediante cuantificación por el método de ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo).

3.4 Caracterización bioquímica de la *TbMST* recombinante

Todos los ensayos de caracterización *in vitro* de la proteína fueron realizados con la *TbMST* recombinante expresada en *E. coli* BL21 CodonPlus en nuestro laboratorio y purificada por el Dr. Ernesto Cuevasanta (Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, UdelaR).

3.4.1 Ensayos de actividad enzimática

Para estudiar la actividad de la *TbMST* recombinante se utilizó un método basado en⁴³ pero con modificaciones. En un primer paso se incubó la enzima (0,15 μ M en Tris 0,5 M pH 8,0) con 3-mercaptopiruvato como donante de azufre (5 mM), y con cianuro (CN^-) como aceptor de azufre (25 mM) a 37°C. La reacción ocurre en dos pasos como muestra la **Figura 16**. Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción conteniendo a la enzima y los sustratos, a los 2, 5 y 10 min para agregar a una mezcla conteniendo formol 4,4% (v/v), FeCl_3 10 mM y HNO_3 8.5% (v/v) (concentraciones finales) y se dejó incubando por 15 minutos. En estas condiciones, se da la formación de un complejo coloreado (FeSCN^{2+} , tiocianato de hierro (III)) que tiene un máximo de absorbancia a 460 nm y se cuantificó por espectrofotometría. En paralelo, se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de tiocianato de potasio, siguiendo el mismo procedimiento y condiciones que para la segunda incubación del ensayo enzimático.

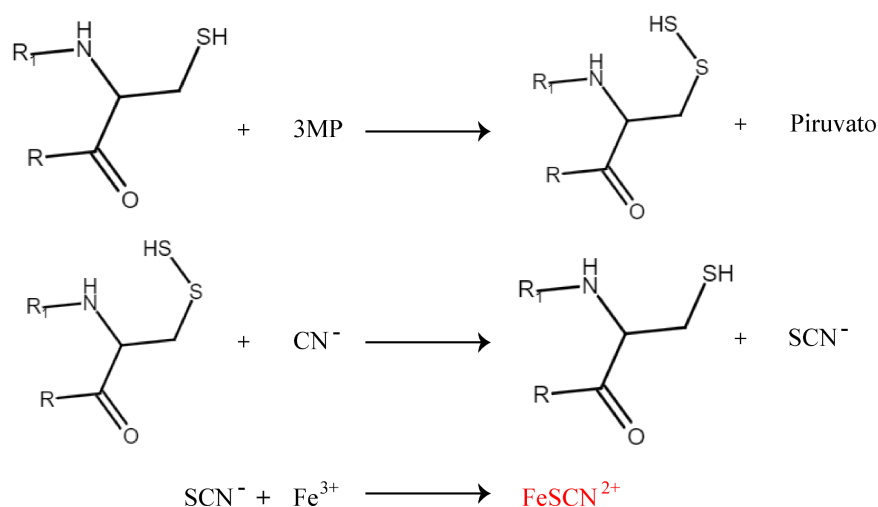


Figura 16. Esquema de las reacciones que ocurren en el ensayo enzimático utilizado en el trabajo para caracterizar a la *TbMST*. Se muestra desde la transferencia del azufre a la enzima por parte del

3-mercaptopiruvato hasta la formación del complejo tiocianato de hierro (III) coloreado, que posee un máximo de absorbancia a 460 nm.

3.4.2 Cromatografía de exclusión molecular

Previo a la cromatografía, la proteína fue centrifugada a 16.000g por 15 minutos a 4°C. Se realizaron dos inyecciones en la columna Superdex 75 10/300 GL (Cytiva) con 160 µL de la *TbMST* recombinante a concentración 105 µM. En primera instancia se equilibró la columna con agua y luego con amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 300 mM pH 7,4) , ambas filtradas por 0,22 µM. La elución se realizó con amortiguador A. Se empleó un equipo de cromatografía líquida ÄKTA (GE) con detección UV-visible en línea a 280 nm y se colectaron fracciones de 1 mL en placa “Deep well” de 96 pocillos. La cromatografía fue asistida por la Dra. Claudia Ortega (Unidad de Proteínas Recombinantes, Institut Pasteur de Montevideo).

3.5 Producción de anticuerpos anti-*TbMST* en ratón

Los procedimientos con animales (inoculaciones y extracciones) fueron realizados por la MSc. Paula Arévalo en el bioterio de la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio del Institut Pasteur de Montevideo, bajo un protocolo de experimentación (005-21_Protocolo Ac policlonales) aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del mismo instituto.

Para la generación de anticuerpos específicos anti-*TbMST* (**Figura 17**), 3 ratones Balb/cJ (6-8 semanas) se inmunizaron con 200 µL de una emulsión 1:1 de *TbMST* recombinante (aproximadamente 100 µg), expresada purificada a partir de BL21 (DE3) y adyuvante completo de Freund (Sigma). Se administraron tres dosis de refuerzo, con igual cantidad de proteína en una mezcla 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) a los días 17, 31 y 45. Cada semana post-inyección para el priming y los dos primeros boosters se extrajo una muestra de sangre de cada ratón por punción submandibular para evaluar por *Western blot* la capacidad de detección de la proteína de interés por parte de los sueros. A los 52 días de la

inmunización se efectuó el sangrado final, previa anestesia total de los animales. Los animales fueron inmediatamente sacrificados por dislocación cervical.

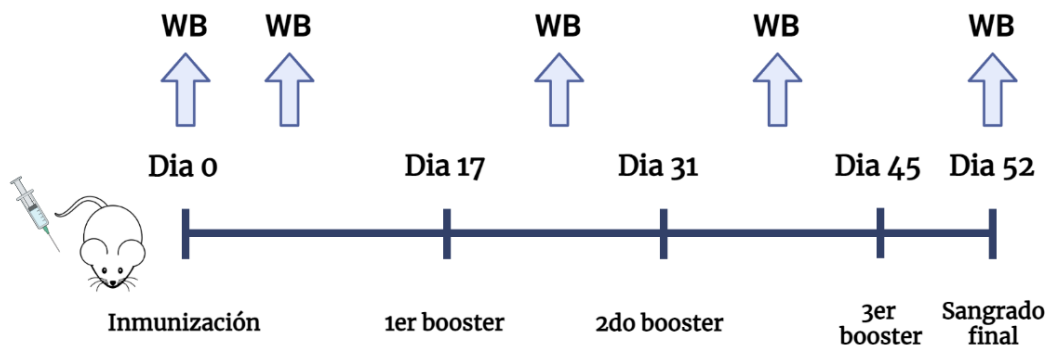


Figura 17. Esquema de inmunización empleado para la generación de un suero anti-*Tb*MST. Las inoculaciones se efectuaron los días 0, 17, 31 y 45. Se realizaron extracciones de sangre y Western blot para evaluar la capacidad de detección de los sueros a los días 0, 7, 24, 38 y 52.

Para la preparación de los sueros, la sangre fue incubada 45-60 minutos a temperatura ambiente para permitir la coagulación. Luego se sometió a dos rondas de centrifugación consecutivas a 500 g por 5 minutos a temperatura ambiente, conservando en ambos casos el sobrenadante.

3.6 Cultivos celulares de *T. b. brucei*

En este trabajo se utilizaron como líneas parentales tres líneas monomórficas modificadas de la forma sanguínea de *T. b. brucei* cepa 427. Por un lado, la línea 449 (transfectada con pHD 449) la cual tiene integrada en su genoma una copia de la secuencia codificante de la proteína represora de tetraciclina (TetR) bajo el control de un promotor endógeno. Por otro lado, 514-1313 que posee dos copias de dicha secuencia integradas en su genoma (plásmido pHD 1313), además de la secuencia codificante para la expresión de la T7-ARN polimerasa bajo el control de un promotor endógeno (plásmido pHD 514)⁷³. Estas líneas fueron gentilmente cedidas por la Dra. Christine Clayton (ZMBH, Heidelberg, Alemania). También se utilizó la línea 514-1313 LUC, modificada de 514-1313. 514-1313 LUC posee integrado en su genoma un fragmento de ADN que permite la expresión constitutiva de la luciferasa de *Photinus pyralis*⁷⁴, que da lugar a bioluminiscencia luego de la reacción con la luciferina, y su generación se describe en⁷⁵.

Los cultivos se realizaron en medio HMI-9 completo, compuesto por Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM - Invitrogen) suplementado con bactocuproína 28,2 µg/mL, timidina 39 µg/mL, hipoxantina 0,136 mg/mL, L-cisteína 0,182 mg/mL, β-mercaptoetanol 0,143 M, 10% (v/v) de suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum certified United States, Gibco) y penicilina-estreptomina 10 U/mL y 10 µg/mL respectivamente. La incubación se realizó en condiciones aeróbicas en estufa húmeda con temperatura de 37°C y 5% de CO₂. En el caso de la línea 449 se adicionó al medio de cultivo bleomicina 0,2 µg/mL, mientras que en el caso de la línea 514-1313 se adicionó al medio de cultivo geneticina (G418) 2,5 µg/mL además de bleomicina 0,2 µg/mL. A la línea 514-1313 LUC se le agregó al medio de cultivo bleomicina 0,2 µg/mL, geneticina 0,4 µg/mL y puromicina 0,8 µg/mL. Para las líneas transgénicas se utilizó higromicina 5 µg/mL como antibiótico de selección.

Los recuentos de parásitos se realizaron en cámara de Neubauer diluyendo los cultivos en amortiguador fosfato salino (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM y KH₂HPO₄ 1,76 mM pH 7,4) con glucosa al 1% (p/v) (PBS-G) inmediatamente antes de su conteo, considerándose como células viables aquellas que tenían movilidad y eran morfológicamente normales.

Para la generación de criostocks se cosecharon cultivos en fase de crecimiento exponencial por centrifugación a 2.000 g por 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron de forma tal de obtener 10 millones de parásitos en 1 mL de medio de cultivo HMI-9 completo con glicerol 10% v/v y con los antibióticos correspondientes. Los criotubos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.6.1 Inducción *in vitro* de la sobreexpresión de *TbMST* o del sistema ARNi

Los ensayos de inducción de las líneas transgénicas fueron llevados a cabo tanto en modo de crecimiento continuo como en modo de repiques cada 24 horas. Cada 24 horas se realizó el recuento de densidad celular y se agregó oxitetraciclina (OXITET (Oximic, Laboratorios Microsules), de aquí en adelante se nombrará como tetraciclina (TET)) a una concentración final de 1 µg/mL como inductor. En todos los experimentos se incluyeron como control a las mismas líneas celulares no inducidas con tetraciclina.

3.6.2 Efectos del estrés oxidativo e inhibidor de la MST en el crecimiento de la línea shRNAi *TbMST*

Los parásitos en fase de crecimiento exponencial de la línea shRNAi *TbMST* fueron cultivados por 24 horas, comenzando en una densidad celular de 3×10^5 parásitos/mL en las siguientes condiciones (a) control, sin agregado de un agente oxidativo, (b) agregado de 20 μM de peróxido de hidrógeno, (c) agregado de 1 μM de hidroperóxido de cumeno, o (d) agregado de 5 μM de un inhibidor de MST (I3-MT-3)⁷⁶. Para todas las condiciones, se cultivaron en paralelo 2 botellas del mismo clon shRNAi *TbMST*, una sin tetraciclina, y otra con una concentración final de tetraciclina de 1 $\mu\text{g/mL}$.

3.7 Transfección de líneas celulares de *T. b. brucei*

Para la transfección, se cosecharon aproximadamente 30 millones de parásitos de la línea celular deseada en fase de crecimiento exponencial media por centrifugación a 2000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizó un lavado utilizando un volumen similar al de partida con Cytomix (120 mM KCl, 0.15 mM CaCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl_2) y los parásitos se resuspendieron en 100 μL de solución de nucleofección preparada fresca (combinando 81,8 μL de Basic Parasite Nucleofector Solution 1 con 18,2 μL de Supplement 1, correspondientes al kit Basic Parasite Nucleofector Kit 1, Lonza). Se agregaron 5 μL de la construcción de ADN elegida (2 μg en total), previamente linealizada (incubación O/N a 37°C de la construcción de ADN con la enzima de restricción NotI-HF (New England Biolabs) y su correspondiente amortiguador) para favorecer su integración por recombinación homóloga y concentrada por precipitación con acetato de sodio e isopropanol y resuspendida en agua. La mezcla ADN/parásitos se colocó en una cubeta de electroporación (Lonza) de 2 mm y se aplicó el programa de electroporación X-001 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). Posteriormente, la mezcla de transfección se transfirió a 30 mL de medio de cultivo HMI-9 completo conteniendo los antibióticos correspondientes a la cepa parental y se realizaron dos diluciones seriadas 1:10 en un volumen final de 30 mL con el mismo medio de cultivo fresco (Placas A, B y C en orden de dilución). Con el fin de realizar selección clonal, las tres preparaciones se distribuyeron en tres placas distintas de 24 pocillos (1 mL por pocillo). Luego de 24 hs, se adicionó 1

mL/pocillo de medio de cultivo fresco suplementado con el antibiótico de selección al doble de la concentración descrita anteriormente de modo tal de obtener una concentración final 1X deseada. Los clones viables fueron repicados en medio de cultivo fresco conteniendo todos los antibióticos correspondientes. Luego, se criopreservaron cada uno de estos clones de acuerdo al procedimiento descrito en la sección anterior.

3.8 Inmunoensayos

3.8.1 Cosecha de parásitos

Una cantidad suficiente de parásitos en la fase de crecimiento deseada para cada caso fueron cosechados mediante centrifugación a 2.000 g por 10 min a temperatura ambiente. El pellet fue lavado dos veces con un volumen de PBS-G igual al volumen de partida. Tras el último lavado, el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS-G y se volvió a centrifugar. El volumen restante fue centrifugado en minífuga aproximadamente un minuto y se retiró el sobrenadante dejando solamente el mínimo volumen necesario para la resuspensión del pellet. Por último, se procedió al recuento celular en cámara de Neubauer y las muestras se acondicionaron para su posterior análisis por inmunofluorescencia o Western blot.

3.8.2 Western blot

Se prepararon las muestras de parásitos a modo de obtener 5 millones de parásitos en 20 μ L. Para esto, a la cosecha de parásitos se agregó amortiguador muestra 1X (preparado al 5X: Tris-Cl 250 mM pH 6,8, con 8 % (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS), 40 % (v/v) glicerol, 100 mM ditiotreitól (DTT) azul de bromofenol al 0,1% (p/v)) y PBS (cantidad necesaria para completar el volumen deseado). La muestra se calentó en un termobloque a 100°C por 5 min, se centrifugó en minífuga por 5 min y se guardó a -20°C hasta su uso. El extracto de proteína fue separado por SDS-PAGE al 12% y electrotransferido a una membrana de PVDF a corriente constante (450 mA) durante 3 hs en baño de hielo. Luego de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas en PBS con 4% (p/v) de leche en polvo descremada (PBS-L) en cámara fría O/N con agitación orbital a 90 rpm. Se realizaron dos lavados con 50 mL de

PBS con Tween-20 al 0,2% (v/v) (PBS-T) por 5 min cada uno. Para la inmunodetección de *TbMST* se utilizó el suero murino generado como se describe en la **sección 3.5** a una dilución 1/500 o 1/2000 para la versión endógena de la proteína, y para la versión etiquetada con c-Myc, un anticuerpo comercial anti-c-Myc (Mouse Monoclonal Anti-c-Myc, Sigma) a una dilución 1/500. Como control de carga se recurrió a la detección de la triparredoxina y a la triparredoxina peroxidasa con un suero de conejo anti-TXN o anti-TXN Px (dilución 1:32.000) cedidos gentilmente por la Dra. Krauth-Siegel (Heidelberg, Alemania). Para todos los casos, la membrana se incubó en presencia de los correspondientes anticuerpos primarios diluidos en PBS-T con 4% (p/v) de leche en polvo descremada (PBS-T-L) durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación orbital a 60 rpm. Luego, la membrana se lavó tres veces con PBS-T (5 min a 90 rpm/lavado) y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (Invitrogen): anti-ratón (1:30.000) o anti-conejo (1:30.000) en PBS-T-L por 45 min a temperatura ambiente con agitación orbital 90 rpm. Finalmente se lavó la membrana cuatro veces con PBS-T más un último lavado con PBS bajo las mismas condiciones. La inmunodetección se realizó por quimioluminiscencia con el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) siguiendo las instrucciones del fabricante, salvo donde se indica que el revelado se hizo con el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo) diluyendo las soluciones de revelado al 1/3. Además, se utilizó el fotodocumentador Amersham ImageQuant 800 (Cytiva).

3.8.3 Inmunofluorescencia indirecta

Para poder marcar la mitocondria en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se utilizó un marcador de mitocondria (MitoTracker™ Red CM-H₂Xros - Special Packaging, Invitrogen) que luego de ser oxidado, emite fluorescencia. Debe ser integrado a las células cuando se encuentran viables ya que su acumulación es dependiente del potencial de membrana. Para esto, las células se centrifugaron a 2.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente resuspendidas en 15 mL de medio HMI-9 completo precalentado a 37°C. Posteriormente se agregó el mitotracker a una concentración final de 250 nM y se incubó 25 minutos a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente las cosechas continuaron como se describe arriba. Es importante proteger las muestras de la luz luego del agregado del mitotracker.

Luego del recuento de parásitos, se resuspendió el pellet en p-formaldehído 4% (p/v) en PBS (50 μ L por cada millón de parásitos) y se incubó por 18 minutos a temperatura ambiente para permitir el proceso de fijación de las estructuras celulares. Se realizaron tres lavados con PBS-G, intercalados con centrifugaciones a 2.000 g durante 10 min a temperatura ambiente y por último el pellet se resuspendió en PBS-G de forma tal de obtener 1 millón de parásitos en 50 μ L (una gota). Se colocaron dos gotas por cada portaobjeto recubierto con poli-L-lisina (Starfrost) y se incubó O/N en cámara húmeda para permitir la adhesión de las células a la superficie. Al día siguiente, se permeabilizaron las membranas de los parásitos utilizando una solución de Tritón X-100 0,2% (v/v) en PBS (20 min a temperatura ambiente). Luego de dos lavados con PBS se bloqueó con una solución filtrada a 0,22 μ m de BSA 0,2% (p/v) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS, los portaobjetos fueron incubados O/N a 4°C en cámara húmeda con 100 μ L de los diferentes anticuerpos primarios diluidos en PBS- BSA: dilución 1:250 para el suero anti-*Tb*MST o 1:1000 para el suero anti-TXN Px. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS e inmediatamente se incubó durante 45 min en oscuridad con 100 μ L de una dilución 1:1.000 en PBS-BSA del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) para el caso del suero anti-*Tb*MST, o el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo Alexa 594 (Invitrogen) para el caso de los sueros anti-TXN Px o anti-aldolasa. Por último, se realizaron 5 lavados con PBS y se agregó una gota del líquido de montaje Fluoroshield con DAPI (Sigma) sobre la cual se colocó el cubreobjetos y se procedió al sellado perimetral con esmalte de uñas luego de una incubación O/N a 4°C en cámara húmeda.

Los preparados se observaron con el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con asistencia técnica de Marcela Díaz (Unidad de Bioimagenología Avanzada, Institut Pasteur de Montevideo) empleando láseres y juegos de filtros que permitieran las siguientes longitudes de onda de excitación: 561, 488 y 405 nm para la detección de las señales correspondientes a los fluoróforos Alexa 594 y mitotracker, Alexa 488 y DAPI, respectivamente. Se tomaron imágenes de distintos planos del eje Z utilizando un zoom 2X y lente objetivo 63X de inmersión en aceite. Las imágenes seleccionadas fueron deconvolucionadas con el programa Huygens (versión profesional 22.04, Scientific Volume Imaging, The Netherlands, <http://svi.nl>). Para realizar la deconvolución, se calculó la PSF experimental (generada por integrantes de la UBA), aunque también se realizó la comparación con la PSF “teórica”. En la microscopía de fluorescencia, la imagen adquiridas siempre son una representación borrosa

del objeto real bajo el microscopio. Esta representación borrosa es descrita por la PSF (del inglés *Point Spread Function*). La PSF describe cómo se ve un único punto en la imagen^{77,78}.

Las imágenes se analizaron utilizando el programa Fiji⁷⁹. El análisis de colocalización se realizó sobre el *stack* entero de imágenes utilizando el plugin JACoP⁸⁰. Para la presentación en este trabajo, se generaron nuevas imágenes utilizando el comando “Z Project” en su función “Max intensity” que elige el píxel de máxima intensidad en cada adquisición para componer una nueva imagen en un único plano del eje Z. Para el análisis se contó con la asistencia técnica de Tabaré de los Campos (Unidad de Bioimagenología Avanzada, Institut Pasteur de Montevideo).

4. Resultados y Discusión

4.1 Amplificación y clonado de la secuencia codificante de la *TbMST* en un vector T

Si bien todas las construcciones que se utilizaron en este trabajo fueron finalmente encargadas a la empresa GenScript, la idea original era realizarlas en el laboratorio. Con ese fin, se amplificó la secuencia codificante completa de la *TbMST* a partir de ADN genómico de la cepa 427 de *T. brucei brucei* y se la clonó en un vector T. Aunque este plásmido no fue utilizado en este trabajo, el mismo fue enviado al grupo del Dr. Nicolas Rouhier (Universidad de Lorraine, Nancy, Francia) para que pudieran generar construcciones de interés para un proyecto en colaboración.

Con el objetivo de definir la mejor temperatura de *annealing* de la PCR, se ensayaron las siguientes temperaturas: 50°C, 53°C, 56°C, 59°C, 62°C y 65°C. El objetivo fue la puesta a punto de la PCR, para definir la mejor temperatura para este paso. Para las tres temperaturas más bajas, hubo un buen nivel de amplificación de un producto del tamaño molecular esperado. Sin embargo, también hubo una amplificación inespecífica, ya que en el gel se observaron muchas otras bandas minoritarias con tamaños diferentes al esperado (**Figura 18, panel A**). A 59°C, se constató la presencia de una banda mayoritaria del tamaño esperado, pero también se apreció una banda minoritaria de mayor tamaño. Es por esto que, en una siguiente prueba, se decidió usar 62°C y 65°C como temperaturas de *annealing* (**Figura 18, panel B**). En este rango, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la eficiencia de amplificación hasta el punto de no ver la banda de la *TbMST* a los 65°C. Dados estos resultados, se decidió utilizar las temperaturas 59°C y 62°C como temperaturas de *annealing* para una nueva PCR, teniendo en cuenta el compromiso entre la presencia de contaminantes y la eficiencia de amplificación (**Figura 18, panel C**).

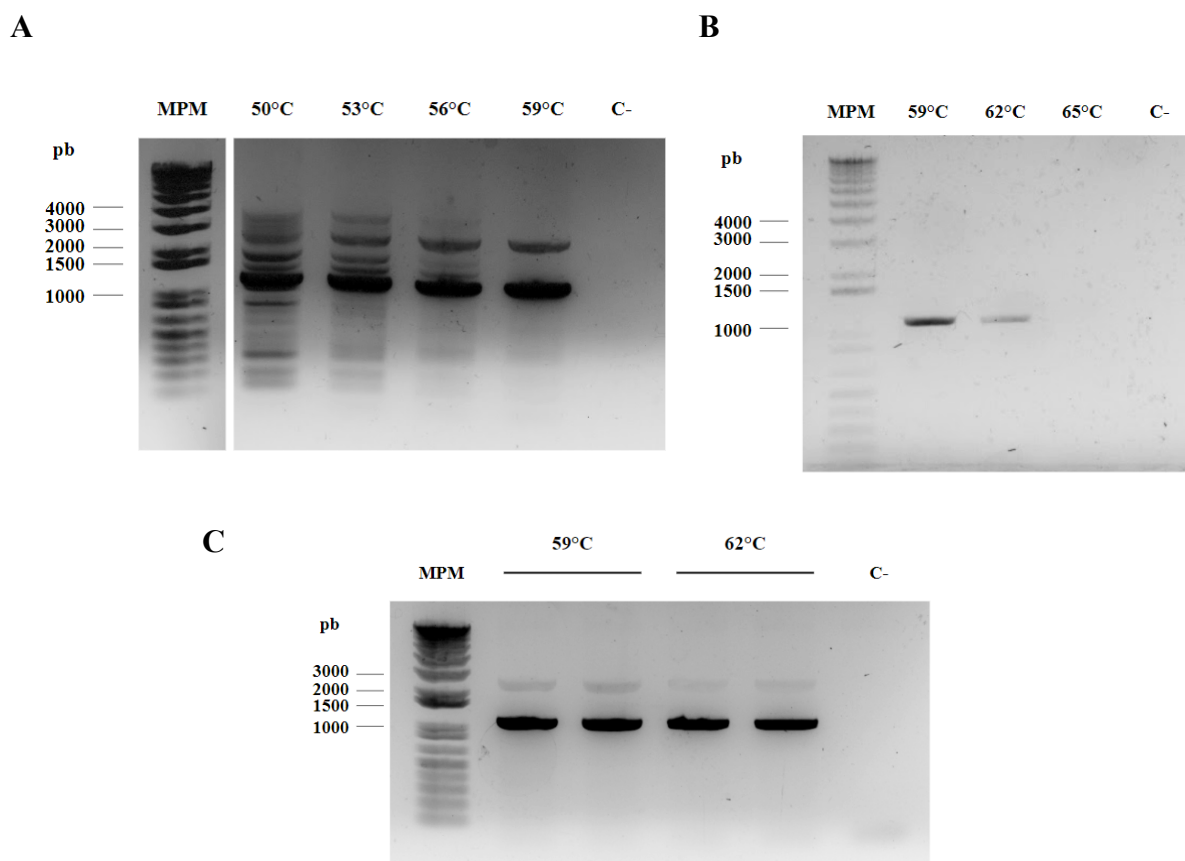


Figura 18. Amplificación de la secuencia codificante de la *TbmST*. Análisis por electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR resultantes de la amplificación desde ADN genómico de *T. b. brucei* cepa 427. Se ensayaron diferentes temperaturas de *annealing*: (A) 50°C, 53°C, 56°C y 59°C y (B) 59°C, 62°C y 65°C. (C) Resultados de la PCR definitiva, a partir de la cual se purificó la banda correspondiente a la *TbmST*. Para todos los casos, se observa una banda del tamaño esperado (1130 pb), además de otras bandas minoritarias de diferente tamaño, según el caso. C- significa control negativo. Como marcador de tamaño molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Dada la presencia de la banda contaminante, se purificó el producto de PCR de interés a partir del gel de agarosa y se procedió a la ligación con el vector pCR2.1-TOPO. Con las mezclas de ligación se transformaron células DH5 α quimiocompetentes comerciales de *E. coli*, que en combinación con el plásmido pCR2.1-TOPO y el sustrato X-gal permitieron la selección blanco-azul por el sistema de complementación en alfa. Se seleccionaron 11 colonias blancas que fueron crecidas en medio líquido. Posteriormente, se realizó una PCR empleando los mismos cebadores que para la PCR inicial sobre alícuotas de cada uno de los cultivos, para verificar la presencia de la secuencia codificante de la *TbmST*. Como se muestra en la **Figura 19**, se observó una banda con el tamaño esperado (1130 pb) para los

plásmidos provenientes de las 11 colonias, indicando que todos ellos contenían el inserto deseado.

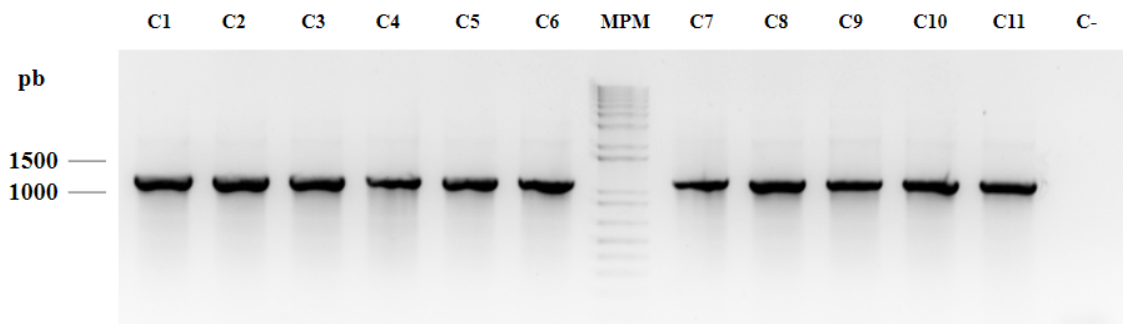


Figura 19. Cultivo-PCR para colonias de *E. coli* transformadas con la mezcla de ligación del producto de PCR para la *TbMST* al vector T. Análisis por electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de las reacciones de cultivo-PCR, correspondientes a 11 colonias blancas diferentes (C1 a C11) obtenidas en la transformación de *E. coli* con los productos de ligación. Para todas las colonias, se observa la presencia de un producto del tamaño esperado (1130 pb). En el último carril se muestra el control negativo correspondiente a la PCR sin el agregado de ADN molde. C- significa control negativo. Como marcador de tamaño molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Como segundo paso de *screening* se realizaron digestiones con enzimas de restricción sobre los plásmidos purificados a partir de cultivos de 5 de las 11 colonias blancas. Al realizar las digestiones, se obtuvo el patrón de restricción esperado (un fragmento de 1,1 kpb y otro de 3,9 kpb para la digestión con EcoRI, y fragmentos de 0,7 kpb y 4,4 kpb o 0,5 y 4,6 kpb para la digestión con HindIII), como se muestra en la **Figura 20**. Teniendo en cuenta el patrón de restricción obtenido, se puede concluir que para 4 de las 5 colonias estudiadas (colonias 1, 4, 7 y 10) el inserto se clonó en sentido (+) y para solo 1 de ellas (colonia 9) el inserto se clonó en el sentido (-).

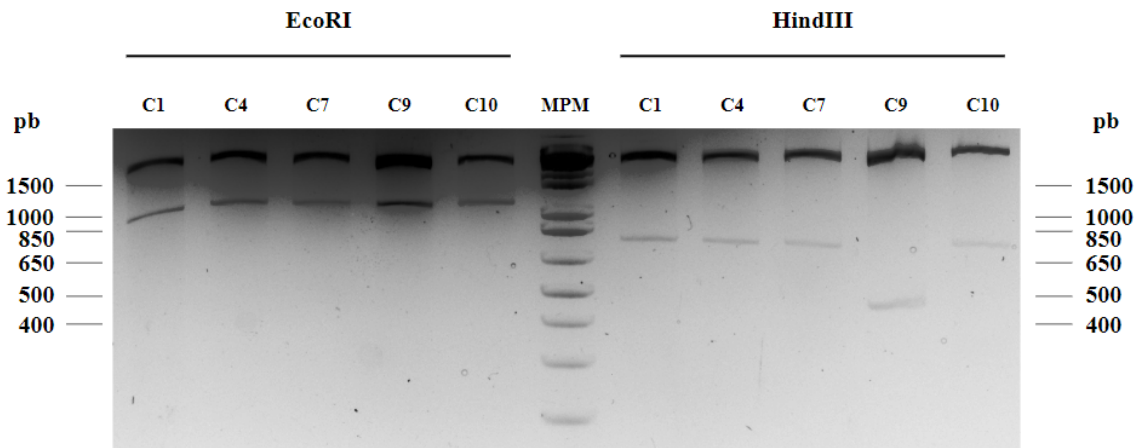


Figura 20. Digestión de los plásmidos correspondientes a las colonias de *E. coli* transformadas con la mezcla de ligación del producto de PCR para la *TbMST* al vector T. Análisis por electroforesis en gel de agarosa (1%) de la digestión del plásmido pCR2.1-TOPO conteniendo el inserto de interés (secuencia codificante de la *TbMST*). Los dos sitios *EcoRI* se encuentran en el esqueleto del plásmido, cada uno a un lado del inserto, por lo que la digestión con esta enzima debería dar lugar a dos fragmentos de 1148 y 3913 pb. Por su lado, de los dos sitios *HindIII* en el plásmido, uno se encuentra en el esqueleto del vector y otro en el inserto, por lo que el tratamiento con esta enzima permite evidenciar la direccionalidad en la que se clonó el inserto. Si el inserto se encuentra en el sentido (+), se obtienen dos fragmentos de 765 y 4396 pb, y si se encuentra en el sentido (-), los fragmentos resultantes son de 485 pb y 4576 pb. Como marcador de tamaño molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Finalmente, se secuenciaron los plásmidos extraídos de las colonias 1 y 9. El análisis de las secuencias, permitió corroborar que los plásmidos provenientes de ambas colonias contienen la secuencia esperada para el marco abierto de lectura de la *TbMST* y que la misma no presenta ningún tipo de mutación respecto de la secuencia genómica original (ver **Anexo 6** para el análisis de secuenciación para la colonia 9). Por lo tanto se puede concluir que la secuencia codificante de la *TbMST* fue clonada exitosamente en el vector pCR2.1-TOPO.

4.2 Expresión y purificación de *TbMST* recombinante en *E. coli*

La construcción utilizada para la producción de la *TbMST* recombinante, pET-Trx1b_*TbMST*, depende de la transcripción mediada por la polimerasa T7 e inducible por IPTG. La proteína que se expresa a partir del plásmido es una proteína de fusión, compuesta por la *TbMST* fusionada a la Trx y una cola de histidinas. Esta proteína

(Trx-6XHis-*TbMST*), difiere de la denominada *TbMST* recombinante de aquí en adelante, la cual refiere a la proteína sin ningún tipo de etiquetas (**Figura 21**).

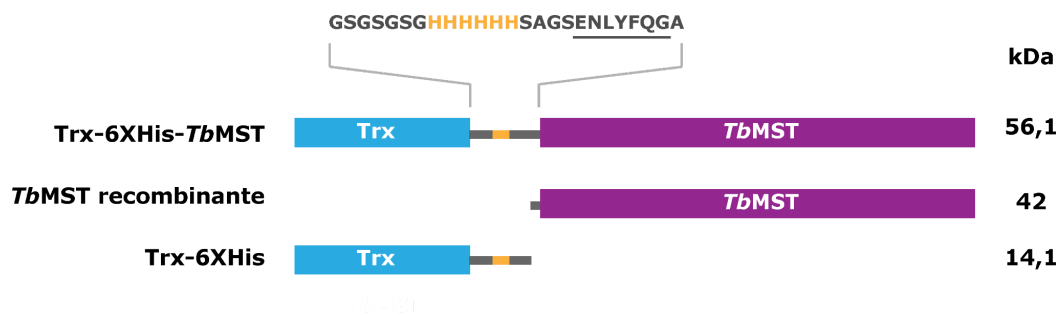


Figura 21. Esquema de la proteína Trx-6XHis-*TbMST*, expresada en *E. coli* y los productos de clivaje obtenidos con TEVp. Se muestra de manera esquemática la composición de la proteína de fusión expresada en *E. coli* (56 kDa), y los productos del clivaje con TEVp: la *TbMST* recombinante (42 kDa) y las etiquetas de la proteína de fusión: Trx-6XHis (14,1 kDa). El sitio de corte para la proteasa TEVp se encuentra subrayado.

La expresión de la Trx-6XHis-*TbMST* se realizó en las cepas BL21 (DE3) y BL21 CodonPlus (DE3) de *E. coli*. Esta última cepa tiene la particularidad que contiene las secuencias de los genes para distintos ARNt de uso poco común en *E. coli*. Tanto el uso de las células BL21 CodonPlus (DE3), las horas de inducción y la concentración de IPTG se seleccionaron en base a la información reportada para la expresión recombinante de la *LmMST*⁴³.

Al ver la distribución de la Trx-6XHis-*TbMST* en la fracción soluble e insoluble de los lisados bacterianos de ambas cepas (**Figura 22, carriles 1 y 2 de los paneles A y B**), se observa un comportamiento similar para ambos, encontrándose una buena cantidad de la misma en la fracción soluble de los lisados, si bien la mayor proporción se encuentra en la fracción insoluble de ambas cepas bacterianas.

Luego del paso de expresión, se realizó la purificación de la proteína para ambas cepas de *E. coli* misma mediante dos rondas de IMAC. En la primera ronda, se separa a la proteína de fusión del resto de las proteínas del lisado. Luego, se incuba la proteína con la proteasa TEVp (con cola de histidinas), y se realiza la segunda ronda de purificación donde el material no unido a la columna contiene a la *TbMST* recombinante, ya que la Trx y la TEVp son retenidas en la columna por contar con cola de histidinas. En la **Figura 22 (carril 6 de los paneles A y B)** se observa que el peso de la proteína de fusión purificada en la primera

IMAC es coherente con el esperado (56,1 kDa), y como el tratamiento con la proteasa da lugar a la aparición de una banda de menor peso, correspondiente a la *TbMST* recombinante (42 kDa) (**panel A: carril 11 y panel B carril 7**). Algo a notar es que a la secuencia de la *TbMST* recombinante se le agregó en la región N-terminal, debido al diseño del plásmido, dos residuos aminoacídicos (Gly y Ala) correspondientes a la secuencia de corte de la TEVp (ver **Anexo 3**).

En el caso de BL21 (DE3), prácticamente la totalidad de la *TbMST* recombinante fue obtenida en la fracción no unida (FNU) de la segunda IMAC, como era esperable (**Figura 22, panel A: carril 7**), mientras que la Trx (14,1 kDa) y la TEVp (28 kDa) se obtuvieron en el eluato (**Figura 22, panel A: carril 10**). Sin embargo, este no fue el caso para la proteína purificada a partir de BL21 CodonPlus (purificada por el Dr. Ernesto Cuevasanta), que debió ser eluida con 20 mM de imidazol en la segunda IMAC (**Figura 22, panel B: carril 9**) ya que no se detectó en la FNU (**Figura 22, panel B: carril 8**). Una posible explicación para este comportamiento podría ser la siguiente: dado que en la bibliografía se reporta que la Trx es aceptor del azufre de la MST, y dado que se espera que la Trx sea retenida en la columna de níquel por la cola de histidina, una interacción de la Trx con la *TbMST* causaría que esta última quede secuestrada en la matriz. Sin embargo, esta explicación no sería del todo satisfactoria, porque las purificaciones a partir de los extractos celulares de ambas cepas de *E. coli* se realizaron de forma idéntica, y la *TbMST* recombinante fue solamente retenida en la purificación a partir de la cepa BL21 CodonPlus (DE3). Otra posible explicación, e incluso complementaria a la anterior, podría ser que la *TbMST* producida por cada cepa posea propiedades fisicoquímicas o estructurales diferentes que alteren su interacción con otras proteínas o con la resina de purificación.

Las proteínas purificadas a partir de las dos cepas fueron utilizadas para diferentes propósitos. La obtenida a partir de BL21 (DE3) se utilizó para la producción de anticuerpos en ratones, mientras que la obtenida a partir de BL21 CodonPlus (DE3) fue la empleada para los ensayos bioquímicos. Esto es debido a que la primera no presentó actividad MST al momento de su medición, mientras que la última sí lo hizo. Esta diferencia de actividad podría deberse a diferentes propiedades de las dos proteínas como se comentó en el párrafo anterior, o también a una demora en la realización de los ensayos de actividad luego de la purificación a partir de BL21 (DE3). Al presentar actividad MST, se asumió que la conformación de la enzima sería

la nativa, algo indispensable para los ensayos de caracterización bioquímica, pero no para la producción de un suero anti-*TbMST*.

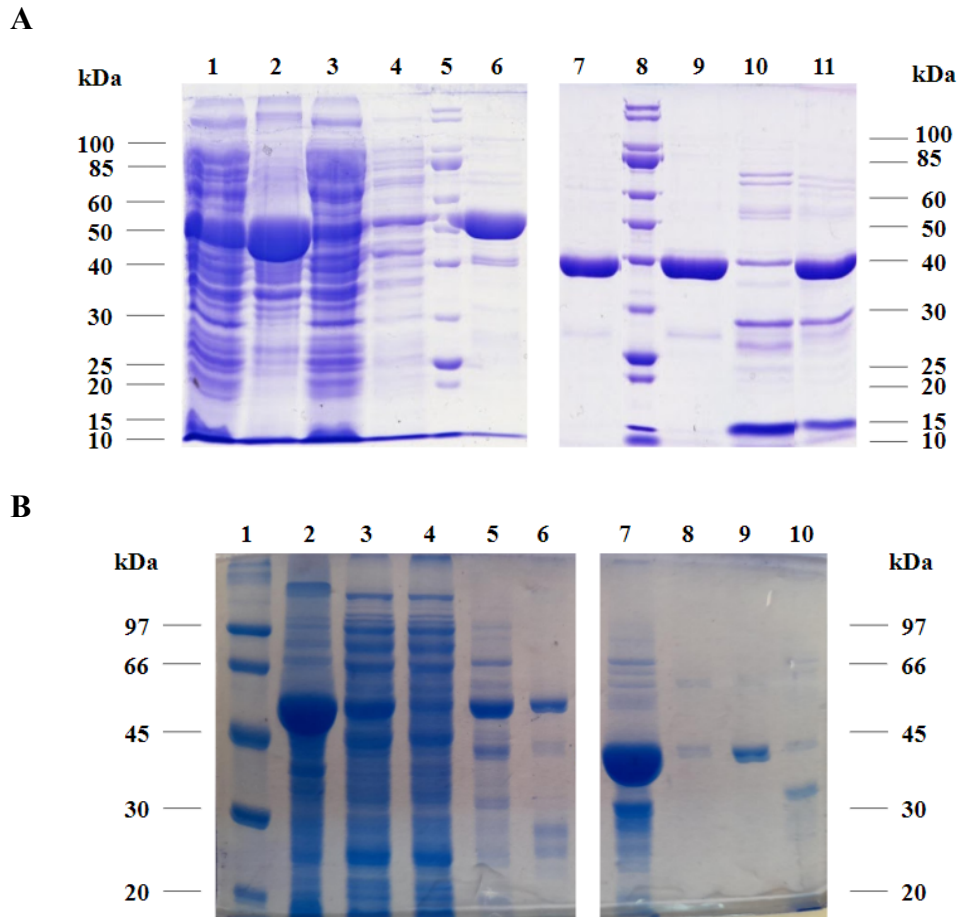


Figura 22. Purificación de la *TbMST* recombinante. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10%. Los lavados se realizaron con 20 mM de imidazol en el amortiguador, mientras que la elución se realizó con 500 mM de imidazol. **(A)** Purificación a partir de BL21 (1- fracción soluble; 2- fracción insoluble; 3- FNU 1era IMAC; 4- lavado 1era IMAC; 5- MPM; 6- eluido 1era IMAC; 7- FNU 2da IMAC; 8- MPM; 9- lavado 2da IMAC; 10- eluido 2da IMAC; 11- digestión con TEVp). Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó el Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa) (NEB). **(B)** Purificación a partir de BL21 CodonPlus (1- MPM 2- fracción insoluble; 3- fracción soluble; 4- FNU 1era IMAC; 5- lavado 1era IMAC; 6- eluido 1era IMAC; 7- digestión con TEVp; 8- FNU 2da IMAC; 9- lavado 2da IMAC; 10- eluido 2da IMAC).

4.3 Caracterización bioquímica de la *TbMST* recombinante

4.3.1 Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática con *TbMST* recombinante fueron realizados por el Dr. Ernesto Cuevasanta (Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, UdelaR).

En este ensayo a “tiempo final”, se evaluó la cantidad de producto generado por la MST luego de determinado tiempo. Para esto, se incubó la enzima con los sustratos (3MP y cianuro) por 2, 5 y 10 minutos. Luego, se detuvo la reacción con el agregado de formol y se agregó la mezcla de reacción para formar el tiocianato de hierro (III) (FeSCN^{2+}), complejo coloreado que absorbe a 460 nm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la absorbancia a esta longitud de onda de la mezcla para determinar la concentración de FeSCN^{2+} . Conociendo la concentración de FeSCN^{2+} , también se conoce la cantidad de tiocianato (SCN^-), producto de la MST.

En paralelo al ensayo enzimático, se realizó una curva de calibración con tiocianato de potasio, para asignarle a cada valor de concentración de FeSCN^{2+} , un valor de absorbancia a 460 nm (**Figura 23**). Esto es de suma importancia, ya que para conocer la cantidad de tiocianato producido por la *TbMST* en un tiempo determinado, es necesario conocer la correlación entre concentración de FeSCN^{2+} y su absorbancia a 460 nm.

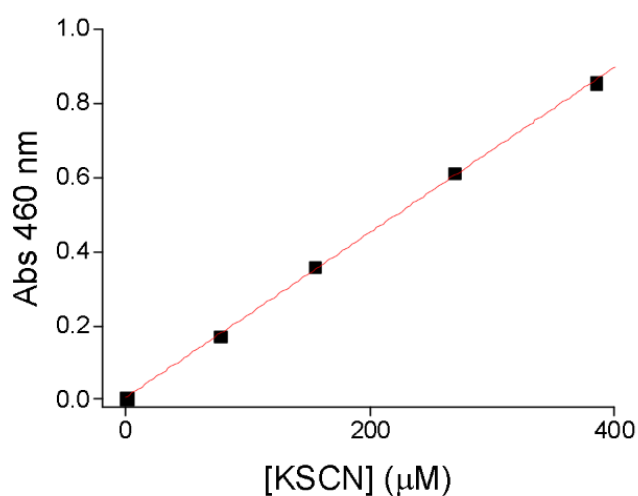


Figura 23: Curva de calibración realizada para el ensayo de actividad enzimática con la *TbMST* recombinante. La curva se realizó con tiocianato de potasio en paralelo al ensayo de actividad enzimática. Concentraciones conocidas de tiocianato de potasio fueron incubadas con formol, FeCl_3 y HNO_3 por 15 minutos para permitir la formación del complejo coloreado FeSCN^{2+} (tiocianato de hierro (III)) y se leyó la absorbancia a 460 nm. Existe una relación lineal entre la concentración de tiocianato de potasio, y su absorbancia a 460 nm en el rango de concentraciones que va desde 0 a 400 μM .

La concentración de complejo producido por la *TbMST* se obtuvo interpolando los valores de absorbancia obtenidos a estos tiempos (**Figura 24, panel A**) en la curva de calibración. Una vez obtenidas las concentraciones de tiocianato producido, estas se graficaron en función del tiempo (**Figura 24, panel B**). De la pendiente de la gráfica, y teniendo en cuenta el factor de dilución, se calculó la velocidad de la reacción, que luego fue convertida a actividad enzimática específica dividiendo por la concentración de enzima. El valor obtenido para la actividad transferasa 3MP:cianuro de la *TbMST* recombinante fue de $419 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, comparable con el valor de $229 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ reportado en la bibliografía para la *LmMST*, para la misma reacción de transferencia 3MP:cianuro⁴³.

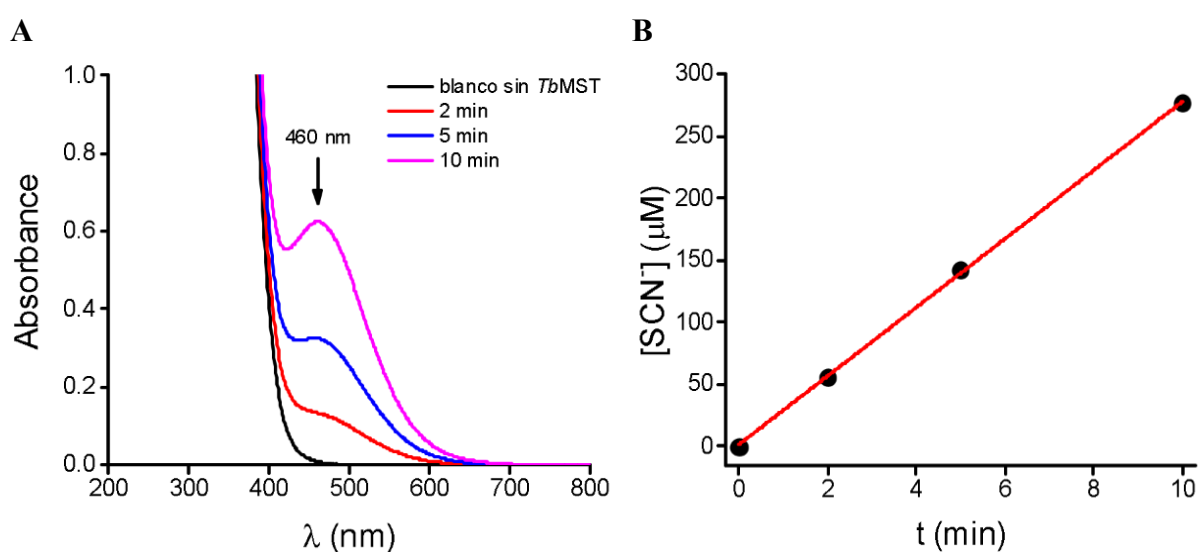


Figura 24. Actividad enzimática de la *TbMST* recombinante. (A) Espectros de absorbancia a tiempo final de los ensayos de actividad enzimática, se realizaron reacciones de 2, 5 y 10 minutos a 37°C y pH 8,0. Con la flecha se indica un máximo relativo, correspondiente al valor de absorbancia a 460 nm. (B) Gráfico de concentración de tiocianato generado en función del tiempo para cada uno de los ensayos de actividad de *TbMST*. A partir de la pendiente de la gráfica, y teniendo en cuenta la concentración de enzima, se calculó la actividad específica de la misma.

4.3.2 Cromatografía de exclusión molecular

Dado que se demostró que la *TbMST* recombinante producida poseía actividad transferasa 3MP:cianuro (y comparable con lo reportado en la literatura), se asumió que se encontraba en su conformación nativa y se procedió al análisis del estado oligomérico por cromatografía de exclusión molecular (SEC, del inglés *size exclusion chromatography*). Como antecedente se había reportado un estado monomérico para las conformaciones activas de la *LmMST* y *HsMST*^{41,43}.

Antes de la SEC, se evaluó por SDS-PAGE la presencia de oligómeros covalentes en muestras preincubadas con y sin agente reductor (+/-DTT) (**Figura 25**). En ambas condiciones, se distingue una banda mayoritaria que se corresponde con el peso molecular esperado para un monómero de la *TbMST* recombinante. En ausencia de reductor, se alcanzan a distinguir bandas minoritarias de mayor peso molecular, no observables en presencia de reductor. Sin embargo, dada la presencia de otras proteínas contaminantes provenientes del proceso de purificación, estas bandas no son necesariamente atribuibles a estados oligoméricos de la *TbMST*. Dados estos resultados, se decidió realizar la cromatografía en ausencia de reductor, y utilizando una columna cuyo rango de separación es de 3.000-70.000 Da (para proteínas globulares).

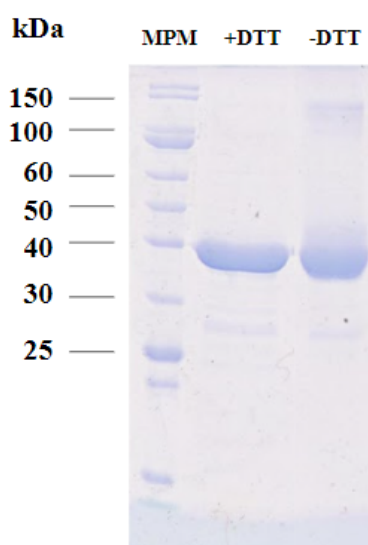


Figura 25. Análisis de la presencia de oligómeros covalentes en la solución de *TbMST* recombinante. Análisis por SDS PAGE al 10% de soluciones de la *TbMST* recombinante incubadas en presencia y ausencia de agente reductor (DTT, 20 mM). En ausencia de reductor, se observan bandas de alto peso molecular, no

presentes luego de una incubación con el reductor, que podrían corresponderse a oligómeros covalentes de la *TbMST* o de otras proteínas contaminantes presentes en la solución. Como marcador de peso molecular se utilizó el Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa) (NEB).

Previo a las corridas con la solución de *TbMST*, se realizó la calibración de la columna utilizando diferentes proteínas globulares estándar de tamaño conocido. Con los diferentes volúmenes de retención y pesos moleculares se obtiene una curva de calibración, cuya ecuación de la recta ($y = -0,19087 + 3,4856x$) permite calcular el tamaño de la proteína de interés.

Se realizaron dos inyecciones en la columna, con dos alícuotas de una misma solución de *TbMST* recombinante, a modo de duplicados (**Figura 26**). El volumen de retención en la columna fue idéntico para ambas corridas, aunque la absorbancia a 280 nm detectada en la segunda corrida fue mayor. Se observa un pico agudo y mayoritario con un volumen de retención de 8,86 mL correspondiente a la *TbMST*, y un “hombro” o pico minoritario con un volumen de retención apenas menor, que posiblemente corresponda a los contaminantes anteriormente mencionados.

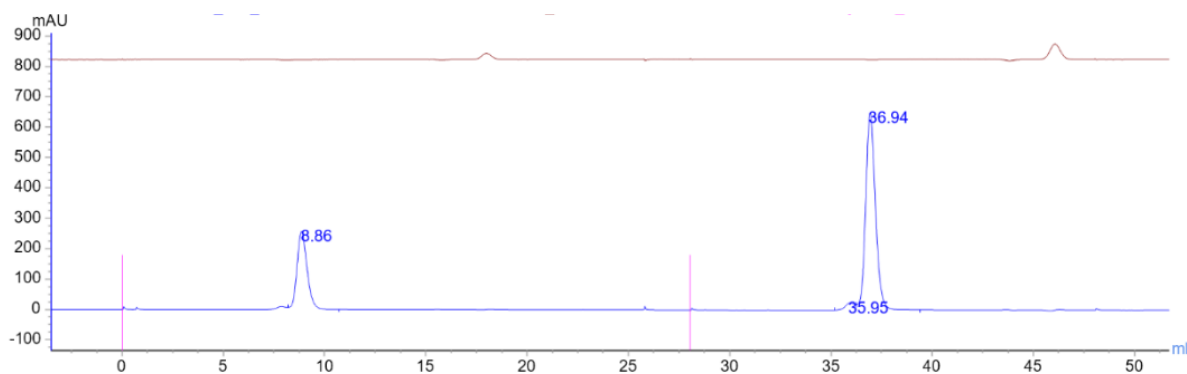


Figura 26. Cromatografía de exclusión molecular para la *TbMST* recombinante. Se realizaron dos inyecciones con dos alícuotas con aproximadamente 0,7 mg de la enzima en la columna Superdex 75 10/300 GL (los puntos de inyección se indican en rosado). La absorbancia a 280 nm se representa en azul para ambas corridas. Los volúmenes de retención fueron iguales en ambos casos (8,86 mL). En ambas inyecciones, se observa un pico mayoritario correspondiente a la *TbMST* recombinante, y uno minoritario de menor volumen de retención, posiblemente correspondiente a una proteína contaminante.

Al sustituir el volumen de retención para la *TbMST* en la ecuación de la recta, se obtiene un peso molecular aparente de 62 kDa, un valor más alto que el predicho por secuencia para un monómero (42 kDa) pero inferior al de un dímero de una proteína. Es de notar que el peso

molecular obtenido con esta técnica, es fuertemente influenciado por la forma/estructura de la proteína. Es decir, una conformación más desplegada o más compacta de una misma proteína migrará diferencialmente a través de la matriz del gel de exclusión molecular, causando que su peso molecular aparente se aparte del valor teórico.

En base a estos resultados y a que en condiciones no reductoras y desnaturizantes no se observó la presencia de una especie dimérica covalente de la *TbMST*, se podría hipotetizar que en solución la forma recombinante de esta proteína se comporta como un monómero con una conformación “desplegada”. Esta hipótesis además se sustenta en datos estructurales reportados para la *LmMST*. La *LmMST* posee un dominio extra a los dos rodanesa, de aproximadamente 80 aminoácidos, exclusivo y único de los tripanosomátidos (**Figura 11**). Si bien en la estructura cristalográfica de esta enzima este dominio no se corresponde con una zona desordenada, en solución podría ser que esta región tuviera otro dinamismo. Apoyando esta hipótesis, los autores que caracterizaron *HsMST* por SEC, la cual carece de dicho dominio, comprobaron que el peso molecular de la misma se correspondía con el teórico para esta enzima⁴¹. Para intentar descifrar si el dominio C-terminal de la *TbMST* es el responsable de esta migración anómala en la SEC, sería necesario diseñar y caracterizar proteínas, sin este dominio. Sin embargo, esta estrategia puede no resultar adecuada ya que cuando se intentó truncar el dominio C-terminal de la *LmMST* recombinante, la proteína perdió solubilidad⁴³. De ocurrir algo similar con la *TbMST*, sería imposible realizar dichos estudios. En este sentido, el alto grado de conservación de secuencia alta entre *TbMST* y *LmMST* sugiere que estas proteínas podrían comportarse de manera similar. Alternativamente, dado que no se puede descartar completamente la posibilidad de que existan dímeros no covalentes, podría repetirse la SEC empleando amortiguadores con diferentes fuerzas iónicas o pH, para intentar favorecer o desfavorecer interacciones electrostáticas entre regiones de una misma o diferentes subunidades de la *TbMST*. Si bien aún faltan evidencias para poder afirmar con certeza la forma oligomérica de la *TbMST* recombinante, estos resultados representan el primer reporte de la conformación en solución de la forma activa de esta proteína.

4.4 Producción de anticuerpos anti-*TbMST* en ratones

Previo a la inoculación de animales, la contribución de proteínas contaminantes en las fracciones recogidas en la purificación fue analizada mediante densitometría sobre el gel correspondiente. En todas las fracciones analizadas (FNU 9-FNU 12), la *TbMST* representaba más del 95% de la cantidad total de proteína presente, y por tanto se consideró que estas muestras eran de calidad adecuada para la inmunización. En la **Figura 22 (panel A: carril 7)** se muestra concretamente la FNU 10, representativa de las demás, ya que todas ellas fueron similares en composición y concentración de proteínas. Con el pool de estas fracciones se generó el suero murino anti-*TbMST* empleando el protocolo que se esquematiza en la **Figura 17**.

La especificidad y título de los sueros policlonales obtenidos de cada ratón en distintos puntos del protocolo de inmunización fueron evaluados por *Western blot*, empleando la *TbMST* recombinante y extractos celulares de la línea 514-1313 LUC SE *TbMST* de *T. brucei* (la generación de esta línea se describe en la **sección 4.5**). El uso de extractos celulares de parásitos proporciona información acerca de la especificidad de los sueros en la detección de la *TbMST* con respecto a otras proteínas o epítopes en muestras de interés. A su vez, esta línea celular, además de expresar la *TbMST* endógena, sobreexpresa una copia ectópica de la *TbMST* de mayor tamaño debido a la presencia de una doble etiqueta de c-myc. Por lo tanto, su uso permite evaluar la capacidad de los sueros para detectar cantidades y especies de la proteína en el modelo celular de interés (*T. brucei brucei* BSF).

El análisis de los sueros permite evidenciar que luego del primer refuerzo, todos los animales lograron generar anticuerpos específicos contra la *TbMST* (**Figura 27**). Además de la *TbMST*, se observa la detección de otras bandas minoritarias, posiblemente correspondientes a proteínas contaminantes remanentes del proceso de purificación. Aunque se logra detectar de buena manera la *TbMST*, no representa la misma exigencia la detección de la proteína recombinante pura y la detección de la proteína en un extracto celular. Por esto, se decidió seguir adelante con el proceso de inmunización y para las extracciones siguientes analizar el incremento de selectividad y título contra la *TbMST* utilizando también un extracto de parásitos. Luego del segundo refuerzo (**Figura 28, panel A**), se observa una mejor detección de la proteína recombinante y una baja detección de la proteína endógena y de la copia

ectópica, detectándose únicamente esta última con el suero del ratón 2. Es por esta razón que se prosiguió a dar el tercer y último refuerzo a los animales, y repetir la detección con los sueros provenientes de los sangrados finales (**Figura 28, panel B**). Si comparamos estos resultados con los sueros anteriores, se puede constatar un incremento del título de anticuerpos contra la *TbMST* para los sueros provenientes de los tres ratones. Esto se evidencia en un incremento de la señal contra la proteína recombinante y ambas copias de *TbMST* (endógena y ectópica) presentes en el extracto de *T. brucei*, aunque para este último caso, la mejora no es tan evidente. Si bien todos los animales lograron generar anticuerpos contra la proteína, y su producción fue mejorando hasta el último refuerzo, es notorio que no todos los sueros poseen el mismo título de anticuerpos contra la proteína expresada por los parásitos, siendo el suero del ratón 2 el que posee menor capacidad de detección. Para la inmunodetección de la *TbMST* en todos los ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia mostrados más adelante, se utilizó el suero proveniente del sangrado final del ratón 20. Si bien en capacidad de detección los sueros provenientes de los ratones 0 y 20 parecen ser similares, se optó por utilizar el 20 por motivos prácticos y para facilitar comparaciones.

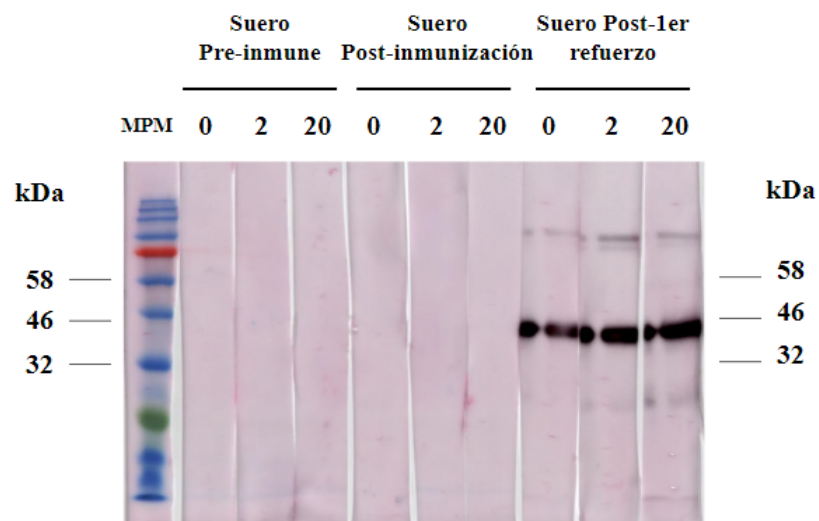


Figura 27. Detección de la *TbMST* recombinante con los sueros anti-*TbMST* por *Western blot*. Se sembró en cada carril 250 ng de la forma recombinante de la enzima y se incubó con los sueros pre-inmune, post-inmunización y post-1er refuerzo de los ratones 0, 2 y 20. Se corrió un mismo gel con proteína recombinante en tantos carriles como fue necesario, luego se transfirió a la membrana y se recortaron tiras de la misma para poder incubar cada una de ellas con el suero correspondiente. Todas las tiras fueron reveladas al mismo tiempo. En todos los casos se usó una dilución 1:500 del suero correspondiente. Como marcador de peso molecular se utilizó el Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa) (NEB).

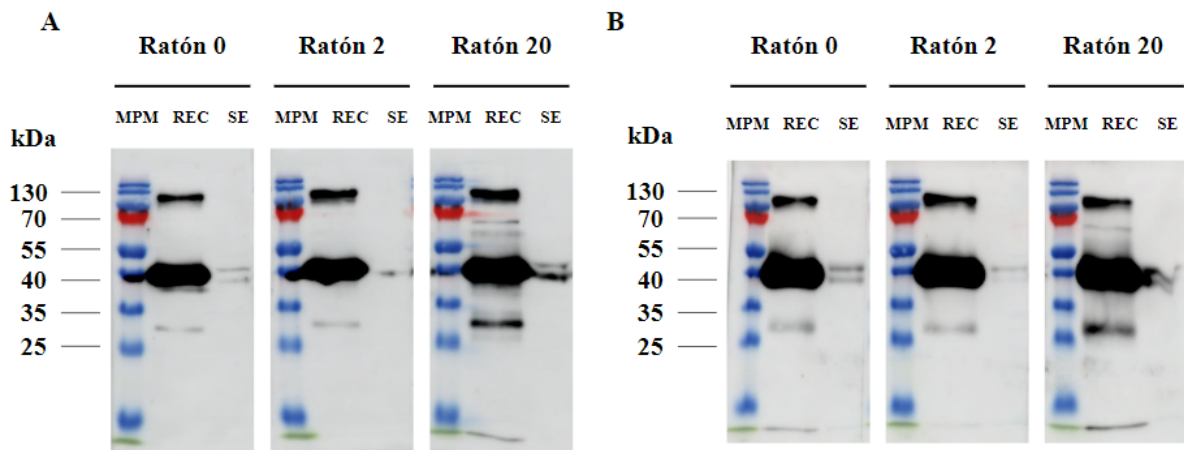


Figura 28. Evaluación de los sueros finales anti-*TbMST* por *Western blot*. Se evaluaron los sueros post-2do refuerzo (A) y los sueros provenientes del sangrado final (B) de los ratones 0, 2 y 20, empleando la proteína recombinante (REC) (250 ng por carril, para el panel A y 75 ng por carril para el panel B) y un extracto de parásitos sobreexpresantes de *TbMST* (SE) (3 millones de células por carril). Si bien el panel A y B muestran diferentes membranas, ambas fueron reveladas con el mismo kit, y con el mismo tiempo de exposición para facilitar comparaciones. Dentro de cada panel, las 3 tiras pertenecen a la misma membrana, que debió ser recortada para poder incubar cada tira con el suero correspondiente. En todos los casos se usó una dilución 1:2.000 de los sueros mencionados. Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó el PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific).

4.5 Generación y caracterización *in vitro* de una línea de *T. b. brucei* sobreexpresante para *TbMST*

La línea sobreexpresante fue generada con el objetivo de evaluar si una sobreexpresión de la *TbMST* representaría algún beneficio para el parásito. Además, dado que la proteína ectópica expresada por esta línea celular posee una doble etiqueta de c-myc, la cual puede ser empleada para monitorear y cuantificar su nivel de expresión.

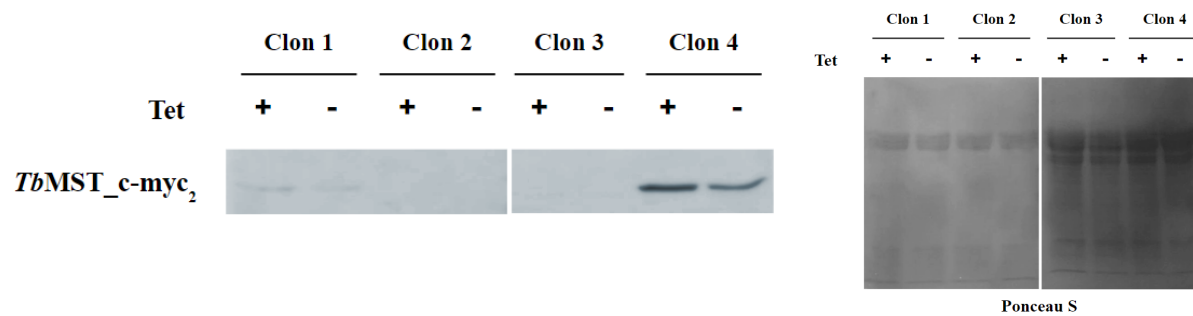
Para la generación de esta línea, se transfectaron parásitos de la línea 514-1313 LUC con la construcción pHD 1700_ *TbMST*_c-myc₂. Esta línea fue elegida por ser bioluminiscente, una herramienta especialmente útil para el seguimiento *in vivo* del proceso de infección. A partir del día 6 post-transfección se detectó la proliferación de clones celulares. Se obtuvieron 8 clones, de los cuales se seleccionaron 4 para evaluar la inducción de la expresión de la *TbMST* con doble etiqueta de c-myc. Para este propósito, la expresión de *TbMST*_c-myc₂ se indujo durante 72 horas y se evaluó mediante *Western blot* con un anticuerpo comercial

anti-c-myc. Como se observa claramente en la **Figura 29, panel A**, la expresión de esta proteína en presencia de tetraciclina no es homogénea para todos los clones. En dos de ellos (clon 1 y 4) se detecta una única banda del peso molecular esperado (44,7 kDa) para la copia ectópica de la *TbMST*, mientras que en los otros dos clones no. Otro aspecto a notar es que para los clones 1 y 4, la banda se detecta en los cultivos realizados en ausencia de inductor, si bien su intensidad es menor que la correspondiente a los cultivos inducidos. Este fenómeno de expresión en ausencia de inductor conocido como *leakiness* o fuga del promotor, es un problema frecuente en los sistemas de expresión regulados por tetraciclina^{81,82} y parecería ser altamente variable en *T. brucei*^{69,83}.

Para intentar reducir o eliminar la fuga del promotor, los parásitos se cultivaron en presencia de una concentración más elevada de bleomicina, antibiótico de selección del plásmido pHD 1313 integrado en el genoma de la línea usada, que también posee dos copias de la secuencia codificante de TetR. Esta estrategia de incrementar la presión de selección es una aproximación que se utiliza para generar dobles *knock out* (KO) a partir de un simple *knock out* a través de recombinación mitótica, un sistema presente naturalmente en *T. brucei*⁸⁴. De hecho, se encuentran reportados casos donde esta estrategia fue exitosa^{85,86}. Debido a que próximo al gen que otorga la resistencia a bleomicina, se encuentran las secuencias que codifican para TetR (por el diseño de la construcción pHD 1313) si se diera el fenómeno de recombinación, podría esperarse que esto dé lugar a un incremento en el mínimo de copias de TetR y por lo tanto a un mayor nivel de su expresión. Concentraciones elevadas de TetR deberían reducir significativamente el fenómeno de *leakiness*. Primero se probó cultivar con una concentración de bleomicina que duplicara la que se estaba utilizando (0,4 µg/mL). Después de 4 pasajes, esos parásitos se cultivaron con una concentración de bleomicina igual al triple de la inicial (0,6 µg/mL). Entre las dos nuevas concentraciones del antibiótico, se realizaron en total 10 pasajes, lo cual equivale a 3 semanas de cultivo. No se ensayaron mayores concentraciones de bleomicina dado que las células se murieron luego de dos semanas de cultivo con 0,6 µg/mL de este antibiótico. Luego de una inducción de 48hs con tetraciclina, se evaluó y comparó la expresión de la *TbMST_c-myc₂* por *Western blot*. Como se muestra en la **Figura 29, panel B**, no se observan grandes diferencias en la expresión de *TbMST_c-myc₂* en las condiciones (+) y (-) TET para ninguna de las concentraciones de bleomicina, indicando que esta estrategia no logró silenciar la expresión basal de la copia ectópica de *TbMST*.

La falta de una expresión diferencial de la *TbMST_c-myc₂* entre las condiciones (+) y (-) inductor impidió realizar una caracterización fenotípica *in vitro* de esta línea celular. Si bien con fines comparativos se podría haber utilizado la línea de base 514-1313 LUC, esto no sería del todo apropiado, ya que la modificación genética realizada para generar la línea celular SE implica el empleo de un agente de selección (higromicina) contra el cual la línea parental muestra sensibilidad. En ese caso hubiese sido necesario generar una línea celular 514-1313 transfectada con el plásmido pHD 1700 carente de inserto. Por esta razón, y porque se pudieron generar anticuerpos específicos anti-*TbMST* es que se avanzó hacia la generación y caracterización de la línea ARNi de *TbMST*.

A



B

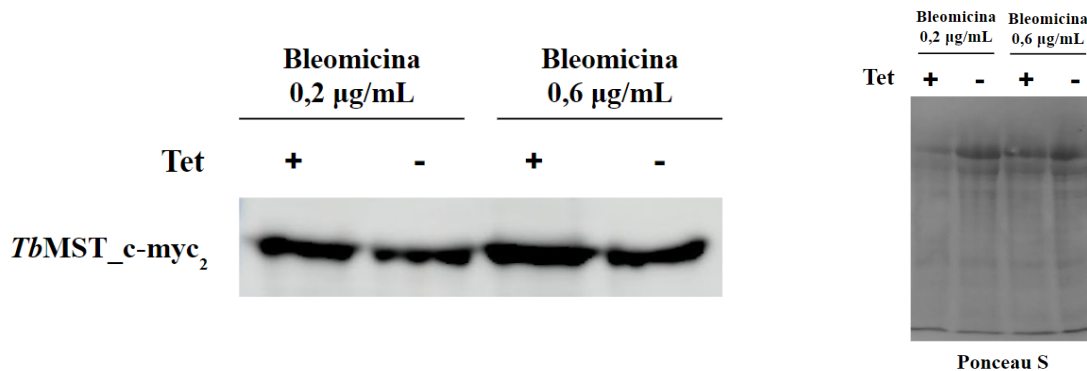


Figura 29. Análisis de la expresión de la *TbMST_c-myc₂* en clones de *T. brucei* sobreexpresantes para esta enzima por *Western blot*. (A) La detección se realizó en extractos de parásitos obtenidos a partir de 4 clones sobreexpresantes, cultivados por 72 hs en presencia de 0,2 µg/mL de bleomicina. El revelado de esta membrana, a diferencia del resto en este trabajo, se realizó con el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo). (B) La detección se realizó en extractos de parásitos del clon sobreexpresante 1, cultivados por 48 hs en presencia de 0,2 µg/mL o 0,6 µg/mL de bleomicina. Los parásitos fueron cultivados con una concentración incrementada de antibiótico por el total de 10 pasajes (3 semanas). Para todas las condiciones, se estudió el crecimiento de los clones inducidos (+TET) y no inducidos (-TET) con 1 µg/mL de tetraciclina. Se sembró el extracto correspondiente a 5 millones de parásitos en cada carril. La detección de la *TbMST_c-myc₂*

se realizó utilizando una dilución 1:500 del anticuerpo anti-c-myc. La tinción con Ponceau S permite la tinción de las proteínas totales presentes en la membrana.

4.6 Generación y caracterización fenotípica *in vitro* de una línea de *T. b. brucei* ARNi para *TbMST*

Para la generación de la línea ARNi para la *TbMST* se optó por utilizar una construcción de tipo tallo-bucle o shRNAi (construcción pHD 677_shRNAi *TbMST*). La ventaja que posee esta estrategia de ARNi frente a la basada en una construcción con doble promotor T7, es que los niveles basales de transcripción, en ausencia del inductor, son normalmente menores (menor fuga del promotor)⁸⁷.

Debido a los problemas de expresión basal en condiciones no inductoras que presentó la línea sobreexpresante generada sobre 514-1313 LUC, y un intento no exitoso de generar una línea ARNi sobre esta misma base, se decidió transfectar parásitos de las líneas celulares 449 y 514-1313. Los parásitos que incorporaron el plásmido se seleccionaron por su resistencia a la higromicina. A partir del día 6 post-transfección se detectó la proliferación de clones celulares. Se obtuvieron 6 clones para la línea generada sobre 449 y 3 clones para los derivados de la línea 514-1313.

De todos los clones obtenidos, se seleccionaron para la caracterización *in vitro* 2 clones de cada una de las líneas (clones 1 y 2 derivados de 449 y clones 3 y 4 derivados de 514-1313). En primera instancia todas ellas se cultivaron durante 48 horas en presencia de tetraciclina y la expresión de la *TbMST* fue evaluada por *Western blot* (**Figura 30**). Al cabo de este tiempo se observa un marcado silenciamiento de la expresión de la enzima en todos los clones. Es de notar que, para todos los clones menos para el 1, el nivel de expresión de la *TbMST* en ausencia de tetraciclina es prácticamente igual al de las líneas de base, de acuerdo a estimaciones de densitometría y normalizando por el control de carga. Para el clon 1, el bajo nivel de *TbMST* observado en condiciones (-) TET sugiere una fuga en la transcripción del shRNAi para la *TbMST*.

Como control de carga en el *Western blot* se recurrió a las proteínas triparredoxina (TXN) y triparredoxina peroxidasa (TXN Px). Dado que las dos son proteínas con comportamiento

housekeeping involucradas en el metabolismo redox de *T. brucei*, se optó por utilizar ambas en caso de que la concentración de alguna de ellas cambiara por la regulación a la baja de la expresión de la MST. Idealmente, se debería emplear como control de carga una proteína de expresión constitutiva que no esté relacionada al metabolismo o función de la proteína de interés. En el laboratorio el único anticuerpo disponible contra una proteína de estas características era uno anti-aldolasa, cuyo uso como control de carga no fue posible dado que su peso molecular (aprox. 40 kDa) es próximo al de la *TbMST*.

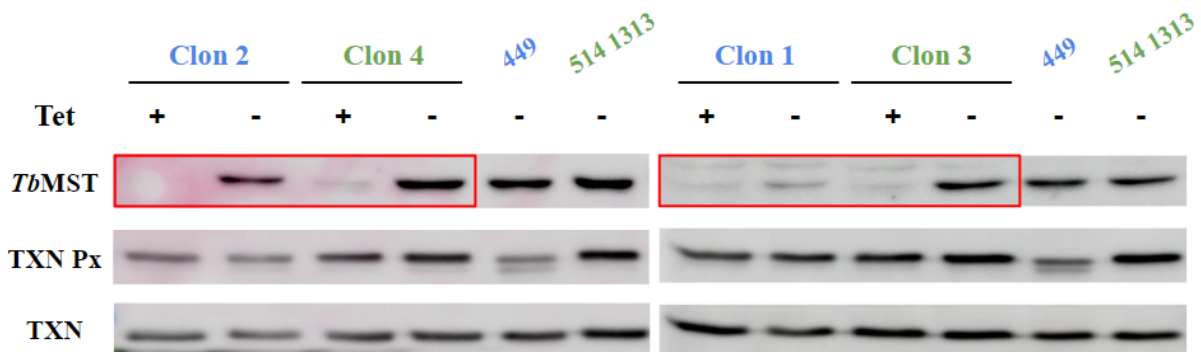
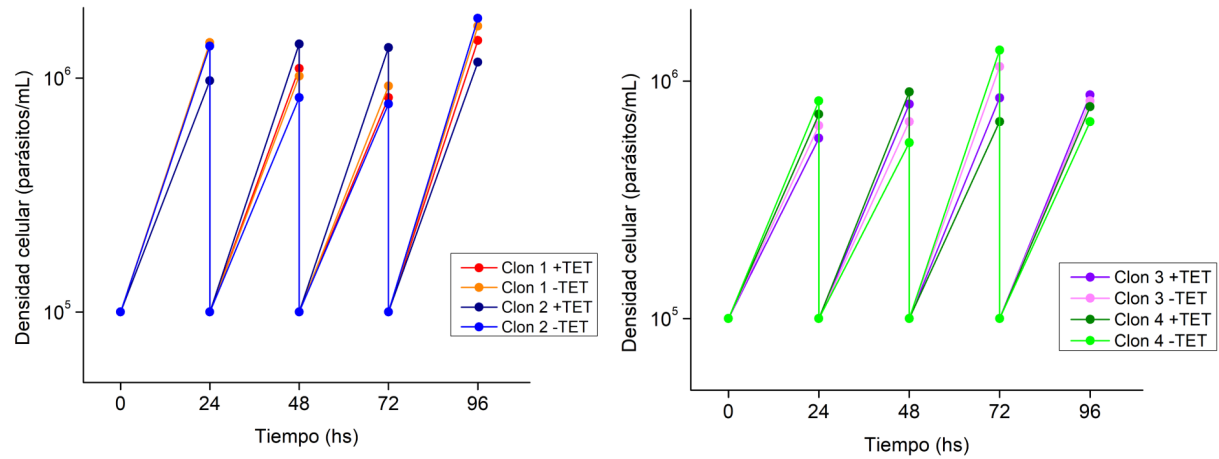


Figura 30. Análisis del silenciamiento de la *TbMST* por medio de shRNAi en clones de *T. brucei* y comparación con las líneas de base 449 y 514-1313. Se cultivaron los parásitos por 48 hs, partiendo de una densidad inicial de 10^5 parásitos/mL, y se estudió la expresión de la enzima (recuadrado en rojo) en presencia y ausencia de inductor (Tet). Los clones 1 y 2 son derivados de la línea 449 y los 3 y 4 son derivados de la 514-1313. Se sembró el extracto correspondiente a 2,5 millones de parásitos en cada carril. Como control de carga se utilizaron las proteínas triparredoxina (TXN) y triparredoxina peroxidasa (TXN Px). La detección se realizó utilizando una dilución 1:500 del suero anti-*TbMST* o 1:32.000 de los sueros anti-TXN Px y anti-TXN.

Para evaluar el fenotipo de crecimiento de los parásitos se realizó una curva de crecimiento con repiques cada 24 horas, partiendo de una densidad inicial de 10^5 parásitos/mL (**Figura 31, panel A**). Esta modalidad tiene como ventaja (en comparación con una curva de crecimiento continuo) que el cultivo se puede extender en el tiempo, manteniendo las células en una fase de crecimiento exponencial continua y cosechando cada 24 horas una cantidad suficiente de células para evaluar el silenciamiento de la *TbMST* por *Western blot*. En cuanto al crecimiento, no se observaron diferencias entre las condiciones (+) y (-) TET para ninguno de los clones derivados de ambas líneas de base. Tampoco se observaron diferencias a nivel de morfología o motilidad celular. El silenciamiento de la *TbMST* fue similar para todos los clones, salvo para el clon 1 (**Figura 31, panel B**). Para los clones 2 a 4, no solo se logra un silenciamiento mayor, sino que este se evidencia desde las 24 hs, y se mantiene en el tiempo.

En el caso del clon 1, además de haber un menor silenciamiento en la expresión de la *TbMST*, también parecería haber *leakiness*, y la disminución en la expresión de esta enzima en ausencia de inductor parece que aumenta en el tiempo.

A



B

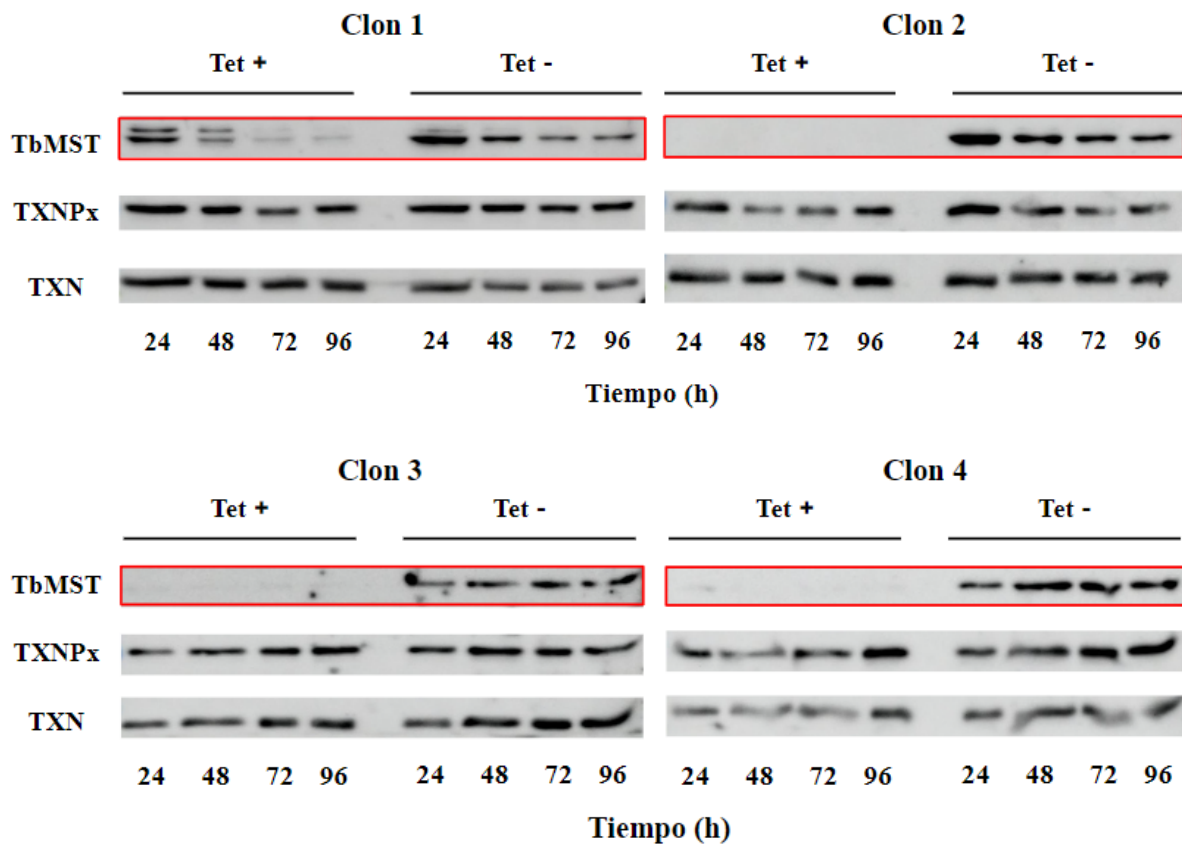


Figura 31. Curva de crecimiento con repique diario para distintos clones de las líneas 449 y 514-1313 shRNAi *TbMST* de *T. brucei* y análisis del silenciamiento por *Western blot*. Los clones 1 y 2 son derivados de la línea 449 y los 3 y 4 son derivados de la 514-1313. (A) Gráficos de densidad celular en función del tiempo

para los diferentes clones crecidos en presencia (+TET) y ausencia (-TET) de tetraciclina (1 µg/mL). Los gráficos se corresponden con curvas de crecimiento en modalidad con repiques, donde cada 24 horas se realizó el recuento y los parásitos fueron re-sembrados a una densidad de 10^5 parásitos/mL. **(B)** Cada 24 horas se analizó la expresión de la enzima por *Western blot* (recuadrado en rojo). Se sembró el extracto correspondiente a 2 millones de parásitos en cada carril. Como control de carga se utilizaron las proteínas triparredoxina (TXN) y triparredoxina peroxidasa (TXN Px). La detección se realizó utilizando una dilución 1:500 del suero anti-*TbMST* o 1:32.000 de los sueros anti-TXN Px y anti-TXN.

Dado que no se observó un fenotipo para los clones inducidos, se decidió realizar una curva de crecimiento continuo para dos de los clones (**Figura 32**). La diferencia con la curva anterior es básicamente que en este caso se permite que los parásitos completen su ciclo de crecimiento *in vitro*. La fase estacionaria representa un estrés agregado para el cultivo celular dado que en esta etapa es cuando se alcanzan densidades celulares altas, los nutrientes disponibles en el medio comienzan a escasear, se produce la acidificación del medio y la acumulación de productos del metabolismo. Además, si la proteína fuera relevante en la fase estacionaria del crecimiento del parásito y no en la exponencial, este efecto no se podría evidenciar en una curva de crecimiento con repiques. Para esta nueva curva, se partió de una densidad inicial de 10^5 y 8×10^4 parásitos/mL para el clon 2 y 3, respectivamente, y los cultivos se contaron cada 24 horas. Como en la curva de crecimiento anterior, no se observaron diferencias fenotípicas ni en el crecimiento ni en la morfología o motilidad celular entre las condiciones (+) y (-) TET. Se verificó el mantenimiento del silenciamiento de la *TbMST* en la fase estacionaria por *Western blot* (**Figura 34, panel B**). La cosecha a las 48 hs se utilizó para estimar la concentración intracelular de la proteína en esta línea (**sección 4.7**).

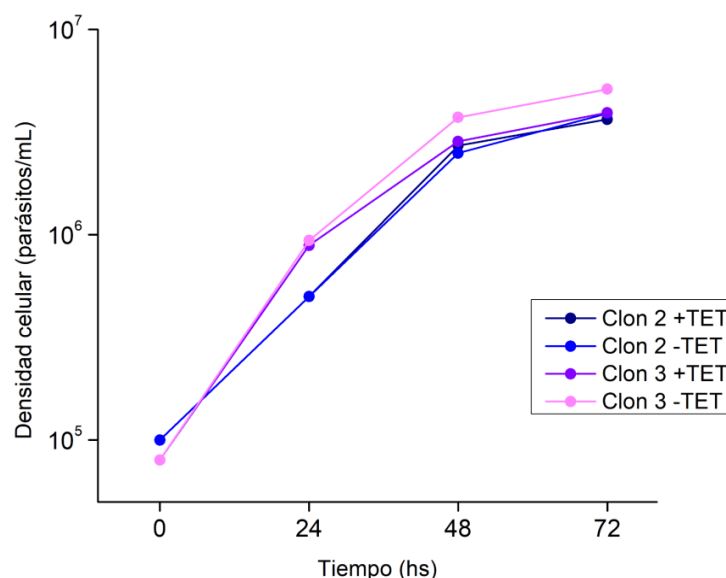


Figura 32. Curva de crecimiento continuo para distintos clones de las líneas 449 y 514-1313 shRNAi *TbMST* de *T. brucei*. El clon 2 es derivado de la línea 449 y el clon 3 es derivado de la línea 514-1313. La densidad de partida es de 10^5 y 8×10^4 parásitos/mL para los clones 2 y 3 respectivamente. El gráfico representa el crecimiento continuo de los clones durante 72 horas, donde cada 24 horas se realizó el recuento y cosecha de los parásitos. Se estudió el crecimiento de ambos clones inducidos (+TET) y no inducidos (-TET).

Frente a una falta de fenotipo diferencial entre los clones inducidos y no inducidos en condiciones estándar de cultivo, y dado el potencial rol de la MST como antioxidante, se realizaron pruebas preliminares de viabilidad celular frente a condiciones de estrés oxidativo. Para estas pruebas se utilizó solamente al clon 2 shRNAi *TbMST*. Las densidades celulares a las 24 horas se muestran en la **Figura 33, panel A**.

El tratamiento con 1 μ M de hidroperóxido de cumeno fue altamente tóxico para las células, no recuperándose parásitos vivos a las 24 horas. El agregado de peróxido de hidrógeno 20 μ M llevó a una inhibición del crecimiento de aproximadamente un 50% al cabo de 24 horas, similar a lo reportado previamente en un trabajo de nuestro laboratorio para *T. brucei*⁸⁸, y en la bibliografía para *L. major*⁴³. Nuevamente, no se observó un fenotipo diferencial en el crecimiento, ni en la motilidad o morfología celular si comparamos la condición inducida y no inducida por tetraciclina. Se podría decir que niveles de expresión sostenidamente bajos de esta proteína no afectan la viabilidad de la forma infectiva de *T. brucei* bajo condiciones de cultivo *in vitro* tanto óptimas como subóptimas.

Investigaciones previas realizadas sobre MST de mamíferos emplearon un inhibidor de esta enzima sobre cultivos celulares para poner en evidencia la relevancia funcional de la misma⁷⁶. En este trabajo se decidió emplear una aproximación similar, esperando que este inhibidor fuera efectivo sobre la *TbMST*. Con este objetivo, parásitos de la línea celular shRNAi *TbMST* crecidos en ausencia y presencia de TET fueron tratados con 5 μ M del inhibidor de MST de mamíferos (I3-MT-3). Para los cultivos con el inhibidor, el crecimiento de la condición (+) fue un 15% menor si se compara con la condición (-) TET (**Figura 33, panel B**). Si bien alentador, este resultado preliminar debe ser tratado como tal y sometido a pruebas confirmatorias adicionales ya que: i) se requieren réplicas experimentales, ii) debe determinarse si este compuesto inhibe a la *TbMST* (ensayos con proteína recombinante). En este sentido, vale la pena aclarar que para cuando se realizó este experimento, este inhibidor no alteró la actividad de la *LmMST* recombinante *in vitro* a una concentración superior al IC_{50}

reportado para la MST de ratón. Las condiciones de este ensayo fueron 0,14 μM de enzima, 15 μM de inhibidor y 25 minutos de preincubación a 25°C (Comunicación personal: Dayana Benchoam, Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias).

Además de estudiar el crecimiento, también se analizó la expresión de la MST por *Western blot* con el fin de determinar diferencias en la expresión de la *TbMST*, en condiciones de no inducción, y en la magnitud en del silenciamiento, como consecuencia de estos tratamientos (**Figura 33, panel C**). Se compararon por densitometría sobre la membrana las diferentes bandas normalizadas por el control de carga y no se observaron diferencias en el contenido de *TbMST* entre los cultivos control y aquellos tratados con peróxido de hidrógeno. En cuanto al cultivo incubado con el inhibidor, llama la atención que la expresión de la MST es menor en ambas condiciones ((+) y (-) TET) respecto del cultivo control (no tratado con inhibidor), pero además la razón (-)/(+) TET es aproximadamente el doble que para los otros dos cultivos mencionados anteriormente. Sin embargo, con solo 1 experimento, es difícil intentar buscar una explicación a este fenómeno. Para asegurar una significancia y reproducibilidad, el experimento debería repetirse, y con diferentes réplicas en paralelo.

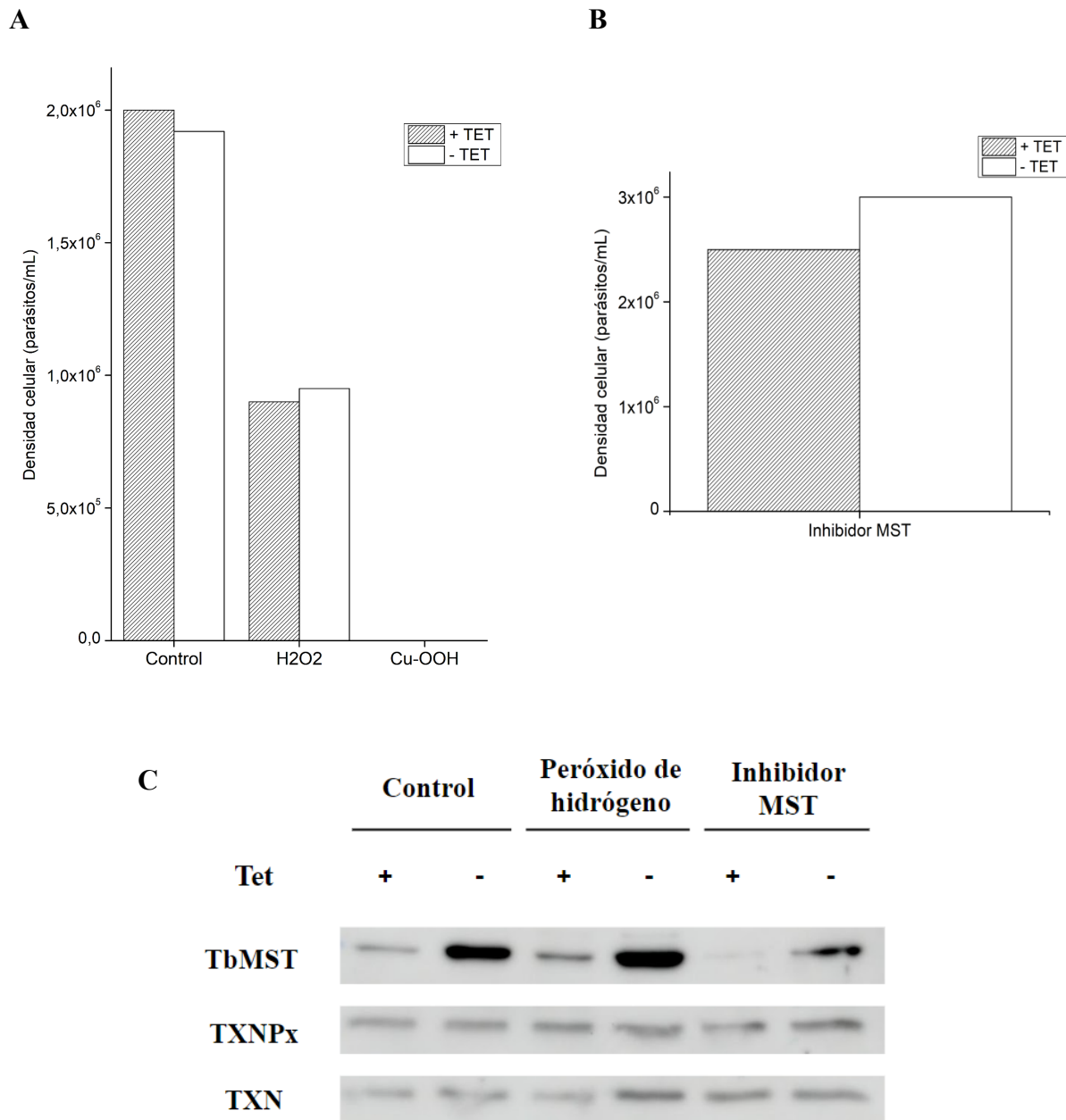


Figura 33. Crecimiento de la línea shRNAi *TbMST* (449) de *T. brucei* y expresión de *TbMST* luego de 24 horas de crecimiento en presencia de diferentes estímulos. La densidad de partida del cultivo fue de 3×10^5 parásitos/mL, y se utilizó el clon 2 shRNAi *TbMST*, derivado de la línea 449. **(A)** Densidad celular luego de 24 horas de incubación con sustancias generadoras de estrés oxidativo (20 μ M de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o 1 μ M de hidroperóxido de cumeno (Cu-OOH)) y para el control, cultivado en condiciones estándar para *T. brucei*. **(B)** Densidad celular luego de 24 horas de incubación con un 5 μ M de un inhibidor de la MST de mamíferos. Para todas las condiciones, se estudió el crecimiento del clon inducido (+TET) y no inducido (-TET), agregándole al mismo tiempo el inductor y los estímulos al cultivo. **(C)** A las 24 horas se estudiaron los cambios en la expresión de la enzima por *Western blot* para las distintas condiciones. Se sembró el extracto correspondiente a 2 millones de parásitos en cada carril. Como control de carga se utilizaron las proteínas triparredoxina (TXN) y triparredoxina peroxidasa (TXN Px). La detección se realizó utilizando una dilución 1:500 del suero anti-*TbMST* o 1:32.000 de los sueros anti-TXN Px y anti-TXN.

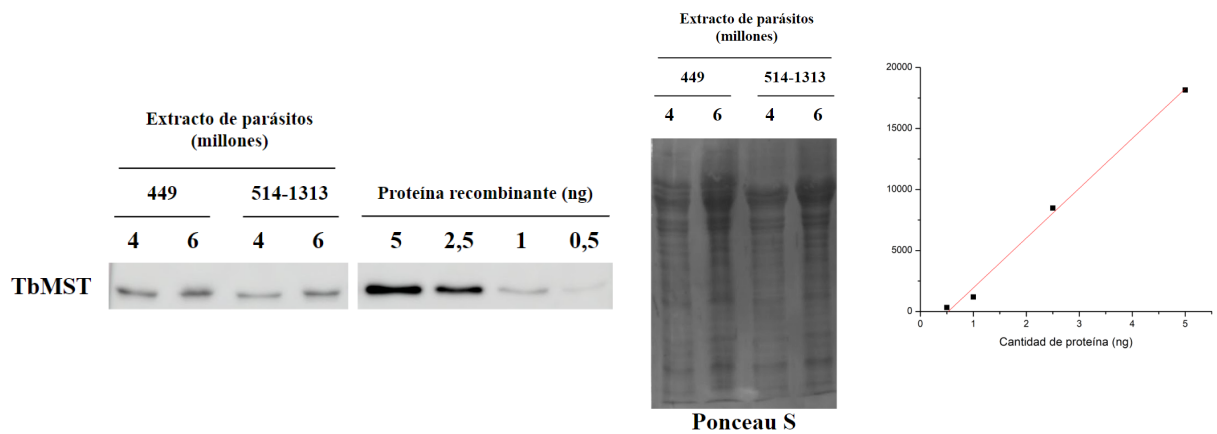
4.7 Determinación de la concentración intracelular de la *TbMST*

Se estimó la concentración intracelular de la *TbMST* en las líneas de base 449 y 514-1313, así como en la línea shRNAi (de base 449) por *Western blot*. Para los estudios con esta última se utilizó el clon 2 por haber sido el que mostró el mayor nivel de silenciamiento de la *TbMST*, lo cual permitió estimar la máxima regulación a la baja de la enzima conseguida con esta línea. Para esto, se cultivaron parásitos durante 48 hs, partiendo de una densidad de 10^5 parásitos/mL y luego se realizó la cosecha. Para el caso de la línea shRNAi, la inducción se mantuvo durante las 48 hs de cultivo.

Se sembraron en paralelo extractos de parásitos y diferentes cantidades conocidas de *TbMST* recombinante a modo de curva de calibración. Para construir dicha curva se eligió en base a *Western blot* anteriores, un rango de concentración de *TbMST* recombinante (0,5 a 5 ng) que comprendiera el nivel de intensidad de señal de la banda de la *TbMST* en los extractos de parásitos. Los resultados se muestran en la **Figura 34**. En cuanto a las líneas de base, para obtener una mejor estimación, se sembraron dos cantidades distintas de parásitos y la masa de la enzima fue estimada realizando un promedio (normalizando por la cantidad de parásitos).

A partir de esta masa calculada, teniendo en cuenta el peso molecular de la *TbMST*, y considerando el volumen celular de 58 femtolitros reportado para *T. brucei* BSF⁸⁹, podemos estimar una concentración intracelular aproximada de 80 nM y 95 nM para las líneas de base 514-1313 y 449 respectivamente. Esta estimación solo es válida asumiendo que la enzima se distribuye de manera homogénea en todo el citosol, como parece ser el caso en base a lo observado por inmunofluorescencia (ver **sección 4.8**). Para la línea shRNAi, la concentración intracelular de la *TbMST* en condiciones de no inducción fue similar a la estimada para la línea de base correspondiente. Sin embargo, no es posible conocer la concentración de la condición inducida a través de interpolación en la curva de calibración ya que la masa de la banda se encuentra por debajo del primer punto de dicha curva. No obstante, del análisis de densitometría se desprende que la banda correspondiente a la condición (+) TET representa un 10% de la banda (-) TET, lo cual sugiere que el silenciamiento de *TbMST* logrado en este clon fue de aproximadamente un 90%.

A



B

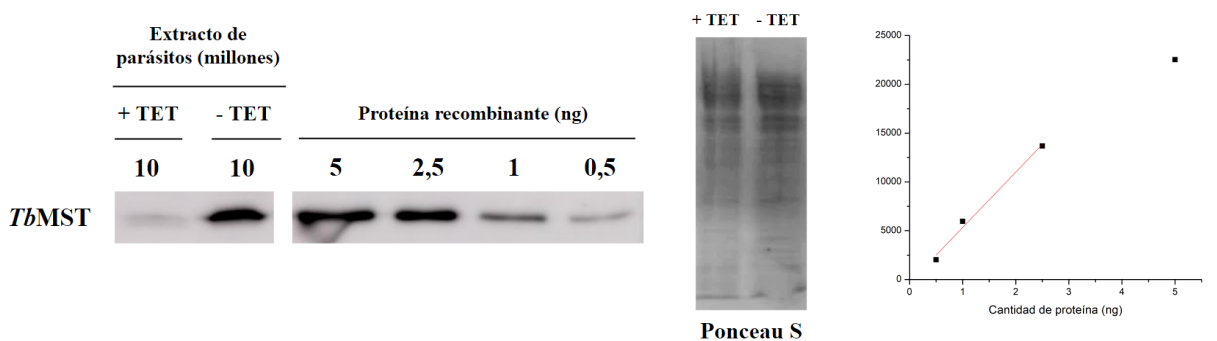


Figura 34. Determinación del contenido intracelular de *TbMST* en las líneas 449, 514-1313 y en la línea *shRNAi TbMST* de *T. brucei*. Los parásitos fueron cosechados luego de 48 hs de cultivo, partiendo de una densidad de 10^5 parásitos/mL. Se analizaron por *Western blot* los lisados de parásitos correspondientes a dichas líneas, y las bandas de la proteína detectada fueron analizadas por densitometría. Se construyeron curvas de calibración con diferentes cantidades de la *TbMST* recombinante y se realizó un ajuste lineal. Los valores obtenidos por densitometría se interpolaron en las curvas de calibración para obtener la concentración intracelular de la enzima. **(A)** *Western blot* y curva de calibración para las líneas de base 449 y 514-1313 ($R^2 = 0,993$). **(B)** *Western blot* y curva de calibración para el clon 2 de la línea *shRNAi TbMST* ($R^2 = 0,989$). La tinción con Ponceau S permite la tinción de las proteínas totales presentes en la membrana.

4.8 Localización subcelular de la *TbMST* endógena

Para estudiar la localización de la *TbMST* endógena se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IF) indirecta sobre la línea 449, usando como anticuerpo primario el suero murino anti-*TbMST* generado en este trabajo. Dado lo reportado en la bibliografía para la localización de la *MST*, se emplearon como marcadores de localización citosólica y mitocondrial a la *TXN Px* y el reactivo mitotracker, respectivamente. Como se observa en las **Figura 35**, la *TbMST* se distribuye a lo largo de toda la célula, salvo en los compartimentos correspondientes al núcleo y kinetoplasto. También parecería haber un área entre núcleo y kinetoplasto que no tiene marca para la *TbMST*. La disposición de esta enzima es homogénea en el parásito, ya que la intensidad del fluoróforo prácticamente no varía en el citosol (excluyendo las áreas antes mencionadas).

Luego se realizó un análisis de colocalización sobre el *stack* completo de imágenes obtenidas. Se considera que dos proteínas colocalizan si se encuentran en el mismo compartimento espacial. Si los compartimentos se encuentran bien separados espacialmente, una aproximación visual podría funcionar como primera estimación para discriminar si existe o no colocalización. Sin embargo, si los compartimentos no son visualmente distintos, se necesita realizar un análisis cuantitativo⁹⁰. Este es el caso para la *TbMST* y la *TXN Px*, donde si se mira la superposición de las marcas, podría pensarse que existe colocalización de ambas. Para el caso de la *TbMST* y la mitocondria, el análisis de superposición de imágenes sugiere una localización parcial pero no total de la *TbMST* en la mitocondria del parásito.

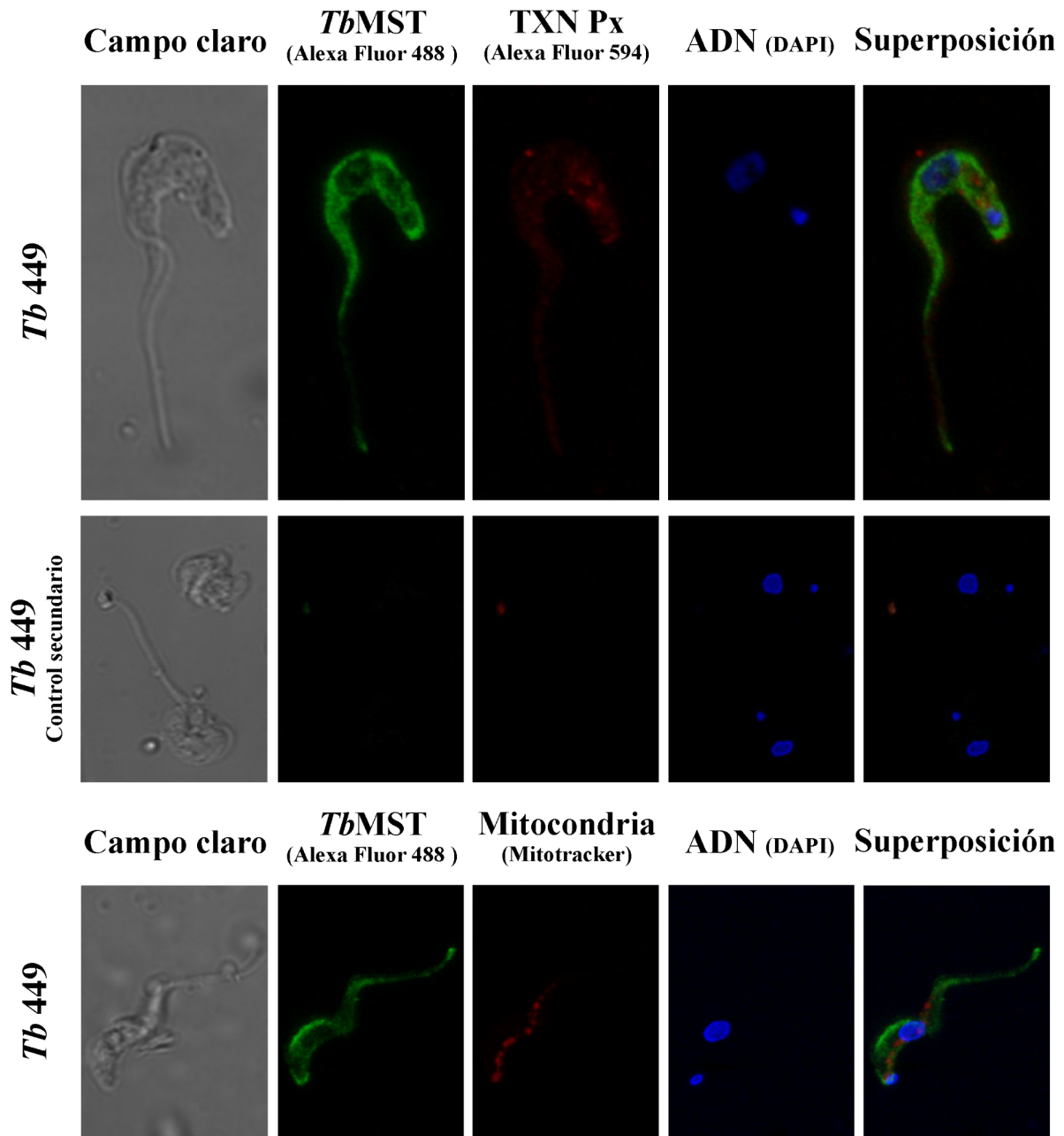


Figura 35. Localización subcelular de la *TbMST* en la línea 449. En la figura se muestran imágenes de IF de microscopía confocal. Se emplearon parásitos en fase exponencial tardía. Para marcar la *TbMST* se utilizó un anticuerpo primario anti-*TbMST* (dil 1:250) y uno secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde) (1:1000), para marcar a la TXN Px (proteína citosólica) se utilizó un anticuerpo primario anti-TXN Px (dil 1:1000) y uno secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 594 (rojo) (1:1000), y para marcar la mitocondria se utilizó el colorante fluorescente Mitotracker. Además, se utilizó DAPI para teñir el ADN (azul) nuclear y mitocondrial (kinetoplasto). El control secundario se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para las otras células, omitiendo la incubación con el anticuerpo primario.

Para el análisis cuantitativo de colocalización se utilizó el plugin JACoP del programa Fiji. La ventaja de este plugin frente a otras herramientas de colocalización disponibles en el mismo programa, es que permite definir umbrales manuales. Esto asegura que el “ruido” de la imagen no sea considerado en el análisis ya que podría falsear los resultados obtenidos. El análisis se basó en el estudio del coeficiente de correlación de Pearson (CCP) y los coeficientes de Manders (M1 y M2) para estudiar la colocalización de las marcas correspondientes a la MST y TXN Px o MST y mitocondria. El CCP es uno de los estándares usados para describir el grado de solapamiento entre dos patrones. Su valor varía desde +1 a -1, con +1 siendo total correlación positiva y -1 total correlación negativa, con cero significando no correlación⁹¹. Si bien es útil como primera aproximación, no es suficiente. Una característica de este coeficiente es que no es sensible a las diferentes intensidades. Por ejemplo, si la intensidad de la marca roja es la mitad de la verde, el CCP nunca será 1, por más de que exista una correlación perfecta entre ellas. Es por eso que también se calcularon los coeficientes de Manders, que definidos como los coeficientes de colocalización, pueden ser determinados cuando las intensidades de señales de las distintas marcas difieren fuertemente⁹². Estos coeficientes varían desde 0 a 1, el primero corresponde a imágenes no solapantes, y el último refleja 100% de colocalización entre ambas imágenes. Los coeficientes de Manders dan información acerca de qué proporción de un fluoróforo colocaliza con el otro, M1 indica qué proporción de la marca roja se solapa con la verde y M2 *vice versa*⁹¹. Mientras que el significado de los valores extremos de cualquiera de estos coeficientes es generalmente claro, los valores intermedios son difíciles de interpretar, excepto cuando se usan en estudios comparativos⁹³.

A modo de validación, también se realizó el Test de randomización de Costes, que es una comparación estadística para eliminar la hipótesis de colocalización por azar. Básicamente, se generan imágenes aleatorias reordenando los píxeles de la imagen original, y se calculan nuevos CCP. Estos son comparados con el original y se calcula la significancia (p-valor). El p-valor, expresado como porcentaje se correlaciona inversamente con la probabilidad de haber obtenido el CCP de la imagen original por azar. Si el 95% de los CCP obtenidos a partir de las imágenes randomizadas son peores que el CCP para la imagen original, entonces los coeficientes de Manders son confiables^{94,95}. Para la randomización de Costes se definió que el programa genere 100 imágenes aleatorias para establecer la comparación. Los valores obtenidos con el programa se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Resultados del análisis cuantitativo de colocalización realizado con el programa Fiji y el plugin JACoP. Se muestran los coeficientes de Manders (M1 y M2), el coeficiente de correlación de Pearson y el p-valor arrojado para el Test de randomización de Costes.

Muestra	M1	M2	Coeficiente de correlación de Pearson	Test de Costes (%)
<i>TbMST</i> -mitocondria	0,830	0,296	0,414	100
<i>TbMST</i> -TXN Px	0,807	0,907	0,772	100

El valor del coeficiente de Pearson de *TbMST*-mitocondria no permite extraer conclusiones por sí mismo ya que es menor a 0,5. Si se lo compara con el obtenido para *TbMST*-TXN Px, este último se acerca más al valor de una correlación perfecta (+1). Es importante notar que, aunque existiera colocalización total entre estas dos marcas, el CPP nunca sería (+1) en este caso porque la marca de la TXN Px (rojo) no es igual de intensa que la marca correspondiente a la *TbMST* (verde). Para los dos CPP, el p-valor del Test de Costes fue 100%, es decir que la probabilidad de que los valores sean producto del azar es 0. En cuanto a los coeficientes de Manders, el M1 que representa la proporción de la marca roja que colocaliza con la verde, es alto y similar en ambos casos. Con respecto a M2, que representa la proporción de marca verde que colocaliza con la roja, este valor es significativamente mayor para *TbMST*-TXN Px que para *TbMST*-mitocondria. Por sí solo, este último valor no permite extraer conclusiones acerca de la colocalización, pero al realizar la comparación, es claro que el solapamiento de las marcas entre *TbMST* y TXN Px es mejor que el solapamiento para la *TbMST* y la mitocondria.

Tomando todo esto en consideración, se puede concluir que las proteínas *TbMST* y TXN Px colocalizan en las imágenes analizadas ya que su correlación y su solapamiento obtenido por los valores del coeficiente de Pearson y los coeficientes de Manders fueron muy buenos. Al ser la TXN Px una proteína citosólica, se extrae del análisis que la *TbMST* también lo es. Esta enzima parecería no ser mitocondrial. Sin embargo, no es posible asegurarlo ya que los valores obtenidos de colocalización para la *TbMST* y la mitocondria no son concluyentes por sí mismos. Si bien estos valores no fueron de utilidad para este propósito, sí fueron útiles para realizar la comparación con los valores obtenidos para la *TbMST* y TXN Px, y tener mayor certeza sobre la localización citosólica de la *TbMST* en el parásito.

5. Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo se generaron herramientas valiosas para la caracterización de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa de *T. brucei*: i) se diseñó una construcción para la expresión de la *TbMST* en *E. coli*, y se logró expresar esta proteína en forma soluble y en grandes cantidades; ii) se produjo un suero murino anti-*TbMST*, empleando la proteína recombinante; iii) se generaron líneas transgénicas sobre la forma BSF monomórfica de *T. brucei*: una línea sobreexpresante y una ARNi, para la *TbMST*.

La enzima recombinante de *E. coli* pudo ser obtenida con un buen grado de pureza, de alrededor del 95%. Se estudió la actividad de la *TbMST* empleando cianuro como aceptor de azufre y se mostró que esta actividad es comparable a lo reportado en la bibliografía para la *MST* de otro tripanosomátido, *Leishmania major*. Como se mencionó en la **sección 2.7**, aún no se ha determinado cuál sería el aceptor fisiológico de las *MSTs* de tripanosomátidos. Para contribuir a una caracterización bioquímica más completa de la *TbMST*, se plantea entonces como perspectiva de este trabajo, evaluar *in vitro* la actividad de la triparredoxina y de la tiorredoxina de *T. brucei* como sustratos aceptores de azufre. Para ello se emplearía un ensayo enzimático acoplado con NADPH, triparredoxina reductasa de *T. brucei* (*TbTR*), tripanotión, y triparredoxina (*TbTXN*) o tiorredoxina (*TbTrx*) de *T. brucei*, además de la *TbMST*. En este ensayo, si la *TbTXN/TbTrx* es capaz de actuar como aceptor de azufre, la proteína se oxidará y el sistema redox consumirá entonces NADPH para reciclarla. El consumo de NADPH puede seguirse a través de la caída de absorbancia a 340 nm (a esta longitud de onda la el NADPH absorbe mientras que el NADP⁺ no). Tanto la *TbTR* como la *TbTXN* y la *TbTrx* están disponibles en forma recombinante en nuestro laboratorio.

Se pudo determinar que la forma recombinante, activa y de secuencia completa de la *TbMST* presenta un comportamiento anómalo en filtración en gel. El radio hidrodinámico observado para la proteína sugiere que la misma no presenta una conformación compatible con un monómero globular. Si bien aún faltan evidencias para poder afirmar con certeza la forma oligomérica de la *TbMST* recombinante, los resultados obtenidos en este trabajo representan el primer reporte de la conformación en solución de la forma activa de esta proteína.

Con la *TbMST* recombinante también se generó un suero murino anti-*TbMST*, que fue una herramienta clave para avanzar en la caracterización biológica de esta enzima. Se verificó que la *TbMST* endógena de *T. brucei* se expresa tanto en la fase exponencial como en la estacionaria de la forma sanguínea del parásito. En esta última fase, se estimó la concentración intracelular de la proteína, que fue aproximadamente de 80 nM y 95 nM en las dos líneas de base utilizadas (514-1313 y 449, respectivamente). Estos niveles son comparativamente inferiores a los que presentan diferentes componentes del sistema redox dependiente de tioles de estos parásitos (rango de concentración 1-100 μ M para TryS, TXN y diferentes glutarredoxinas)^{88,96}. También se confirmó que la *TbMST* se encuentra en el citosol del parásito, dado que mediante análisis de colocalización de las señales de fluorescencia, la marca correspondiente a la *TbMST* colocalizó con la marca de otra proteína citosólica: TXN Px. Dado que el análisis cuantitativo de colocalización de la *TbMST* con la mitocondria no fue concluyente, no se puede descartar una localización parcial de esta proteína en la mitocondria del parásito.

Respecto a la línea sobreexpresante generada para la *TbMST*, su caracterización se vio limitada ya que se observó el fenómeno de *leakiness* o fuga del promotor, que dio lugar a la expresión de la copia ectópica de la proteína aún en ausencia de inductor. Cabe resaltar además que las diferencias en niveles de expresión entre las dos condiciones fueron muy pequeñas. El inconveniente de no poder contar con una condición que no expresara esta proteína en ausencia de inductor imposibilitó la caracterización fenotípica *in vitro*.

La otra línea transgénica generada en este trabajo, shRNAi para la *TbMST*, no presentó los inconvenientes de la anterior, lo que permitió una caracterización más completa. Para todos los clones obtenidos se observó un marcado silenciamiento de la expresión de la enzima, llegando hasta un 90% para el clon que logró la mejor regulación a la baja. Al estudiar el crecimiento de los clones inducidos y no inducidos, no se observaron diferencias ni en condiciones estándar de cultivo ni frente a distintos estímulos, como la inducción de estrés oxidativo o el uso de un inhibidor de la MST de mamíferos. Dado que la técnica de ARNi no permite suprimir de manera total la expresión del gen, es posible que aún concentraciones bajas de la *TbMST* sean suficientes para sostener el metabolismo/funciones en el/las cual/es ésta participa. Otra posibilidad es que no se trate de una enzima esencial para el parásito, al menos en condiciones *in vitro*, ya sea porque sus funciones son prescindibles para la célula, o porque existan enzimas redundantes, que puedan suplir una deficiencia de la *TbMST*. Con

esta línea podrían realizarse ensayos de crecimiento en otras condiciones de estrés oxidativo, dado el potencial rol antioxidante de la *TbMST*, y de infección animal, donde las condiciones son claramente diferentes a las del cultivo *in vitro*, y más exigentes para el parásito dada la disponibilidad restringida de nutrientes y la presencia de la respuesta inmune del hospedero, entre otros factores. Así como la MST contribuye a la patogénesis en otros organismos, podría ocurrir algo similar para *T. brucei*, y en ese caso la infección sería ideal para probar esa hipótesis.

Por último, sería interesante explorar la actividad MST en *T. brucei*, ya sea en las líneas de base y/o en las transgénicas. Haciendo uso del ensayo enzimático empleado para evaluar la actividad de la *TbMST* recombinante, se podría intentar cuantificar la actividad 3MP:cianuro en extractos de parásitos, y observar si existen diferencias para las diferentes condiciones (cultivos inducidos y no inducidos) en las distintas líneas. También sería de interés explorar la función de biosíntesis de H_2S , intentando cuantificar la producción de esta molécula por parte del parásito. Hasta el momento no existen reportes acerca de los niveles de la producción de H_2S en *T. brucei*. Incluso, podrían estudiarse las diferencias de producción en la línea ARNi en condiciones de ausencia y presencia de inductor, para averiguar la contribución de la MST a la producción total de H_2S de la célula. Como primera aproximación, se ha probado medir el H_2S en otro tripanosomátido, *Leishmania tarentolae*, dada la certeza de que sus cultivos pueden crecer en frascos de cultivo cerrados (algo que se desconoce para *T. brucei*), y que, además, alcanzan densidades celulares mayores, dos condiciones que permiten la acumulación de H_2S y posibilitan su detección. En caso de obtenerse resultados favorables, restaría evaluar si es posible ajustar condiciones para adaptar el ensayo a *T. brucei*.

Bibliografía

1. Kaufér A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):287.
2. Deambrosi M. Glutación transferasa 1 de *Trypanosoma brucei*: Rol en la síntesis de PGE₂ y la infección. Tesis de maestría. Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). 2021.
3. Vickerman K. DEVELOPMENTAL CYCLES AND BIOLOGY OF PATHOGENIC TRYPANOSOMES. *British Medical Bulletin*. 1985;41(2):105–114.
4. Maslov D, Votýpka J, Yurchenko V, Lukeš J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol*. 2013;29(1): 43-52.
5. Simpson A, Stevens J, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):168–174.
6. Stevens J, Noyes H, Dover G, Gibson W. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 1999;118(1):107-16.
7. Lukes J, Jirků M, Doležel D, Kral'ová I, Hollar L, Maslov D. Analysis of ribosomal RNA genes suggests that trypanosomes are monophyletic. *J Mol Evol*. 1997;44(5):521-7.
8. Enfermedades tropicales desatendidas [Internet]. OMS; 2021 [citado 29 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases#:~:text=Las%20enfermedades%20tropicales%20desatendidas%20>
9. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness) [Internet]. OMS; 2022 [citado 29 de mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))
10. Stich A, Abel P, Krishna S. Clinical Review Human African tripanosomiasis. *BMJ*. 2002;325:203–6.
11. Simarro P, Cecchi G, Franco J, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo J, Fèvre E, Mattioli R, Jannin J. Estimating and Mapping the Population at Risk of Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(10), e1859.
12. Balmer O, Beadell J, Gibson W, Caccone, A. Phylogeography and Taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2), e961.
13. Büscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2017;390(10110):2397–2409.
14. What is sleeping sickness? [Internet] DNDi [actualizado marzo de 2022, citado 29 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://dndi.org/diseases/sleeping-sickness/facts/>
15. Pawlowski J. Protist evolution and phylogeny. 2014. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
16. Simarro P, Franco J, Diarra A, Jannin J. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*. 2014;6(1):257-275.

17. Brun R, Blum J, Chappuis, F, Burri, C. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 2010;375(9709):148–159.
18. Matthews K. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci*. 2005;118(2):283-290.
19. Silvester E, McWilliam K, Matthews K. The Cytological Events and Molecular Control of Life Cycle Development of *Trypanosoma brucei* in the Mammalian Bloodstream. *Pathogens*. 2017;6(3):1-19.
20. MacGregor P, Szöör B, Savill N, Matthews K. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nat. Rev. Microbiol*. 2012;10(6): 431-438.
21. Smith T, Bringaud F, Nolan D, Figueiredo L. Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle. *F1000Research*. 2017;683(6):1-12.
22. Rojas F, Silvester E, Young J, Milne R, Tettey M, Houston D, Walkinshaw M, Pérez-Pi I, Auer M, Denton H, Smith T, Thompson J, Matthews K. Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing. *Cell*. 2019;176(1-2): 306-317.
23. Mony B, MacGregor P, Ivens A, Rojas F, Cowton A, Young J, Horn D, Matthews K. Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature*. 2014;505(7585):681-685.
24. Kohl L, Bastin P. The flagellum of Trypanosomes. En: Jeong K, editor. *International Review of Cytology*. Volumen 244. París: Elsevier; 2005. 227-285.
25. Manta, B Análisis funcional de glutarredoxinas monotiólicas de tripanosomas. [Tesis de doctorado. Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. 2013. [citado: 2022, mayo].
26. Sanchez MA. Molecular identification and characterization of an essential pyruvate transporter from *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem*. 2013;288(20):14428-14437.
27. Štáfková J, Mach J, Biran M, Verner Z, Bringaud F, Tachezy J. Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*. 2016;100(3):442-56.
28. Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1236-48.
29. Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:695-729.
30. Moutiez M, Aumercier M, Schöneck R, Meziane-Cherif D, Lucas V, Aumercier P, Ouaiissi A, Sergheraert C, Tartar A. Purification and characterization of a trypanothione-glutathione thioltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1995;310 (Pt 2)(Pt 2):433-7.
31. Manta B, Comini M, Medeiros A, Hugo M, Trujillo M, Radi R. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3199-216.
32. Sardi, F. Generación y caracterización de biosensores redox para el estudio de procesos biológicos en tripanosomatidos. [Tesis de maestría. Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. 2016. [citado: 2022, julio].

33. Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C. The sulfurtransferases. *Fundam. Appl. Tech.* 1983;3(5):377-382.
34. Pedre B, Dick T. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase: An enzyme at the crossroads of sulfane sulfur trafficking. *Biol. Chem.* 2021;402(3):223-237.
35. Yadav P, Vitvitsky V, Carballal S, Seravalli J, Banerjee R. Thioredoxin regulates human mercaptopyruvate sulfurtransferase at physiologically-relevant concentrations. *J. Biol. Chem.* 2020;295(19):6299-6310.
36. Lec JC, Boutserin S, Mazon H, Mulliert G, Boschi-Muller S, Talfournier F. Unraveling the Mechanism of Cysteine Persulfide Formation Catalyzed by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases. *ACS Catalysis.* 2018;8(3):2049-2059.
37. Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life.* 2007;59(2):51-9.
38. Alphey M, Williams R, Mottram J, Coombs G, Hunter W. The crystal structure of leishmania major 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. A three-domain architecture with a serine protease-like triad at the active site. *J. Biol. Chem.* 2003;278(48):48219-48227.
39. Augsburger F, Szabo C. Potential role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)—hydrogen sulfide (H₂S) pathway in cancer cells. *Pharmacol. Res.* 2020;(154).
40. Nagahara N. Regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase activity via intrasubunit and intersubunit redox-sensing switches. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(15):1792-802.
41. Yadav P, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R. Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* 2013;20002-20013:288(27).
42. Selles B, Moseler A, Rouhier N, Couturier J. Rhodanese domain-containing sulfurtransferases: multifaceted proteins involved in sulfur trafficking in plants. *J Exp Bot.* 2019;70(16):4139-4154.
43. Williams R, Kelly S, Mottram J, Coombs G. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase of *Leishmania* contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism. *J. Biol. Chem.* 2003;278(3):1480-1486.
44. Ampola MG, Efron ML, Bixby EM, Meshorer E. Mental deficiency and a new aminoaciduria. *Am J Dis Child.* 1969;117(1):66-70.
45. Nagahara N, Sawada N. The mercaptopyruvate pathway in cysteine catabolism: a physiologic role and related disease of the multifunctional 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Curr Med Chem.* 2006;13(10):1219-30.
46. Stipanuk MH, Ueki I. Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):17-32.
47. Ubuka T, Ohta J, Akagi R, Hosaki Y, Ishimoto Y, Kiguchi S, Ikeda T, Ishino K. Metabolism of L-cysteine via transamination pathway (3-mercaptopyruvate pathway). *Amino Acids.* 1992;3(3):243-52.
48. Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev.* 2018;118(3):1253-1337.

49. Qabazard B, Li L, Gruber J, Peh MT, Ng LF, Kumar SD, Rose P, Tan CH, Dymock BW, Wei F, Swain SC, Halliwell B, Stürzenbaum SR, Moore PK. Hydrogen sulfide is an endogenous regulator of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(16):2621-30.
50. Tanizawa K. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *J. Biol. Chem*. 2011;149(4):357-359.
51. Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*. 2011;334(6058):986-90.
52. Mishra R, Kohli S, Malhotra N, Bandyopadhyay P, Mehta M, Munshi M, Adiga V, Ahuja VK, Shandil RK, Rajmani RS, Seshasayee ASN, Singh A. Targeting redox heterogeneity to counteract drug tolerance in replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Transl Med*. 2019;11(518):eaaw6635.
53. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*. 2012 Apr;92(2):791-896.
54. Banerjee R. Catalytic promiscuity and heme-dependent redox regulation of H₂S synthesis. *Curr Opin Chem Biol*. 2017;37:115-121.
55. Li M, Xu C, Shi J, Ding J, Wan X, Chen D, Gao J, Li C, Zhang J, Lin Y, Tu Z, Kong X, Li Y, Yu C. Fatty acids promote fatty liver disease via the dysregulation of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase/hydrogen sulfide pathway. *Gut*. 2018;67(12):2169-2180.
56. Nagahara N, Ito T, Minami M. Histology and Histopathology From Cell Biology to Tissue Engineering Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: Molecular properties and mode of detoxification. *Histol. Histopath*. 1999;14:1277-1286.
57. Jüdes A, Ebert F, Bär C, Thüring KL, Harrer A, Klassen R, Helm M, Stark MJ, Schaffrath R. Urmlylation and tRNA thiolation functions of ubiquitin-like Uba4-Urm1 systems are conserved from yeast to man. *FEBS Lett*. 2015;589(8):904-9.
58. Nedialkova DD, Leidel SA. Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell*. 2015 Jun;161(7):1606-18.
59. Chowdhury MM, Dosche C, Löhmannsröben HG, Leimkühler S. Dual role of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MOCS3 in tRNA thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in humans. *J Biol Chem*. 2012;287(21):17297-17307.
60. Mazet M, Morand P, Biran M, Bouyssou G, Courtois P, Daulouède S, Millerieux Y, Franconi JM, Vincendeau P, Moreau P, Bringaud F. Revisiting the central metabolism of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: production of acetate in the mitochondrion is essential for parasite viability. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(12):e2587.
61. Štáfková J, Mach J, Biran M, Verner Z, Bringaud F, Tachezy J. Mitochondrial pyruvate carrier in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*. 2016;100(3):442-56.
62. Krauth-Siegel RL, Leroux AE. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(4):583-607.
63. Marciano D, Santana M, Nowicki C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;185(2):114-20.

64. Reckenfelderbä N, Lü H, Schmidt H, Steverding D, Krauth-Siegel R. Identification and Functional Characterization of Thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.* 2000;11(17):7547-7552.
65. Karpiyevich M, Artavanis-Tsakonas K. Ubiquitin-Like Modifiers: Emerging Regulators of Protozoan Parasites. *Biomolecules.* 2020;10(10):1403.
66. Sharma V, Sharma P, Selvapandiyan A, Salotra P. Leishmania donovani-specific Ub-related modifier-1: an early endosome-associated ubiquitin-like conjugation in *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol.* 2016 Feb;99(3):597-610.
67. TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource [Internet] [actualizado abril de 2022, citado 31 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/Tb427.07.5920>
68. Teixeira SM. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(12):1503-16.
69. Zardo S. CARACTERIZACIÓN DE UNA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN TRIPANOSOMAS AFRICANOS. [Tesis de grado. Internet] Montevideo: Universidad ORT (Uruguay). 2016. [citado: 2022, julio].
70. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;99(1):89-101.
71. Atayde VD, Ullu E, Kolev NG. A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;184(1):55-8.
72. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(7):2172-5.
73. Vectors for gene expression in trypanosomes [Internet]. [citado el 1 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.zmbh.uni-heidelberg.de/Clayton/vectors.html>
74. Branchini BR, Ablamsky DM, Davis AL, Southworth TL, Butler B, Fan F., Jathoul AP, Pule MA. Red-emitting luciferases for bioluminescence reporter and imaging applications. *Anal. Biochem.* 2010;396(2):290–297.
75. Benítez D, Dibello E, Bonilla M, Comini MA. A simple, robust, and affordable bioluminescent assay for drug discovery against infective African trypanosomes. *Drug Dev Res.* 2022;83(2):253-263.
76. Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Ogasawara Y, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kimura H, Wang C, Uchiyama M, Kojima H, Okabe T, Urano Y, Shimizu T, Nagano T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H₂S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci Rep.* 2017;7:40227.
77. Rottenfusser R, Wilson EE, Davidson MW. The Point Spread Function [Internet]. [citado 1 de julio de 2022]. Disponible en: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/psf.html>
78. Huygens Imaging Academy. Point Spread Function [Internet]. [citado 1 de julio de 2022]. Disponible en: [https://svi.nl/Point-Spread-Function-\(PSF\)#contentimaging_depth-1](https://svi.nl/Point-Spread-Function-(PSF)#contentimaging_depth-1)

79. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82
80. Bolte S, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006;224(Pt 3):213-32.
81. Bujard H. Controlling gene activities via the Tet regulatory systems: A Trouble Shooting Guide [Internet] 1996 [citado el 1 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.zmbh.uni-heidelberg.de/Bujard/trouble/printingver.html>
82. Pham DH, Moretti PA, Goodall GJ, Pitson SM. Attenuation of leakiness in doxycycline-inducible expression via incorporation of 3' AU-rich mRNA destabilizing elements. *Biotechniques*. 2008 Aug;45(2):155-6, 158, 160
83. Currier RB, Ulrich K, Leroux AE, Dirdjaja N, Deambrosi M, Bonilla M, Ahmed YL, Adrian L, Antelmann H, Jakob U, Comini MA, Krauth-Siegel RL. An essential thioredoxin-type protein of *Trypanosoma brucei* acts as redox-regulated mitochondrial chaperone. *PLoS Pathog*. 2019;15(9):e1008065.
84. Merritt C, Stuart K. Identification of essential and non-essential protein kinases by a fusion PCR method for efficient production of transgenic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2013;190(1):44-9.
85. Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol*. 2000 Feb;35(3):542-52.
86. Ali JA, Tagoe DN, Munday JC, Donachie A, Morrison LJ, de Koning HP. Pyrimidine biosynthesis is not an essential function for *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *PLoS One*. 2013;8(3):e58034.
87. Clayton CE, Estévez AM, Hartmann C, Alibu VP, Field M, Horn D. Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol*. 2005;309:39-60.
88. Fiestas, M. Caracterización biológica y bioquímica de la Tripanotión Sintetasa de *Trypanosoma brucei brucei*. [Tesis de grado. Internet] Montevideo: Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. 2011. [citado: 2022, julio].
89. Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*. 1984 Apr;98(4):1178-84.
90. Costes SV, Daelemans D, Cho EH, Dobbin Z, Pavlakis G, Lockett S. Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J*. 2004;86(6):3993-4003.
91. Bolte S, Cordelières F. JACoP : Just Another Co-localization Plugin [Internet]. 2006 [citado 6 de julio de 2022]. Disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/track/jacop2.html>.
92. Manders EM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microsc*. 1993;169(3):375-382.
93. Dunn K, Kamocka M, McDonald, J. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(4):C723-42. (2011).

94. Cordelieres F, Bolte S. Experimenters' guide to colocalization studies: finding a way through indicators and quantifiers, in practice. En: Waters J, Wittman T. Quantitative Imaging in Cell Biology. 1era edición. Elsevier; 2014. pp. 395-408.
95. Bolte S, Cordelières F. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 2006;224(3):213-232.
96. Comini MA, Krauth-Siegel RL, Bellanda M. Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(7):708-22.

Anexos

Anexo 1: Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de la *TbMST* desde ADN genómico de *T. b. brucei*, cepa 427.

<u>Nombre</u>	<u>Secuencia</u>
Fo MST NcoI	5' CCATGGGCGACGGTTTGGGGCGTCTG 3'
Re MST* KpnI	5' GGTACCTTACGTGTCTATGCGAGG 3'

Anexo 2: Secuencia codificante y aminoacídica de la TbMST correspondiente a la cepa 427 de *T. brucei brucei* extraída de la base de datos TriTryDB (gene ID: Tb427.07.5920)

Secuencia codificante de la TbMST, 1125 pb

ATGCACGGTGACGGTTTGGGGCGTCTGCACCCCGGTAAGGTGTTCCCTTACCATTGACGAGATTAAAAATGGCATATCTTCCTA
TCAGATCTTCGATGTCCGCTACGACCTCCGCAATAAAGAGTACGGTATCAACCAATACAACAAAGGGCATGTGCGCGCGCCA
CATTTGTCGACTTGGATCGACACCTTAGCGGTCCCCTCGTGGAAATGCAGCAAAGCACGGCACCCCATGCCAGACCCGCACGAG
TTTGTGAGTGGTGCAAATCCAAGGGAATTGGCCACTTCAAGCCCGTCTTTGCTACGATGACGAATGTGGGGCGATGGGGC
GTGTCGGATGTGGTGGATGCTCAACGCCCTTGGTGTGAGGCTTACGTAATGACATGTGGACTCAAGGCGTATGAAGCAGCAG
GTCTGCCCGTCGAGTCCACACCGTATGACAAGAACCAATCGACAAGCTATTGGCCTTACGCAACAGAGTTAAGAGGCTGTTG
AAAATCAAAGACATTCCTCCCTGCGCACATATGGTTCGACACACGACCCGCGCTGCGCTTCAACACGACCGTGCACACATACGG
ACCCGACGATATCCCTGGTCATATCGAAGGCGCGGTCAACCTTCCGTACGATGTGAACATATTGTTAGTAAATCGGCACGAAA
AACGTTTGAGACCCAATGACGAATGTCGTAGTAACACTCTTAAGCTTCTTCAAGGAATGTGGGGTGGCGGTGAGCCTAATATT
TCCCCTGCGTATTTTACTGCGGTAGTGGGGTGACCGCTGCATTCAGCATTCAGATTGCATATCACGTCGGACTCGGCGAGCC
CTATCTATATGCCGGTTCGTGGTCCGAATATGCAGACACATTTAACTTTTACTGCGCGCCCGTATCATTAAGAGCAGCGCT
TGCTCATAAGCATGGTCTCATCAAGTTTGCCGTATAACATGAAAGCTACTCTTAACAACGTTACCCTTGTGTTGATGGTGTG
GTTGTAAACAATCCTGATGAGGAACGAAACAGGCGCTAGTGCACCTCCACATTGGTGAAAAAGCACATGTAACGTTCAAAG
TCAGCGACAGGCTGTCATAGAGGCTCATCCTCGCATAGACACGTAA

Secuencia aminoacídica de la TbMST, 374 aa

MHGDGLGRLHPGKVFLLTIDEIKNGISSYQIFDVRDYLNRKEYGINQYKNGHVARATFVDLDRHLSGPVVECSKARHPMPDPHE
FVEWCKSKGIGHFKPVLCDDECGAMGACRMWWMLNALGVEAYVMTCKGLKAYEAAGLPVESTPYDKNQSTSYWPHYATEFKRLL
KIKDIPPCAHMVDTRPALRFNTTVPYGPDDIPGHIEGAVNLPYDVNILLVNRHEKRLRPNDECRSNTLKLQGMWGGGEPNI
SHCVFYCGSGVTAAFSIAVAYHVGLGEPYLYAGSWSEYADTFNFTLARRIIKEHGLLISMVSSSLPYNMKATLNNVTLVVDGV
VVNNPDEELKQALVHLHIGEKAVTFKSQRQAVIEAHPRIDT*

Nota: En la secuencia aminoacídica, se encuentra subrayado el sitio activo de la enzima, y en rojo las cisteínas presentes (10).

Anexo 3: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína de fusión TrxA-TbMST codificada por la construcción pET-Trx1b_TbMST usado para expresar la TbMST en *E. coli*.

Secuencia nucleotídica de la proteína de fusión TrxA-TbMST de pET-Trx1b_TbMST, 1524 pb

```
atgagcgcataaaaattattcacctgactgacgacagttttgacacggatgtactcaaagcggacggggcgatcctcgatgattt
ctgggcagagtggtgcggtccgtgcaaaaatgatcgccccgattctggatgaaatcgctgacgaatatcagggcaaaactgaccg
ttgcaaaactgaacatcgatcaaaaccctggcactgcccgaaatatggcatccgtggtatcccgaactctgctgctgttcaaa
aacgggtgaagtggcggcaaccaaagtgggtgcaactgtctaaaggctcagttgaaagagttcctcgacgctaaacctggccggatc
tggcagtggttctggtcatcaccatcaccatcactccgcgggtagcagagaatctttatctttcagggcgccATGGGCGACGGTT
TGGGGCGTCTGCACCCGGTAAGGTGTTCCCTTACCATTGACGAGATTA AAAATGGCATATCTTCCTATCAGATCTTCGATGTC
CGCTACGACCTCCGCAATAAAGAGTACGGTATCAACCAATAACAACAAAGGGCATGTGCGCGCGCCACATTTGTGACTTGGA
TCGACACCTTAGCGGTCCCGTCGTGGAATGCAGCAAAGCACGGCACCCCATGCCAGACCCGCACGAGTTTGTGAGTGGTGCA
AATCCAAGGGAATTGGCCACTTCAAGCCCCTCTTTGTACGATGACGAATGTGGGGCGATGGGGGCGTGTGCGGATGTGGTGG
ATGCTCAACGCCCTTGGTGTGAGGCTTACGTAATGACATGTGGACTCAAGGCGTATGAAGCAGCAGGTTCTGCCCGTCGAGTC
CACACCGTATGACAAGAACCAATCGACAAGCTATTGGCCTTACGCAACAGAGTTTAAAGAGGCTGTTGAAAATCAAAGACATTC
CTCCCTGCGCACATATGGTTCGACACACGACCCGCGCTGCGCTTCAACACGACCGTTCGACCATACGGACCCGACGATATCCCT
GGTCAATATCGAAGGCGGGTCAACCTTCCGTACGATGTGAACATATTGTTAGTAAATCGGCACGAAAAACGTTTGGAGACCAA
TGACGAATGTGCTAGTAAACTCTTAAGCTCCTTCAAGGAATGTGGGGTGGCGGTGAGCCTAATATTTCCCACTGCGTATTTT
ACTGCGGTAGTGGGGTAGCCGCTGCATTCAGCATTGCAGTTGCATATCACGTCGGACTCGGCGAGCCCTATCTATATGCCGGT
TCGTGGTCCGAATATGCAGACACATTTAACTTTACTTGGCGCGCCGTATCATTAAAGAGCACGGCTTGCTCATAAGCATGGT
CTCATCAAGTTTGGCGTATAACATGAAAGCTACTCTTAAACAACGTTACCCTTGTTGTTGATGGTGTGGTTGTAACAATCCTG
ATGAGGAACTGAAACAGGCGCTAGTGCACCTCCACATTTGGTGAAAAGCACATGTAACGTTCAAAGTCAGCGACAGGCTGTC
ATAGAGGCTCATCTCGCATAGACAGTAA
```

Secuencia aminoacídica de la proteína de fusión TrxA-TbMST de pET-Trx1b_TbMST, 507 aa

```
MSDKIIHLTDDSFDTDLVKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFK
NGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGSGHHHHHHHSAGSENLYFOGAMGDGLGRLHPGKVFLTIDEIKNGISSYQIFDV
RYDLRNKEYGINQYKNGHVARATFVDLDRHLSGPVVECSKARHPMPDPHEFVWCKSKGIGHFKPVLCYDDECGAMGACRMWW
MLNALGVEAYVMTGCLKAYEAAGLPVESTFPYDKNQSTSYPYATEFKRLLKIKDIPCAHMVDTRPALRFNTTVRYPYGPDDIP
GHIEGAVNLPYDVNILLVNRHEKRLRPNDECRSNTLKLQGMWGGGEPNISHCVFYCGSGVTAAFSIAVAYHVGLGEPYLYAG
SWSEYADTFNFTLARRI I KEHGLLISMVSSSLPYNMKATLNNVTLVVDGVVVNNPDEELKQALVHLHIGEKAVTFKSQRQAV
IEAHPRIDT*
```

Nota: En ambas secuencias, en verde se encuentra señalada la secuencia de la TrxA, en celeste la cola de histidinas, subrayado el sitio de corte de TEVp, y en negrita la secuencia de la TbMST. Nótese que estas secuencias de la TbMST difieren mínimamente de la correspondiente a la cepa de *T. brucei*

brucei 427 (**Anexo 2**), teniendo modificado el inicio del extremo N-terminal (conteniendo los aminoácidos MGDG en lugar de MHGDG). Estas modificaciones mínimas derivan de la necesidad de incorporar un sitio NcoI en 5' como parte de la estrategia de clonado empleada.

Anexo 4: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína *TbMST_c-myc₂* codificada por la construcción pHD 1700_ *TbMST_c-myc₂* usado para expresión en *T. brucei*.

Secuencia nucleotídica de la proteína *TbMST* de pHD 1700_ *TbMST_c-myc₂*, 1200 pb

ATGGGCGACGGTTTGGGGCGTCTGCACCCCGGTAAGGTGTTCCCTTACCATTGACGAGATTAAAAATGGCATATCTTCCTATCA
GATCTTCGATGTCCGCTACGACCTCCGCAATAAAGAGTACGGTATCAACCAATACAACAAAGGGCATGTCGCGCGGCCACAT
TTGTCGACTTGGATCGACACCTTAGCGGTCCCGTCTGGAATGCAGCAAAGCACGGCACCCCATGCCAGACCCGCACGAGTTT
GTCGAGTGGTGAAATCCAAGGGAATTGGCCACTTCAAGCCGTCCTTTGCTACGATGACGAATGTGGGGCGATGGGGGCGTG
TCGGATGTGGTGGATGCTCAACGCCCTTGGTGTGAGGCTTACGTAATGACATGTGGACTCAAGGCGTATGAAGCAGCAGGTC
TGCCCGTCGAGTCCACACCGTATGACAAGAACCAATCGACAAGCTATTGGCCTTACGCAACAGAGTTTAAAGAGGCTGTTGAAA
ATCAAAGACATTCTCCCTGCGCACATATGGTTCGACACACGACCCGCGCTGCGCTTCAACACGACCGTGGCACCATACGGACC
CGACGATATCCCTGGTCATATCGAAGCGCGGTCAACCTTCCGTACGATGTGAACATATTGTTAGTAAATCGGCACGAAAAAC
GTTTGAGACCCAATGACGAATGTCGTAGTAACACTCTTAAAGCTCCTTCAAGGAATGTGGGGTGGCGGTGAGCCTAATATTTCC
CACTGCGTATTTTACTGCGGTAGTGGGGTGACCGCTGCATTGAGCATTGAGTTCATATCACGTGGACTCGGCGAGCCCTA
TCTATATGCCGGTTCGTGGTCCGAATATGCAGACACATTTAACTTTACTGCGCGCCGTATCATTAAAGAGCACGGCTTGC
TCATAAGCATGGTCTCATCAAGTTTGCCTATAACATGAAAGCTACTCTTAAACAACGTTACCCTTGTGTTGATGGTGTGGTT
GTAAACAATCTGATGAGGAACTGAAACAGGCGCTAGTGCACCTCCACATTGGTGAAAAAGCACATGTAACGTTCAAAAGTCA
GCGACAGGCTGTGATAGAGGCTCATCTCGCATAGACACGggatccaacgagcaaaaagctcatttctgaagaggacttgtaa
ttaacgagcaaaaagctcatttctgaagaggacttgtaa

Secuencia aminoacídica de la proteína *TbMST_c-myc₂* de pHD 1700_ *TbMST_c-myc₂*, 399

aa

MGDGLGRLHPGKVFLTIDEIKNGISSYQIFDVRYDLRNKEYGINQYNKGHVVARATFVDLDRHLSGPVVECSKARHPMPDPHEF
VEWCKSKGIGHFKPVLICYDDECGAMGACRMWMLNALGVEAYVMTCLKAYEAAGLPVESTPYDKNQSTSYWPYATEFKRLLK
IKDIPCAHMDTRPALRENTTVRPYGPDDIPGHIEGAVNLPYDVNILLVNRHEKRLRPNDECRSNTLKLQGMWGGGEPNIS
HCVFYCGSGVTAAFSIAVAYHVGLGEPYLYAGSWSEYADTFNFTLARRIKEHGLLISMVSSSLPYNMKATLNNVTLVVDGVV
VNNPDEELKQALVHLHIGEKAVTFKSQRQAVIEAHPRIDTGSNEQKLISEEDLLINEQKLISEEDL*

Nota: En ambas secuencias, en violeta se encuentra señalada la doble etiqueta de c-myc y en negrita la secuencia de la *TbMST*. Nótese que, dado que esta construcción deriva de la construcción pET-Trx1b_ *TbMST* la secuencia de la *TbMST* contiene las mismas modificaciones mínimas en su N-terminal que las descritas en la figura anterior.

Anexo 5: Secuencia nucleotídica del shRNAi *TbMST* contenida en el vector pHD 677_shRNAi *TbMST* usado para expresión en *T. brucei*.

Secuencia nucleotídica del shRNAi para *TbMST* de pHD 677_shRNAi *TbMST*, 862 pb

AAGCTTCTTCAAGGAATGTGGGGTGGCGGTGAGCCTAATATTTCCCACTGCGTATTTTACTGCGGTAGTGGGGTGACCGCTGC
ATTTCAGCATTGCAGTTGCATATCACGTTCGGACTCGGCGAGCCCTATCTATATGCCGGTTCGTGGTCCGAATATGCAGACACAT
TTAACTTTACACTGGCGCGCGTATCATTAAGAGACACGGCTTGCTCATAAGCATGGTCTCATCAAGTTTGCCGTATAACATG
AAAGCTAtccggctgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataaccctt
ggggcctctaaacgggtcttgaggggttttttggctgaaaggaggaactatatccggatatcccgcaagaggcccggcagtacc
ggcataaccaagcctatgcctacagcatccaggggtgacgggtgccgaggatgacgatgagcgcattgttagatttcatacacgg
tgctgactgcgtagcaatthaactgtgataaactaccgcattaaagcatatcgatgataagctgtcaaacatgagaattct
tgaagacgaaagggcctcgtgatacTAGCTTTCATGTTATACGGCAAACCTTGATGAGACCATGCTTATGAGCAAGCCGTGCTC
TTTAATGATACGGCGCGCCAGTGTAAGTTAAATGTGTCTGCATATTCGGACCACGAACCGGCATATAGATAGGGCTCGCCGA
GTCCGACGTGATATGCAACTGCAATGCTGAATGCAGCGGTCACCCCACTACCGCAGTAAAATACGCAGTGGGAAATATTAGGC
TCACCGCCACCCACATTCCTTGAAGGTTAAC

Nota: En mayúscula se marcan las secuencias sentido y antisentido del tallo del shRNAi (reversa y complementaria de la secuencia sentido), separadas por la secuencia correspondiente al bucle (en minúscula).

Anexo 6

Análisis de la secuencia del inserto clonado en el vector pCR2.1-TOPO para la colonia 9

SECUENCIA 22-PCR2.1col9_M13F_MB

nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnTGGGCnCTAGnnGCATGCTCGAGCGnCCGCCAGTGTGATGGATATnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnTTC
 CATGGGCGACGGTTTGGGGCGTCTGCACCCCGGTAAGGTGTTCCTTACCATTGACGAGATTAATAATGGCATATCTT
 CCTATCAGATCTTCGATGTCCGCTACGACCTCCGCAATAAAGAGTACGGTATCAACCAATACAACAAAGGGCATGTC
 GCGCGCGCCACATTTGTGCGACTTGGATCGACACCTTAGCGGTCCCGTCGTGGAATGCAGCAAAGCACGGCACCCCAT
 GCCAGACCCGCACGAGTTTGTGCGAGTGGTCAAATCCAAGGGAATTGGCCACTTCAAGCCCGTCTTTGCTACGATG
 ACGAATGTGGGGCGATGGGGGCGTGTGCGATGTGGTGGATGCTCAACGCCCTTGGTGTGAGGCTTACGTAATGACA
 TGTGGACTCAAGGCGTATGAAGCAGCAnGTCTGCCCGTCGAGTCCACACCGTATGACAAGAACCAATCGACAAGCTA
 TTGGCCTTACGCAACAGAGTTTAAGAnGCTGTTGAAAATCAAAGACATTCCTCCCTGCGCACATATGGTTCGACACAC
 GACCCGCGCTGCGCTTCAACACGACCGTGCACCATACnGACCCGACGATATCCCTGGGTTCATATCnAAGGCGCGGn
 CAACCTTCCnACnATGnGAACATATGTTAnTAAATCnGCACnAAAAACnTTTGAnnnCCCAAnnnCnAAnnnCn
 nAnnnACACTnTTAAAnCTTnTTCnAGGAnnnnnGGGGGnnGGnGGnnnnCnnAAAnATTTCCACnnnnnnTTTTACn
 nnnnnnnnnGGGnnnnnCnnnnnnnnTTCnnnnTnnCCnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnCnnnnnnnnnnCnnnn

Dado que el inserto en esta clona se encuentra en sentido (-) y el primer M13F hibrida del lado 3' del inserto, la secuencia de TbMST se va a leer en alguno de los 3 marcos 5'-3'. Traducción:

5'3' Frame 1

XXXXXGX-XHARAXASVMDXXXXXXXXSMGDGLGRLHPGKVFLLTIDEIKNGISSYQIFDVRYDLRNKEYGINQYKNGHV
 ARATFVDLDRHLSGPVVECSKARHPMPDPHEFVEWCKSKGIGHFKPVL CYDDECGAMGACRMWMLNALGVEAYVMT
 CGLKAYEAAAXLPVESTPYDKNQSTSYPYATEFKXLLKIKDIPPCAHMVDTRPALRFNTTVPYXPDDIPGSYXRRX
 QPSXXEHIVXKXAKNX-XPXXXXXXXXTXXLXXGXXGXXXXXXI SHXXFYXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Blast: Protein Sequence

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
419 bits(1076)	2e-153	Compositional matrix adjust.	196/199(98%)	196/199(98%)	0/199(0%)
Query 1	MGDGLGRLHPGKVFLLTIDEIKNGISSYQIFDVRYDLRNKEYGINQYKNGHVARATFVDLD				60
Sbjct 1				60
Query 61	RHLSGPVVECSKARHPMPDPHEFVEWCKSKGIGHFKPVL CYDDECGAMGACRMWMLNAL				120
Sbjct 61				120
Query 121	GVEAYVMT CGLKAYEAAAXLPVESTPYDKNQSTSYPYATEFKXLLKIKDIPPCAHMVDTR				180
Sbjct 121G.....R.....				180
Query 181	PALRFNTTVPYXPDDIPG				199
Sbjct 181G.....				199

Blast:Nucleotide Sequence

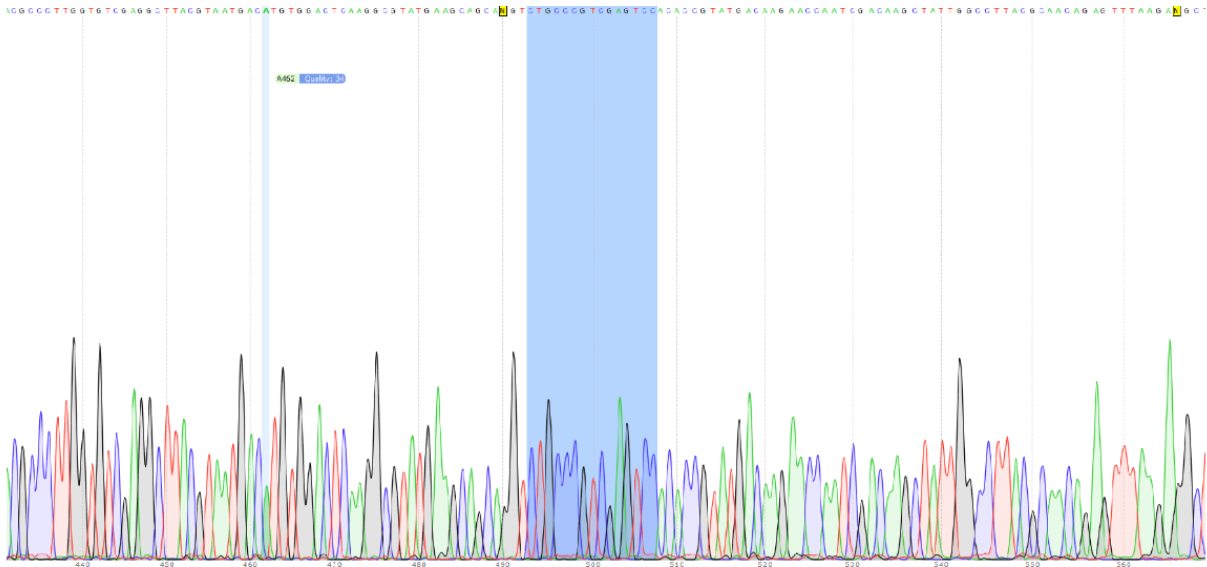
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1086 bits(588)	0.0	591/594(99%)	0/594(0%)	Plus/Plus
Query 79	ATGGGCGACGGTTTGGGGCGTCTGCACCCCGGTAAGGTGTTCCCTTACCATTGACGAGATT	138		
Sbjct 1	60		
Query 139	AAAAATGGCATATCTTCCTATCAGATCTTCGATGTCCGCTACGACCTCCGCAATAAAGAG	198		
Sbjct 61	120		
Query 199	TACGGTATCAACCAATACAACAAAGGGCATGTCGCGCGCCACATTTGTCGACTTGGAT	258		
Sbjct 121	180		
Query 259	CGACACCTTAGCGGTCCCCTCGTGGGAATGCAGCAAAGCACGGCACCCCATGCCAGACCCG	318		
Sbjct 181	240		
Query 319	CACGAGTTTGTGCGAGTGGTGCAAATCCAAGGGAATTGGCCACTTCAAGCCCCTCTTTGC	378		
Sbjct 241	300		
Query 379	TACGATGACGAATGTGGGGCGATGGGGCGTGTGCGATGTGGTGGATGCTCAACGCCCTT	438		
Sbjct 301	360		
Query 439	GGTGTGAGGCTTACGTAATGACATGTGGACTCAAGGCGTATGAAGCAGCANGTCTGCC	498		
Sbjct 361G.....	420		
Query 499	GTCGAGTCCACACCGTATGACAAGAACCAATCGACAAGCTATTGGCCTTACGCAACAGAG	558		
Sbjct 421	480		
Query 559	TTTAAGANGCTGTTGAAAATCAAAGACATTCTCCCTGCGCACATATGGTCGACACACGA	618		
Sbjct 481G.....	540		
Query 619	CCCGCGCTGCGCTTCAACACGACCGTGCACCATACNGACCCGACGATATCCCT	672		
Sbjct 541G.....	594		

Los 3 aminoácidos que faltan en la secuencia se corresponden con 3 bases nitrogenadas que no fueron bien leídas en la secuenciación. Los dos primeros pueden reconstruirse con el cromatograma proveniente de la secuenciación. No hace falta reconstruir el tercero ya que quedará cubierto por la secuencia obtenida con el primer M13R.

- Reconstrucción de GLPVES:

ggt	ctg	ccc	gtc	gag	tcc
G	L	P	V	E	S

Entonces en el cromatograma debería leer: **ggt** ctg ccc gtc gag tcc y así es:



- Reconstrucción de RLLKIKD:

<u>agg</u>	ctg	ttg	aaa	atc	aaa	gac
R	L	L	K	I	K	D

Entonces en el cromatograma debería leer: agg ctg ttg aaa atc aaa gac y así es:



SECUENCIA 24p11069-PCR2.1col9_M13R_MB

nnnnnnnnnnnnnnnnnnTCGGnCnnCTAGTAnCGGCCGCCAGTGTGCTGGAnTTCGCCCTTGGTACCTTACnnnTCTA
 TGCGAGGAnGAGCCTCTATGACAGCCTGTCGCTGACTTTTGAACGTTACATGTGCTTTTTACCAATGTGGAGGTGC
 ACTAGCGCCTGTTTTAGTTCCCTCATCAGGATTGTTTACAACCACACCATCAACAACAAGGGTAACGTTGTTAAGAGT
 AGCTTTTCATGTTATACGGCAAACCTTGATGAGACCATGCTTATGAGCAAGCCGTGCTCTTTAATGATACGGCGGCCA
 GTGTAAAGTTAAATGTGTCTGCATATTCGGACCACGAACCGGCATATAGATAGGGCTCGCCGAGTCCGACGTGATAT
 GCAACTGCAATGCTGAATGCAGCGGTCAACCCACTACCGCAGTAAAATACGCAGTGGGAAATATTAGGCTCACCGCC
 ACCCCACATTCTTGAAGAAGCTTAAGAGTGTACTACGACATTTCGTCAATTGGGTCTCAAACGTTTTTTCGTGCCGAT
 TTACTAACAAATATGTTACATCGTACGGAAnGTTGACCGCCCTTCnATATGACCAGGGATATCGTCGGGTCCGTAT
 GGTGCGACGGTTCGTGTTGAAGCGCAnCGCGGGTCGnGnGTCGACCATATGTGCGCAnGGnGGAATGCTTTTTGATTT
 TTCnACAnCCTCTTAAACTTCnGTTGnTnAnGGCCAAAnTAGCnTnnnAnTnGnnTTCTTnnCATACGGnnnnG
 nACTTCnACGGGnAnAnCCnnnnTGnnTTCATACnCCCTTnAnTnCCAnnAnTnnnnATTAnnnnnAAnnnCTnCG
 AnnACCCnnnGGnnnnnnTnnnnnnnnCCACCAnnTCCnnAnnnnnCCCCnnTnnnnnnnnnnnnnnnnnn

Dado que el inserto en esta clona se encuentra en sentido (-) y el cebador M13R hibrida del lado 5' del inserto, la secuencia de TbMST se va a leer en alguno de los 3 marcos 3'-5'. Traducción:

3'5' Frame 2

XXXXXXXXGXXXGXWWXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXWXXXKXV-XXXXXXXXRXSXXPYKXXXXXXXXLXGXX
 AXEV-EXXEKSKDIXXCAH MVDXRPAXRFNTTVRPYGPDDIPGHXEGAVNXPYDVNILLVNRHEKR
 LRPNDECRSNTLKLQGMWGGGEPNISHCVFYCGSGVTAAFSIAVAYHVGLGEPYLYAGSWSEYAD
 TFNFTLARRI I KEHGLLISMVSSSLPYNMKATLNNVTLVVDGVVVNNPDEELKQALVHLHIGEKAH
 VTFKSQRQAVIEAXPRIXX-GTKGEXQHTGGXY-XXXXXXXX

Blast: Protein Sequence

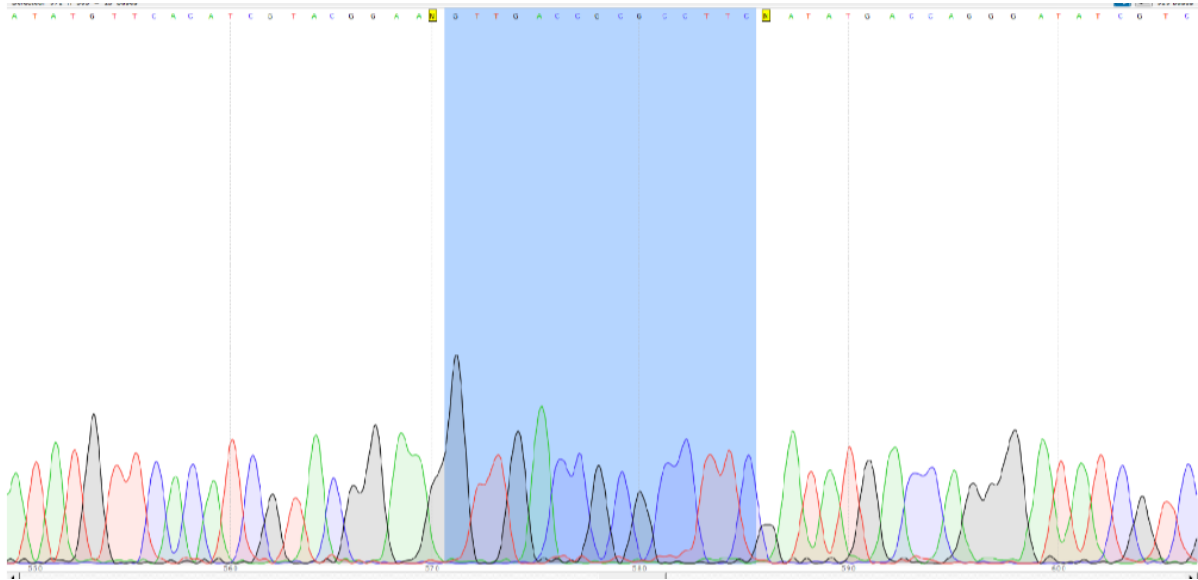
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
395 bits(1015)	1e-144	Compositional matrix adjust.	191/196(97%)	191/196(97%)	0/196(0%)
Query 1	MVDXRPAXRFNTTVRPYGPDDIPGHXEGAVNXPYDVNILLVNRHEKRLRPNDECRSNTLK	60			
Sbjct 176	...T...L.....I.....L.....	235			
Query 61	LLQGMWGGGEPNISHCVFYCGSGVTAAFSIAVAYHVGLGEPYLYAGSWSEYADTFNFTLA	120			
Sbjct 236	295			
Query 121	RRIIKEHGLLISMVSSSLPYNMKATLNNVTLVVDGVVVNNPDEELKQALVHLHIGEKAHV	180			
Sbjct 296	355			
Query 181	TFKSQRQAVIEAXPRI	196			
Sbjct 356H... 371				

Hay 5 aminoácidos que no lee bien la secuencia, además de los últimos 2 aminoácidos de la secuencia proteica: DT que faltan. Los dos primeros están cubiertos por la secuencia obtenida con el cebador M13F, por lo que solo hace falta reconstruir a partir del cromatograma los últimos 5 aminoácidos faltantes.

- Reconstrucción de IEGAVN:

```
atc gaa ggc gcg gtc aac
I   E   G   A   V   N
```

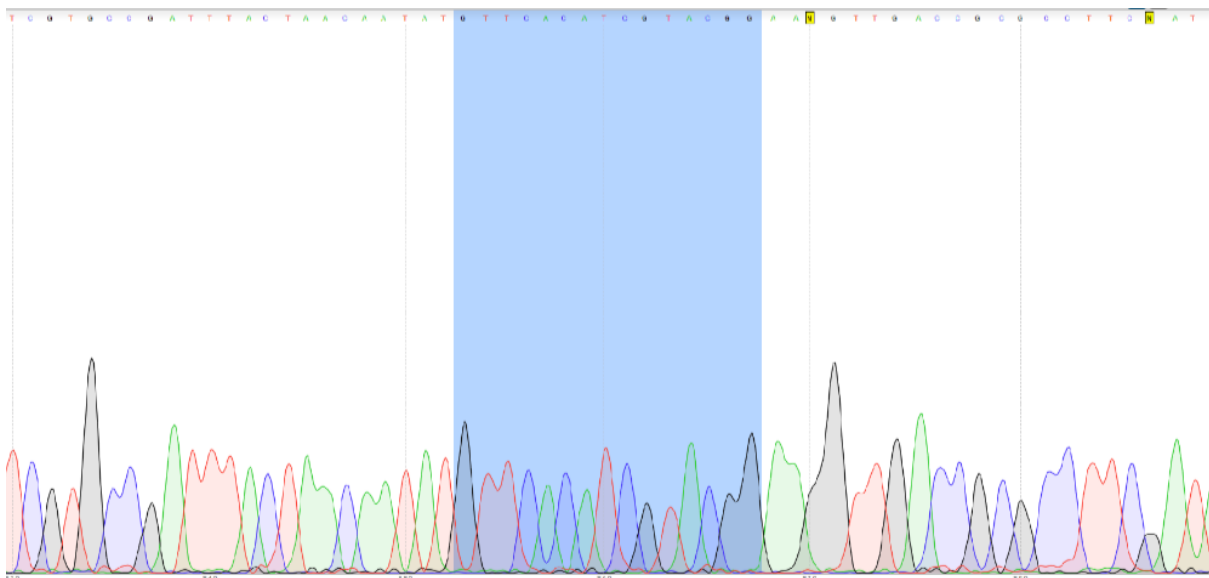
Entonces en el cromatograma debería leer: gtt gac cgc gcc ttc **GAT** y así es:



- Reconstrucción de LPYDVN:

```
ctt ccg tac gat gtg aac
L   P   Y   D   V   N
```

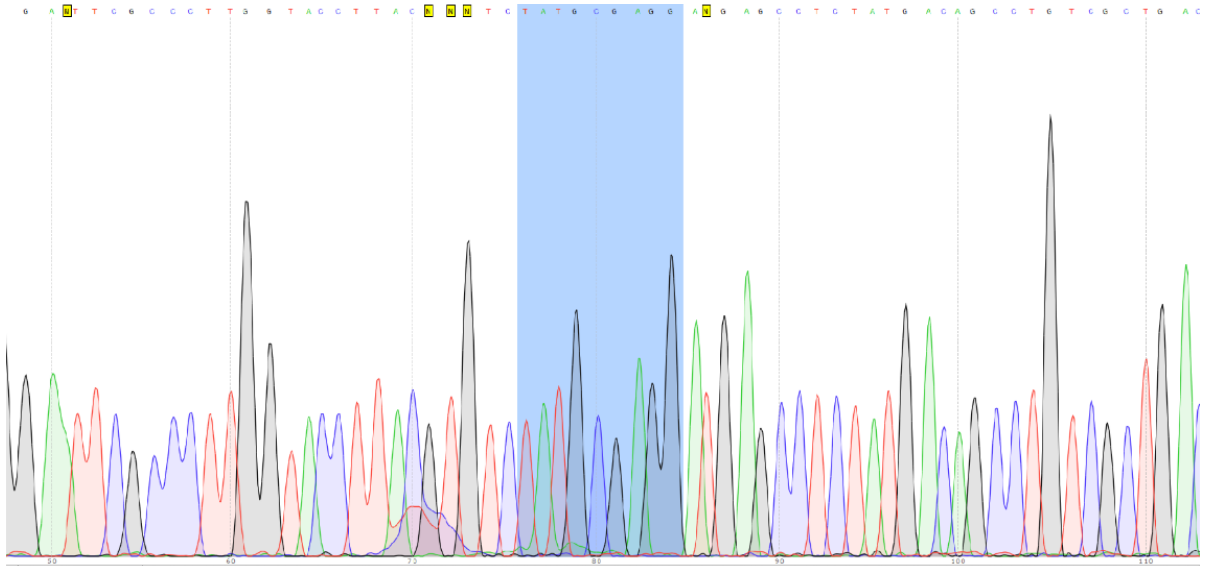
Entonces en el cromatograma debería leer: gtt cac atc gta cgg **AAG** y así es:



- Reconstrucción de PRIDT:

cat cct cgc ata gac acg taa
 H P R I D T -

Entonces en el cromatograma debería leer: **CGT GTC** tat gcg agg **ATG** y así es:



Lista de abreviaturas

3MP: 3-mercaptopiruvato

BSF: bloodstream form, “forma sanguínea”

DHLA: ácido lipoico

DNDi: Drugs for Neglected Diseases initiative

DTT: ditioneitol

GSH: glutatión

H₂S: sulfuro de hidrógeno

HAT: Tripanosomiasis africana humana

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

L-Cys: L-cisteína

MST: 3-mercaptopiruvato azufretransferasa

O/N: overnight

PF: procyclic form, “forma procíclica”

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido