

Mecanismo de inhibición de triparredoxina con compuestos anti tripanosoma

Mara Carreño Sastre

Tutor: Gerardo Ferrer

Lab. Físicoquímica Biológica
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
-Noviembre 2014-



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, Gerardo, por permitir realizar mi tesis en el laboratorio brindándome su tiempo y dedicación.

Agradecer a todos los integrantes del laboratorio por el apoyo cuando fue necesario y por hacer el que el trabajo diario sea una agradable experiencia.

A mis amigos por estar siempre presente tanto en los buenos momentos, con sus risas y en los malos para escuchar y dar consejos.

Por último, un gran "GRACIAS!" a mi familia ya que sin su apoyo no hubiese llegado hasta esta etapa, siempre alentando para seguir adelante en la carrera.

RESUMEN

La tripanosomiasis africana, causada por el protozooario *Trypanosoma brucei* afecta grandes poblaciones del continente africano. Actualmente se utilizan diversos fármacos, pero todos ellos poseen efectos secundarios y por dicha razón se han estado investigando sistemas presentes únicamente en tripanosomátidos con el fin de que éstos sean los únicos blancos, sin afectar al hospedero.

Se ha descrito la acción de compuestos sintéticos que actúan como inhibidores de triparredoxina (TXN), una oxidoreductasa dependiente de tioles de gran importancia en el metabolismo redox de tripanosomátidos. Recibe equivalentes de reducción del sistema tripanotiona/tripanotiona reductasa y los distribuye entre un gran número de blancos. De varios compuestos evaluados se seleccionaron dos con los mayores índices de selectividad. Se sabe que actúan mediante la alquilación de tiolatos nucleofílicos, aspecto que llama la atención ya que existen numerosos blancos para un agente alquilante haciendo que estos compuestos puedan no resultar específicos y sean tóxicos para las células del hospedero.

Debido a la alta especificidad por TXN, en este trabajo nos propusimos caracterizar la cinética de la reacción de inactivación por parte de los compuestos así como también evaluar cinéticamente otros posibles blancos que puedan resultar competencia. Éstos involucran tioles presentes dentro de células del hospedero (glutación y tiorredoxina), los que se hallan dentro de la célula parasitaria (tripanotiona, glutación) y el tiol mayoritario presente fuera del parásito que es la cisteína reducida de la albúmina sérica. Para cumplir con los objetivos se realizaron ensayos cinéticos, mediante el uso de fluorescencia intrínseca y ensayos de competencia con monobromobimano.

De los resultados obtenidos se pudo concluir que la alquilación de triparredoxina por uno de los compuestos es la reacción cinéticamente más favorable, con una constante de velocidad de $1126 \pm 12 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

ÍNDICE	Pág.
1. Introducción	9
1.1. Tripanosomiasis africana	11
1.2. Sistemas antioxidantes	12
1.2.1. Tiorredoxina	13
1.3. Sistema TR/T(SH) ₂ /TXN en <i>Trypanosoma brucei</i>	14
1.3.1. Principales componentes del sistema TR/T(SH) ₂ /TXN de tripanosomátidos	15
1.3.2. Funciones del sistema TR/T(SH) ₂ de <i>T. brucei</i>	22
1.4. Antecedentes	25
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo general	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. Metodología	31
3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	33
3.1.1. Expresión y purificación de triparredoxina de <i>T. brucei</i>	33
3.1.2. Expresión y purificación de tiorredoxina humana 1	35
3.1.3. Expresión y purificación de Cfc59A TryS	37
3.2. Ensayos enzimáticos	39
3.2.1. Determinación de actividad tiorredoxina de hTrx1	39
3.2.2. Determinación de actividad sintetasa de TryS	40
3.3. Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión	41
3.3.1. Síntesis de tripanotión y cuantificación de fosfato	41
3.3.2. Purificación de tripanotión	43
3.4. Procedimientos generales	43
3.4.1. Reducción de tioles	43
3.4.2. Cuantificación de tioles con DTDPy	44

3.4.3. Corridas de HPLC	44
3.4.4. Preparación de compuesto 1	45
3.5. Estudios cinéticos entre los compuestos y los distintos blancos	45
3.5.1. Proteínas fluorescentes TbTXN y hTrx1	45
3.5.2. Tioles no fluorescentes: T(SH) ₂ , GSH y HSA	46
3.5.3. Validación del método por competencia con mBBr	48
4. Resultados y discusión	51
4.1. Expresión y purificación de triparredoxina de <i>T. brucei</i>	52
4.2. Expresión y purificación de tiorredoxina 1 humana	53
4.2.1. Actividad tiorredoxina de hTrx1	55
4.3. Expresión y purificación de Cfc59A TryS	56
4.4. Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión	57
4.4.1. Síntesis de tripanotión y cuantificación de fosfato	57
4.4.2. Purificación de tripanotión	59
4.5. Estudios cinéticos entre compuesto 1 y los distintos blancos	62
4.5.1. Proteínas fluorescentes: TbTXN y hTrx1	62
4.5.2 Tioles no fluorescentes: GSH y HSA	66
4.6. Solubilidad del compuesto 2	69
4.7. Consideraciones finales	72
5. Bibliografía	77

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetil sulfóxido
GSH	Glutación
Gsp	Glutationilespermidina
GSSH	Glutación disulfuro
HSA	Albúmina sérica humana
IAM	Yodoacetamida
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
mBBr	Monobromobimano
PAGE	Electroforesis en gel poliacrilamida
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
Sp	Espermidina
T(SH)₂	Tripanotión
TR	Tripanotión reductasa
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TryS	Tripanotión sintetasa
TS₂	Tripanotión disulfuro
TXN	Triparredoxina
VM	Verde de malaquita
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tripanosomiasis africana

La tripanosomiasis africana, conocida también como enfermedad del sueño, es causada por el protozoario *Trypanosoma brucei* afectando a poblaciones africanas; según la Organización Mundial de la Salud en 2012 se reportaron cerca de 7200 casos. Dicho organismo presenta un ciclo de vida que involucra al ser humano y al insecto vector, la mosca tse-tsé (perteneciente género *Glossina*). Hay dos especies involucradas en la enfermedad: *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, que poseen diferencias en su distribución así como también la forma en que se presenta la enfermedad en cuanto a síntomas y la dinámica en la transmisión. La infección por *T. b. gambiense* se da principalmente en el centro y oeste de África y es responsable de casi el 95 % de los casos. Por el contrario, existen pocos casos de infección llevada a cabo por *T. b. rhodesiense* que se dan mayoritariamente en el este y sur del continente. [1, 2]

Actualmente, para mejorar las condiciones de vida de los pacientes infectados, se utilizan drogas que contienen antimonio como pentamidina o suramina en la primera etapa de la enfermedad [3] y las que contienen arsénico como melarsoprol o eflornitina en la última etapa. Sin embargo, además del hecho de que poseen efectos tóxicos y dificultades en su administración, el tratamiento puede no ser efectivo; se especula que es debido a que existe resistencia por parte del parásito [4]. También existen drogas como el nifurtimox (actualmente utilizado conjuntamente a la eflornitina), pero poseen más de un blanco, y es por dicha razón que se intenta encontrar nuevos fármacos que afecten únicamente componentes del parásito y no del hospedero. Una de las formas de encontrar vías metabólicas únicas en los tripanosomátidos es mediante secuenciación de sus genomas [5] ya que se busca que dichos fármacos sean tanto eficaces como seguros, sin afectar el sistema metabólico del hospedero [6]. La estrategia por excelencia consiste en la identificación de caminos metabólicos que sean esenciales para la sobrevivencia del parásito y que estén ausentes o que sean lo suficientemente diferentes en los mamíferos hospederos para permitir la inhibición selectiva de los blancos moleculares adecuados. Uno de los ejemplos más atractivo para los investigadores hoy en día se trata del sistema tripanotión reductasa/ tripanotión/ triparredoxina de tripanosomátidos [7, 8].

1.2. Sistemas antioxidantes

Los organismos aerobios utilizan oxígeno molecular (O_2) para la respiración así como también para la obtención de energía a través de la oxidación de nutrientes. Como producto del uso de esta molécula en células que crecen aeróbicamente, se generan especies reactivas del oxígeno (EROs). Ejemplo de ello son el radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\bullet OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [9]. A su vez, el estrés oxidativo es considerado también a causa de especies reactivas del nitrógeno (ERN) [10]. ADN, ARN y proteínas son los blancos por excelencia de las especies reactivas, a su vez, éstas son capaces de llevar a cabo la peroxidación lipídica [11].

Para controlar el nivel de especies reactivas tanto del oxígeno como del nitrógeno, y proteger a las células del estrés oxidativo, debe haber un equilibrio entre la producción de dichas especies y su eliminación. En condiciones fisiológicas normales las ERO y ERN son eliminadas o neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante que comprende: agentes que remueven catalíticamente radicales libres y otras especies reactivas denominadas habitualmente como antioxidantes enzimáticos, entre los que se incluyen la superóxido dismutasa, catalasa, y peroxidasas, entre otras enzimas.

En muchos organismos, las defensas celulares contra EROs y ERNs dependen del mantenimiento de la homeostasis redox de tioles, de la cual también depende el correcto funcionamiento de los distintos procesos biológicos [12]. Todos los organismos contienen altas concentraciones de al menos un tiol de bajo peso molecular para mantener el ambiente reductor intracelular [13]. La mayoría de los organismos eucariotas mantienen la homeostasis intracelular redox de tioles mediante sistemas que incluyen glutatión (GSH)/glutatión reductasa (GR) (Figura 1-A) y tiorredoxina (Trx)/tiorredoxina reductasa (TrxR) (Figura 1-B). Este sistema provee electrones a peroxidasas para eliminar especies radicales del oxígeno y nitrógeno mediante reacciones con altas constantes de velocidad.

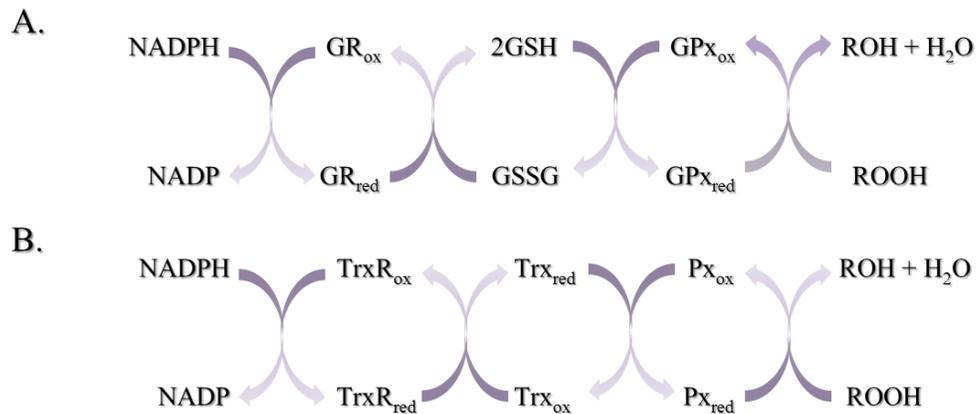


Figura 1- Vías de reducción de peróxidos dependiente de tioles pertenecientes a mamíferos. En la **A** se puede observar que a partir de los equivalentes de reducción liberados por NADPH se reduce la glutatión reductasa (GR) encargada de reducir a su vez el glutatión disulfuro (GSSG) y éste a la glutatión peroxidasa (GPx). Se puede ver cómo los hidroperóxidos (ROOH) son reducidos a sus respectivos alcoholes y agua mediante las GPxs. En **B** se puede observar cómo a expensas de NADPH se reduce la tiorredoxina reductasa (TrxR) la cual reduce a su vez tiorredoxina (Trx). Los electrones liberados son capaces de reducir peroxidasa (Px) que participan de la detoxificación de ROOH. Los subíndices *red* y *ox* corresponden a las especies en su estado reducido y oxidado respectivamente.

Sin embargo, y como se verá más adelante, no todos los organismos poseen estos tipos de sistemas de reducción de peróxidos, pero sí cuentan con sistemas análogos como lo es el sistema tripanotión reductasa/ tripanotión/ triparredoxina.

1.2.1. Tiorredoxina

A pesar del hecho que *T. brucei* posee tiorredoxina las concentraciones en las que se encuentra son bajas [14]. Esta proteína pesa alrededor de 12 kDa. Su sitio activo consiste en una secuencia conservada de cinco residuos que está también presente en otras proteínas relacionadas a ésta. En general esta secuencia es Trp-Cys-X-X-Cys. En el caso particular de Trx el sitio activo es Trp-Cys-Gly-Pro-Cys, siendo los residuos de cisteína catalíticos C32 y C35 [15]. Otra característica de estas proteínas es su estructura, consistente en plegamiento tipo tiorredoxina, que consiste en un centro de hojas β , rodeado por hélices α , particularmente la estructura de la Trx está conformada por cinco hojas β rodeadas por cuatro α -hélices, como se puede observar en la Figura 2.

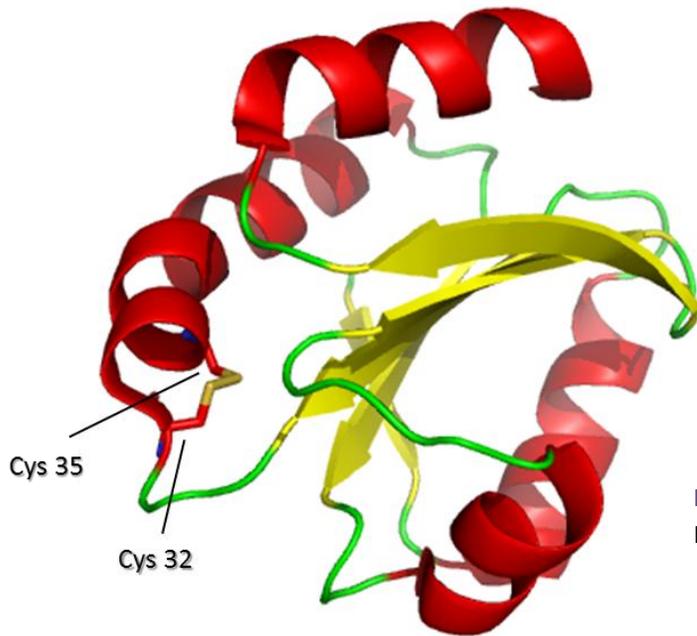


Figura 2 - Estructura de Trx1 humana
PDBID: 4004

1.3. Sistema TR/T(SH)₂/TXN

Existen organismos tales como Trypanosoma o Leishmania entre otros pertenecientes al orden Kinetoplastida, que no poseen el sistema GSH/GR y Trx/TrxR y en su lugar han desarrollado un sistema que consiste en tripanotión reductasa (TR)/ tripanotión (bis (glutathionil) espermidina; T(SH)₂)/ triparredoxina (TXN). A su vez, los tripanosomátidos cuentan con elevados niveles de tioles entre ellos GSH y glutarredoxinas [10]. Es importante tener en cuenta que a diferencia de los mamíferos estos organismos no cuentan con catalasa ni peroxidasas del glutatión dependientes de selenio [16]. En estos organismos las EROs y ERNs son generadas externamente a consecuencia de las respuestas inmunes por parte del hospedero e internamente a partir por ejemplo del metabolismo de xenobióticos [13, 17].

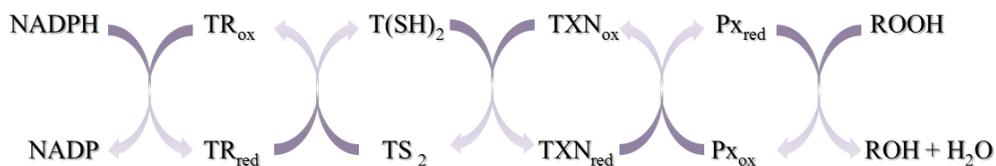


Figura 3 - Sistema TR/T(SH)₂ de tripanosomátidos. TR: tripanotión reductasa, T(SH)₂: tripanotión, TXN: triparredoxina; Px: peroxidasa. La TXN se mantiene en estado reducido al reaccionar con T(SH)₂, el cual a su vez se reduce por la TR a expensas de NADPH. Los equivalentes de reducción liberados poseen diversos blancos y como se ve en esta figura, uno de ellos son las peroxirredoxinas capaces de detoxificar hidroperóxidos. Los subíndices *red* y *ox* corresponden a las especies en su estado reducido y oxidado respectivamente.

Como se puede observar, el mecanismo de la Figura 3 se da a expensas de NADPH, en el cual éste cede sus electrones a la tripanotión reductasa (TR) que mantiene en estado reducido al principal tiol de bajo peso molecular de los parásitos, el tripanotión. Éste, a su vez mantiene reducida a la triparredoxina y los equivalentes de reducción liberados pueden actuar sobre diferentes blancos que se verán más adelante.

El hecho de que existan mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo en tripanosomátidos diferentes a los que se encuentran en mamíferos, hace que puedan tomarse en cuenta los componentes de dicho sistema al momento del diseño de fármacos.

1.3.1 Principales componentes del sistema TR/T(SH)₂/TXN de Tripanosomátidos

El sistema está compuesto por un tiol de bajo peso molecular, enzimas del tipo oxidorreductasas (es decir, enzimas que catalizan la oxidación de una molécula mediante la reducción de otra) y una gran variedad de enzimas dependiendo del destino final de los electrones liberados por el sistema.

Tripanotión reductasa

Esta enzima pertenece al conjunto de las óxidorreductasas FAD dependientes. Se encarga de la reducción de tripanotión disulfuro (TS₂) a T(SH)₂ utilizando como dador de electrones al NADPH y FAD como coenzima. Su estructura consiste en un homodímero cuyas subunidades son de

aproximadamente 50 kDa cada una. Su secuencia que consta de 492 aminoácidos, posee un disulfuro catalítico que comprende los residuos C52 y C57 siendo éste su sitio activo [18].

Tripanotión

El tripanotión es el principal tiol de bajo peso molecular de tripanosomátidos, descubierto en *Crithidia fasciculata* [19]. Sustituye en muchos aspectos al mediador redox GSH abundante en mamíferos [20], por lo tanto su principal función es mantener el estado redox intracelular. Su peso molecular es de 721.86 Da y se estima que su concentración dentro del parásito va desde 0.2 a 1.5 mM dependiendo de la etapa del ciclo en la que se encuentra el mismo [21].

Este tiol de bajo peso molecular se sintetiza en el citosol de los tripanosomátidos de la siguiente manera: por un lado, se forma GSH a partir de glutamato y glicina en dos pasos catalizados por γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa ambas dependientes de ATP. Por otro lado se obtiene espermidina a partir de ornitina, que a través de ornitina decarboxilasa (ODC) se genera putrescina. Ésta, luego se une a un grupo aminopropílico derivado de S-adenosil-L-metionina decarboxilada (dSAM) en una reacción catalizada por espermidina sintetasa (SpS). Posteriormente se da la glutationilación de la Sp mediante la enzima tripanotión sintetasa dando glutationil-espermidina (Gsp). Como última etapa, la misma enzima, TryS, es la encargada de la síntesis de tripanotión a partir de Gsp y una segunda molécula de GSH. Como se puede apreciar en la Figura 4 estos últimos dos pasos se llevan a cabo en forma acoplada a la hidrólisis del ATP.

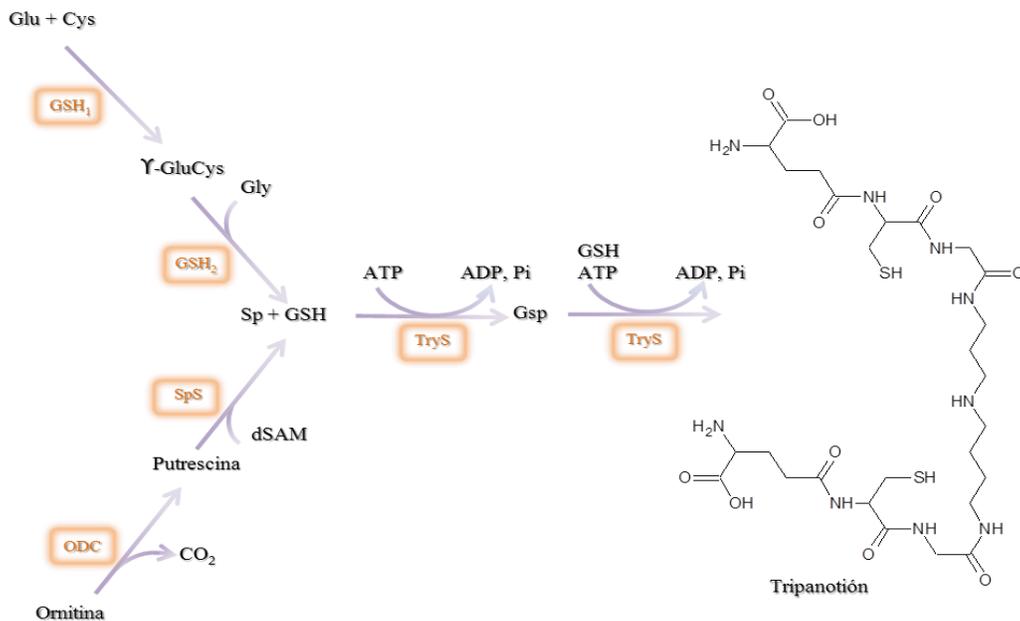


Figura 4 - Mecanismo de síntesis de tripanotión. Por un lado la formación del glutatión (GSH) se da a partir de glutamato, cisteína y glicina en dos pasos catalizados por γ -glutamilcisteína sintetasa (GSH1) y glutatión sintetasa (GSH2). Por otro lado, la espermidina (Sp) se obtiene a partir de ornitina. En primer lugar la ornitina descarboxilasa (ODC) genera putrescina la cual se une con un grupo aminopropílico de S-adenosil-L-metionina descarboxilada (dSAM) en una reacción catalizada por espermidina sintetasa (SpS). Por último se da la conjugación de dos moléculas de GSH y una de Sp en una reacción catalizada por tripanotión sintetasa (TryS), formándose como intermediario glutationil-espermidina (Gsp) generando como producto T(SH)₂. Esta última parte de la síntesis consume dos moléculas de ATP.

Tripanotión sintetasa

Esta enzima no solo cataliza la síntesis del tripanotión sino que también su ruptura, dando como resultado los propios sustratos, GSH y Sp. Esta característica como proteína bifuncional es conferida por la actividad amidasa que posee, rompiendo el enlace amida existente entre el GSH y la Sp. Mientras que la actividad sintetasa reside en el extremo C-terminal de la proteína, la actividad amidasa lo hace en el extremo N-terminal donde se encuentra uno de los principales residuos responsables de dicha actividad, la Cys59 que actúa conjuntamente con los residuos His130 y Asp146. El peso molecular de TryS es de 74.490 Da [8, 22, 23].

En el citosol, T(SH)₂ reduce dehidroascorbato, glutatión disulfuro (GSSG) y disulfuros de proteínas como tiorredoxina (Trx), triparredoxina (TXN) [21].

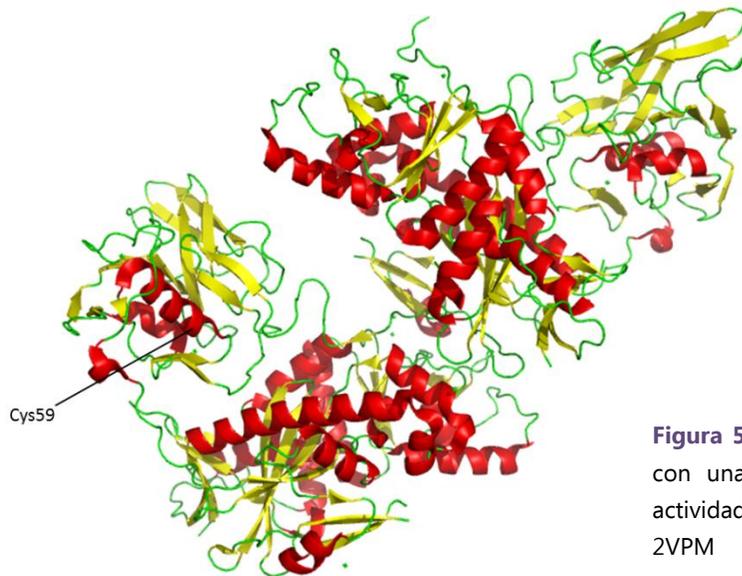


Figura 5 - Tripanotión sintetasa. Se indica con una flecha la C59 implicada en la actividad amidasa de la enzima. PDB ID: 2VPM

Triparredoxina

Las triparredoxinas han sido encontradas únicamente en organismos de la familia Trypanosomatidae y también pertenecen al grupo de oxidorreductasas. Actualmente se habla de la existencia de dos tipos de triparredoxina que difieren en su ubicación celular; las que se encuentran en el citosol, denominadas TXNI y las que se encuentran dentro de la mitocondria denominadas TXNII. Si bien se ha demostrado únicamente que TXNI es vital para *L. infantum* y *T. brucei* también se ha visto su presencia en otros organismos. Con respecto a las mitocondriales, solo ha sido demostrada su presencia en *L. infantum*. Actualmente, se especula sobre la existencia de TXNs presentes dentro de la mitocondria de otros organismos ya que se sabe que el compartimento contiene enzimas que son reducidas por dicha oxidorreductasa, como es la UMSBP (*universal minicircle sequence binding protein*), vital para la síntesis de ADN [24-26]. Al igual que en el caso de T(SH)₂, la concentración en la que se encuentra TXN varía según el estadio en cual se encuentra el parásito, se estima en promedio que se encuentra en una concentración de 100 μM en *T. brucei* [21].

Se podría decir que TXN y Trx son proteínas muy similares en lo que refiere a la estructura terciaria si bien sus secuencias no muestran alto grado de similaridad [27]. La estructura de

TXN, al igual que Trx posee plegamiento tipo tiorredoxina. En este caso, está conformada por tres hojas β rodeadas por cinco α -hélices, como puede observarse en la siguiente figura.

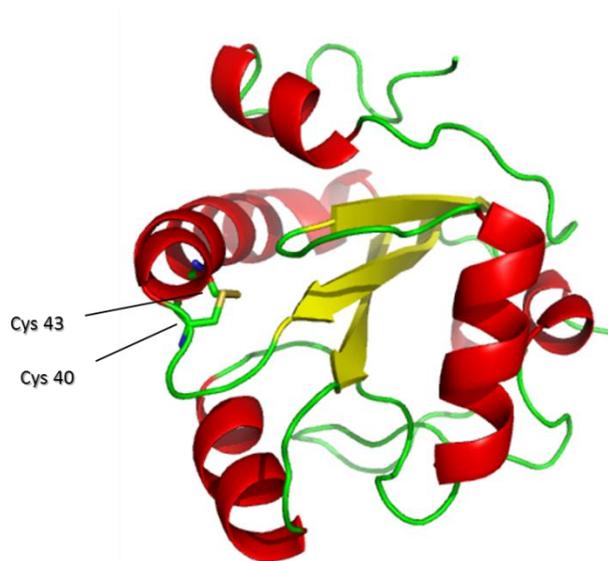


Figura 6 - Estructura de TXN donde se puede apreciar la ubicación de las cisteínas pertenecientes al sitio activo. PDB ID: 1O73

Esta oxidoreductasa posee 144 aminoácidos y su peso molecular es de aproximadamente 16 kDa. Si comparamos esta proteína con Trx, la primera, cuenta con una inserción de 24 a 36 residuos, aspecto responsable del aumento de la masa molecular de la misma [21]. Como ya se mencionó, este tipo de proteínas poseen una secuencia de cinco aminoácidos conservada en su sitio activo, WCXXC, que en el caso de TXN es Trp-Cys-Pro-Pro-Cys. Dicho sitio, consiste de dos cisteínas catalíticas ubicadas en las posiciones 40 ($pK_a = 7.2$) y 43 [14]. Mientras que el residuo Cys43 está ubicado de forma oculta en la proteína, la cadena lateral del residuo Cys40 (más cercana al extremo N-terminal) está ubicada de forma que es accesible al disolvente y es éste, el residuo que interactúa con $T(SH)_2$ y el sustrato de la proteína [14, 15].

El mecanismo de acción de estas oxidoreductasas se basa en la rápida velocidad con la cual los residuos de cisteína de su sitio activo llevan a cabo la interacción con sus sustratos. Dicha interacción se da mediante intercambios tiol-disulfuro con los grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro de las proteínas sustrato, como se describirá a continuación.

Mecanismo de intercambio tiol-disulfuro

El anión tiolato es intrínsecamente uno de los nucleófilos biológicos más fuerte, por tanto el grupo tiol de la cisteína es uno de los grupos funcionales más reactivos en proteínas. Los enlaces disulfuro proteicos son típicamente introducidos y removidos a través de reacciones de intercambio tiol - disulfuro, mecanismo central en la biología redox [28]. En éste, el tiolato actúa como nucleófilo y desplaza a un átomo de azufre que forma parte de un puente disulfuro. Este enlace se rompe, liberando un tiolato, mientras que se forma un nuevo enlace disulfuro (Figura 7).

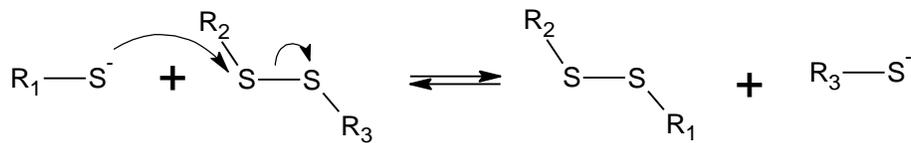


Figura 7 - Reacción general de intercambio tiol-disulfuro. En primer lugar se da el ataque nucleofílico por parte de un tiolato hacia un átomo de azufre perteneciente a un enlace disulfuro. Este enlace se rompe, liberando un tiolato, mientras que se forma un nuevo enlace disulfuro entre el átomo atacante y el de azufre original.

Particularmente, en el caso de la TXN, la reacción de intercambio tiol - disulfuro se da dos veces de forma consecutiva (Figura 8). En primera instancia se da la formación de un disulfuro mixto, entre la Cys40 y su molécula blanco. El tiol del sitio activo hacia el extremo N-terminal tiene un valor de pKa bajo, promoviendo el inicio de un ataque nucleofílico en un disulfuro blanco y la formación de un enlace covalente transitorio (en la forma de disulfuro mixto). Este disulfuro mixto es luego atacado por la Cys43 de TXN liberándose así la molécula blanco reducida y la TXN oxidada. Esta última es regenerada por reacción espontánea con T(SH)₂ y es capaz de actuar nuevamente [10, 21].

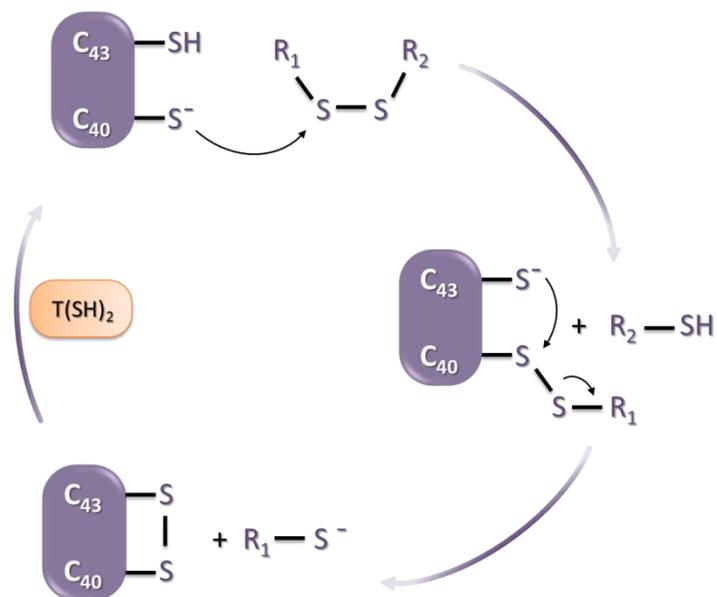


Figura 8 - Mecanismo de la reacción de intercambio tiol - disulfuro del que participa TXN; el mecanismo se da dos veces de forma consecutiva. Primeramente se forma un disulfuro mixto entre la Cys40 y su molécula blanco. Éste es atacado por la Cys43, liberándose la molécula blanco reducida y la TXN oxidada, la cual es regenerada por T(SH)₂.

El tipo de reacción en la que está involucrada la TXN es una de las tantas de las que participan grupos tiol. En general, éstos poseen numerosas funciones biológicas como la participación en reacciones de oxidorreducción, en catálisis enzimática no redox, en la estabilización de estructuras mediante la formación de disulfuros, entre muchas otras. Casi todas estas reacciones se caracterizan por el hecho que involucran el ataque nucleofílico del tiolato sobre un electrófilo (blanco), teniendo en cuenta a su vez que la mayor parte de los tioles tienen un pKa entre 5 y 9, lo que implica que solo una parte está disponible como tiolato a pH neutro.

A pesar de esto, la reactividad de los tioles no puede explicarse solamente por la disponibilidad del tiolato, sino que la acidez y nucleofilicidad de dichos grupos juegan un importante rol en ella. Ambas propiedades dependen de factores estructurales de las proteínas como la composición aminoacídica del entorno, las interacciones entre los residuos así como también el impedimento estérico y la solvatación [29].

1.3.2. Funciones del sistema TR/T(SH)₂/TXN en tripanosomátidos.

Como ya se mencionó, los sustratos del tripanotión son varios, es decir que los electrones que son liberados en el sistema TR/T(SH)₂ poseen gran cantidad de blancos con diversas funciones, vitales para los parásitos. En la figura 9 se muestran en forma esquemática dichos blancos. Se destaca el hecho de que los equivalentes, pueden actuar de dos formas distintas, ya sea directamente al ser liberados luego de la reducción de la T(SH)₂ o de forma indirecta a través de TXN.

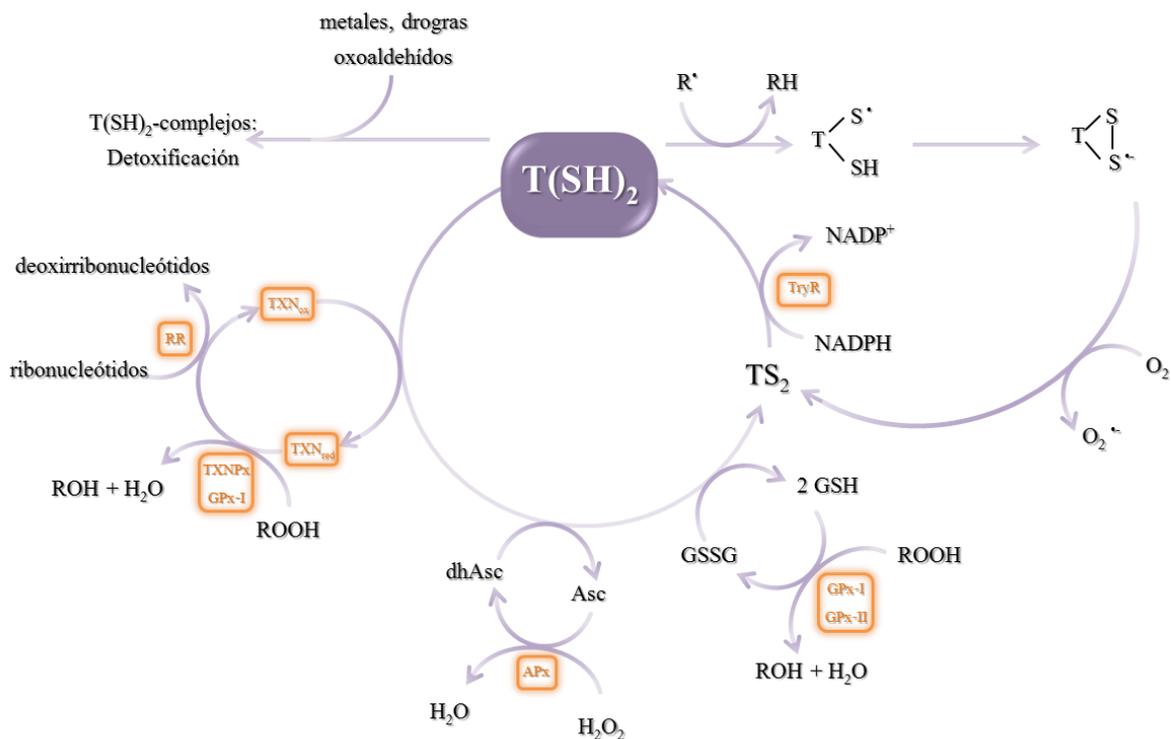


Figura 9 - En este esquema se representan los diversos blancos de los equivalentes de reducción liberados del sistema TR/ T(SH)₂. A través de TXN son capaces de actuar sobre el sistema de la ribonucleótido reductasa (RR) y peroxirredoxinas de TXN (TXNPx). Directamente desde el tripanotión los equivalentes de reducción actúan reduciendo ROOH mediante glutatión peroxidasa (GPx), detoxificando xenobióticos, reduciendo peróxido a través de una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (APx), así como también detoxificando radicales tiilo.

Directamente estos equivalentes de reducción son capaces de reducir dehidroascorbato a ascorbato y glutatión disulfuro a glutatión; son capaces a su vez de interactuar con electrófilos para la detoxificación de oxoaldehídos, metales pesados y xenobióticos mediante S-

transferasas y también de reaccionar con especies radicales que llevan a la formación del radical tiilo del tripanotión [30]. A continuación se verán en detalle algunos de estos aspectos que llevan a cabo las diferentes funciones:

Antioxidante

Como ya se mencionó, la función antioxidante es la principal de este sistema. La eliminación de EROs y ERNs en tripanosomátidos se lleva a cabo mediante peroxidases de tres tipos: 2-Cys peroxirredoxinas (2-Cys Prx), glutatión peroxidases no dependientes de selenio (nsGPX) y en algunas especies ascorbato peroxidases (APx) [16] (Figura 10).

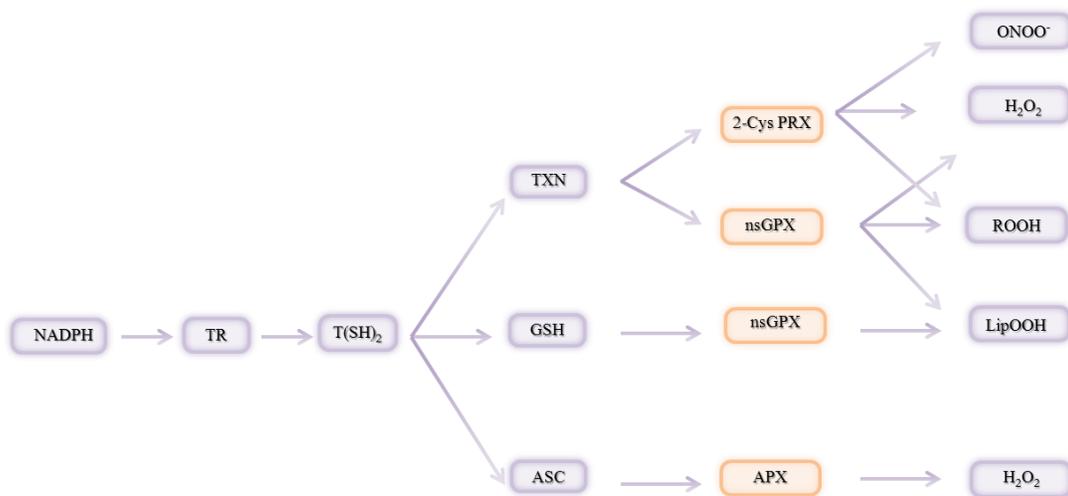


Figura 10 - En este esquema, se puede observar los diferentes medios de detoxificación de hidropéroxidos en tripanosomátidos. Se dividen en los blancos que usan TXN como intermediario (2-Cys PRX y nsGPX), los que usan GSH (son las nsGPX) y los que utilizan ascorbato como la hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (APx). En color naranja están representadas las peroxidases presentes en tripanosomátidos.

Dentro de las 2-Cys Prx se encuentra la triparredoxina peroxidasa (TXNPx), peroxirredoxina esencial para la supervivencia de los parásitos [18]. Dentro de los tripanosomátidos existen dos peroxidases de TXN con diferente localización. Mientras que una está localizada en el citosol (cTXNPx) la otra está ubicada en la mitocondria (mTXNPx), y son las encargadas catalizar la reducción de hidropéroxidos orgánicos, H_2O_2 y $ONOOH$, utilizando TXN como sustrato [31, 32].

En el caso de las nsGPX, son algunas las que poseen actividad peroxidasa de triparredoxina, ya que reciben los electrones directo de TXN. A diferencia de las 2-Cys Prx son capaces de reducir hidroperóxidos lipídicos. Estas también están presentes en la mitocondria de los parásitos. El resto de las nsGPX reciben electrones directamente desde el GSH y únicamente reducen LipOOH.

Por último, en el caso de *T. cruzi* ha sido demostrado que expresan una enzima hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (APx) similar a la que se expresa en algunas plantas, y es capaz de reducir dehidroascorbato (DHA) a ascorbato, a la vez que reduce peróxido de hidrógeno. Dicha actividad está unida directamente al sistema del tripanotión [17].

Detoxificación de metales pesados

Los grupos tiólicos son blancos de drogas que contienen metales pesados como mercurio, cadmio, arsénico, etc. Algunos de estos metales como zinc y cobre son nutrientes traza esenciales para muchas reacciones enzimáticas pero sin embargo, son tóxicos en altas concentraciones. El secuestro de estos metales involucra generalmente tioles presentes en general en moléculas de bajo peso molecular y proteínas ricas en cisteína. Se ha demostrado que el tripanotión actúa como defensa contra metales pesados como el cadmio y mercurio [13].

Detoxificación de xenobióticos

Se ha demostrado que varias especies de tripanosomátidos como *L. major*, *C. fasciculata* y *T. brucei* cuentan con una tripanotión S-transferasa (TST) en lugar de contener glutatión S-transferasa que está presente en la mayoría de los organismos. La función de esta última es catalizar el ataque nucleofílico del GSH hacia xenobióticos hidrofóbicos electrofílicos para formar productos S-conjugados los cuales son menos tóxicos y de fácil excreción. La actividad de la TST puede estar involucrada en la resistencia por parte de parásitos como *Leishmania spp.* a fármacos con antimonio en el tratamiento de leishmaniasis por ejemplo [33].

Replicación del parásito

Indirectamente, a través de la TXN los equivalentes de reducción son capaces de reducir la ribonucleótido reductasa encargada de la síntesis de precursores del ADN, por tanto se encuentra implicada en la replicación parasitaria [15]. A su vez también estos equivalentes son capaces de activar el factor de transcripción UMSBP, promoviendo su unión al ADN del kinetoplasto, iniciando así el proceso de replicación [34, 35].

1.4. Antecedentes

Con el fin de hallar nuevas drogas que actúen sobre el sistema TR/T(SH)₂/TXN, varios grupos de investigación han estado estudiando por años los distintos componentes del sistema como posibles blancos de dichas drogas.

Para la realización de esta tesina se tomó en cuenta una publicación del año 2012, del grupo de la Dra. Luise Krauth-Siegel, de la Universidad de Heidelberg. [15]. El trabajo tenía como objetivo identificar compuestos que actuaran directamente contra el sistema peroxidasa de *Trypanosoma brucei* teniendo como fin el diseño de fármacos con acción tripanocida. En dicho trabajo se realizó un “screening” de alto rendimiento (*High throughput screening*, HTS) con aproximadamente 80.000 compuestos sintéticos, y se logró determinar que de todos los que fueron evaluados, los más activos son un pequeño grupo de cloroalcanos además de un compuesto que posee un grupo trifluorometil tiofenolato.

Los compuestos que lograron inhibir el sistema peroxidasa de *T. brucei* fueron en total once, inhibiendo el crecimiento de los parásitos en cultivo con EC₅₀ < 10 μM y comparando su toxicidad hacia células HeLa (células de mamífero) en cultivo sus índices de selectividad se extienden hasta 83 (dicho índice se obtiene al comparar los valores de EC₅₀ obtenidos para células de *T. brucei* y HeLa). Dichos compuestos se resumen en la tabla 1, extraída del trabajo de Krauth-Siegel, en la cual se muestra para cada compuesto en primer lugar el porcentaje de inhibición del sistema peroxidasa y el IC₅₀ in vitro, el EC₅₀ hacia células de *T. brucei* y HeLa y por último el índice de selectividad.

Tabla 1 - Compuestos con mayor actividad tripanocida. Se representan los valores de IC₅₀ y EC₅₀ para los compuestos más activos [15]

Compound	<i>In vitro</i> inhibition ^a		EC ₅₀ ^b			Selectivity index ^c
	HTS	IC ₅₀	<i>T. brucei</i>		HeLa	
			24 h	72 h	72 h	
	%	μM	μM	μM	μM	
1	102	16.9 ± 2.6	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.1	>50	>83
2	103	4.8 ± 0.04	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	14.0 ± 4.5	18
3	100	13.7 ± 0.1	1.1 ± 0.04	4.2 ± 0.3	>50	>12
4	31	29.5 ± 0.2	3.1 ± 0.7	2.3 ± 0.1	22.1 ± 3.2	10
5	99	16.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	3.1 ± 0.5	28.4 ± 3.2	9
6	65	7.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.9	10.0 ± 2.0	7
7	64	30 ± 0.3	0.2 ± 0.05	3.6 ± 0.6	16.3 ± 4.9	5
8	76	22 ± 0.1	0.5 ± 0.1	4.3 ± 1.1	12.2 ± 4.1	3
9	88	31 ± 0.8	0.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1	8.0 ± 3.1	3
10	107	3.5 ± 0.02	3.1 ± 0.7	3.6 ± 0.6	8.0 ± 3.2	2
11	102	3.9 ± 0.06	5.1 ± 1.2	7.9 ± 1.7	12.3 ± 5.3	2
12	80	13.9 ± 2.6	2.2 ± 0.1	ND	8.3 ± 0.3	ND

El grupo concluyó tras varios estudios que dichos compuestos actúan como inhibidores de TXN. Demostraron que, en su acción inhibitoria, la principal reacción es la alquilación del residuo Cys40 de la TXN. Este aspecto llama la atención ya que existen numerosos tioles que serían blancos potenciales para un agente alquilante haciendo que estos compuestos pudieran no resultar específicos y fueran tóxicos para las células del hospedero.

Para llevar a cabo la tesina fueron elegidos dos de los once compuestos denominados bajo el número 1 y 3 de la tabla. A lo largo del trabajo se referirá a los mismos como compuesto 1 (C1) y compuesto 2 (C2), respectivamente (Figura 11). Esta elección se basó en el hecho de que ambos poseen los índices de selectividad más altos y en el caso de C2 también se tuvo en cuenta que es el único que posee un grupo trifluorometil tiofenolato y por tanto lo hace diferente del resto de los compuestos.

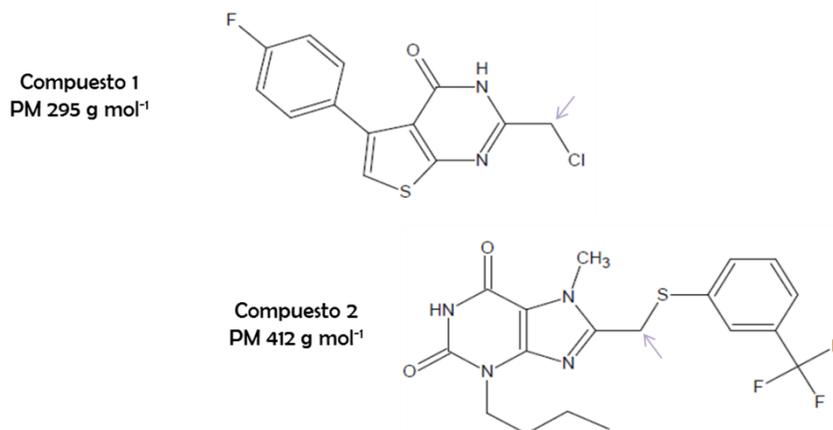


Figura 11 - Compuestos seleccionados para llevar a cabo la tesina. En ambos, se indica con una flecha el carbono que es susceptible al ataque nucleofílico por parte de un tiolato. Compuesto 1, 2-(clorometil)-5-(4-fluorofenil)tieno[2,3-*d*]pirimidin-4(3H)-ona. Compuesto 2, 3-butil-7-metil-8-(metil)-3,7-dihidro-1H-purina-2,6-diona.

Durante el trabajo de la tesina se tuvo en cuenta que además de TXN, *T. brucei* cuenta con la presencia de otros tioles en su organismo, así como también se contemplaron los tioles presentes en el organismo hospedero. En el primer caso, el parásito cuenta como ya se mencionó con T(SH)₂ y GSH que alcanzan concentraciones que llegan hasta 1.5 y 1.2 mM [21] respectivamente, por tanto se ven favorecidos en cuanto a la competencia. También se mencionó con anterioridad que las concentraciones de estos tioles de bajo peso molecular varían según la etapa del ciclo de vida del parásito. En ese caso, conocer las constantes de velocidad de las reacciones entre ellos y los compuestos, permitirá saber en qué fases están mejor protegidos los parásitos por sus tioles de bajo peso molecular y en cuáles la inactivación de la TXN será más eficiente. Por otro lado al ser éste un parásito extracelular, se tomó en cuenta el tiol más abundante en su entorno que será la única cisteína reducida de la albúmina sérica, HSA (400 µM en humanos) [36]. Por último, dentro de las células del huésped mamífero también existen tioles capaces de generar competencia hacia los compuestos. De dichos tioles, se estudió la hTrx1; en primer lugar por ser una proteína relacionada con TXN teniendo en cuenta las similitudes descritas en el presente trabajo, y a su vez porque ya ha sido demostrada la reacción de Trx con algunos de los compuestos en estudio en el trabajo de Krauth-Siegel [15].



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar la cinética de la reacción de inactivación de triparredoxina por parte de los compuestos C1 y C2, así como también evaluar cinéticamente otros posibles blancos que puedan resultar competencia.

2.2. Objetivos específicos

- Estudiar la cinética de la reacción entre los compuestos 1 y 2 y los tioles presentes dentro del parásito (TXN, T(SH)₂ y GSH), obteniendo las constantes de velocidad de dichas reacciones.
- Estudiar la cinética de reacción entre los compuestos y HSA que es el principal tiol fuera del parásito.
- Evaluar las constantes cinéticas entre los compuestos de interés y algunos tioles presentes en células vecinas, pertenecientes al hospedero (Trx y GSH)



3. METODOLOGÍA

3.1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

3.1.1. Expresión y purificación de triparredoxina de Trypanosoma brucei

Para la expresión de la forma recombinante de TXN de *T. brucei* se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa Tuner DE3 transformadas con el plásmido pET Trx1b/TXN. Dicho plásmido posee una cola de histidinas unida a Trx de *E. coli* y luego se continúa de TXN, y por tanto habrá que hacer una digestión entre ambas proteínas posterior a la purificación.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de colonias de placa en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) kanamicina (50 µg de kanamicina/mL de medio) que se incubó a 37°C, 180 rpm toda la noche. Luego se inocularon 5 mL de dicho pre-cultivo en un frasco Erlenmeyer de 2L conteniendo 500 mL de medio Terrific Broth (TB) suplementado con kanamicina (10 µg de kanamicina/mL de medio final), el cual se incubó a 37°C, 180rpm, hasta alcanzar una D.O_{600nm} de aproximadamente 0.5 UA. El medio LB se compone de extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y triptona 10 g/L mientras que el medio TB consiste en extracto de levadura 24 g/L, triptona 12 g/L y glicerol 0.4%. Posteriormente el cultivo se enfrió a 4°C por 30 minutos y luego se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM y se retomó la incubación a 18°C, 180 rpm durante toda la noche.

A continuación de cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 3200 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió en amortiguador A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH=7.5) en una relación de 10 mL de amortiguador A/g de pellet. Para iniciar la lisis celular e inactivar la acción proteasas se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), lisozima y cistatina en concentraciones finales 1 mM, 1 mg/mL y 400 µM respectivamente. Se incubó en hielo por 30 minutos y se continuó con la sonicación realizando 5 tandas de 1 segundo *on* / 1 segundo *off* durante 1 minuto. A continuación se realizaron dos centrifugaciones consecutivas, una durante 15 minutos a 10.000 rpm y la otra por 30 minutos a 18.000, ambas a 4 °C. Para finalizar, se filtró el extracto líquido con el uso de filtros de 0.7 µm.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando una columna HisTrap GE Healthcare de 5 mL y una bomba peristáltica. La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador A y luego se sembró el extracto soluble filtrado a la columna a un flujo de 1 mL/minuto. A continuación se realizaron 2 lavados sucesivos, el primero con amortiguador A, el segundo con 20% v/v de amortiguador B (imidazol 500 mM en amortiguador A, pH=7.5). La elución de la proteína se realizó utilizando 50% v/v de amortiguador B en amortiguador A, recolectando fracciones de 1 mL.

Para visualizar las fracciones obtenidas luego de la purificación y determinar el nivel de expresión y grado de pureza obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, SDS-PAGE al 15%. Aquellas fracciones que mostraron mayor pureza se juntaron y concentraron por filtración con un Amicon (5 kDa), centrifugando a 4000 x g a 4 °C hasta obtener una concentración de proteína adecuada. A continuación se procedió a realizar un cambio de amortiguador para quitar el imidazol mediante una cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Para finalizar se realizó la digestión de His-Trx-TXN con una proteasa de TEV por sus siglas en inglés "*Tobacco Etch Virus*" ya que el plásmido posee un sitio de corte para la misma entre las secuencias de las proteínas Trx y TXN. El peso molecular de esta enzima es de 26 kDa, y el sitio de reconocimiento es la secuencia Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) en la cual la digestión ocurre entre los residuos de Gln y Gly/Ser. Algunas características de esta proteasa son su alta especificidad y su actividad que está restringida a determinadas condiciones como baja temperatura y alta fuerza iónica. A su vez no posee actividad a altas concentraciones de imidazol [37].

La digestión con la proteasa se llevó a cabo durante toda la noche, utilizando 1 mg proteasa/10 mL, y se realizó una IMAC, utilizando una columna HisTrap GE Healthcare de modo que la TXN eluya en primer lugar ya que tras la digestión, no posee un ligando con afinidad por la columna. Se realizó un único lavado con amortiguador A y luego para la elución se utilizó 50% v/v de amortiguador B en amortiguador A, recolectando fracciones de 1 mL.

Para verificar que la digestión fue exitosa se sembraron todas las fracciones en una SDS-PAGE 15% y a las fracciones correspondientes a TXN se les midió concentración mediante espectrofotometría, por absorbancia a 280nm. Para finalizar se realizó un cambio de amortiguador mediante SEC, para almacenamiento. Se utilizó HEPES 50 mM, pH = 7.5.

***Gel de poliacrilamida - 15%

Para preparar 15 mL de gel separador al 15% se debieron agregar y mezclar: 5.83 mL de agua destilada, 7.5 mL de acrilamida 30%, 3.75 mL de buffer de separación (Tris-HCl 1.5 M pH=8.8), 0.2 mL de SDS 10%, 0.2 mL de APS 10% y 20 μ L TEMED.

Para preparar 10 mL de gel concentrador al 5% se debieron agregar y mezclar: 6.8 mL de agua destilada, 6.8 mL de acrilamida 30%, 1.25 mL de buffer de concentración (Tris-HCl 0.5 M pH=6.8), 100 μ L de SDS 10%, 100 μ L de APS 10% y 20 μ L TEMED.

3.1.2. Expresión y purificación de tiorredoxina humana 1 (hTrx1)

Para la expresión de la forma recombinante de hTrx1 se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21 DE3 transformadas con el plásmido pET28a modificado para tener resistencia a ampicilina y a su vez posee una extensión amino terminal con 6 histidinas para su posterior purificación por cromatografía de afinidad por metales.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un crioinóculo de bacterias transformadas en 20 mL de medio LB ampicilina (100 μ g de ampicilina/mL de medio) que se incubó a 37°C, 220 rpm durante toda la noche. Luego se inoculó dicho pre-cultivo en un frasco Erlenmeyer de 5L conteniendo 1 L de medio LB suplementado con ampicilina (100 μ g de ampicilina/mL de medio), el cual se incubó a 37°C, 220 rpm, hasta alcanzar una D.O_{600nm} de aproximadamente 0.6 UA. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C, 220 rpm por 4 h. Posteriormente se cosecharon las bacterias mediante una centrifugación de 30 minutos a 4000 x g a 4°C.

El pellet se resuspendió en amortiguador A, cuya composición consistió en NaH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 40mM pH = 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM en una relación de 10 mL de amortiguador/g de pellet. Para iniciar la lisis celular e inactivar la acción proteasas se agregó PMSF y lisozima en concentraciones finales de 1 mM y 1 mg/mL respectivamente y se incubó a 4°C por 1 h, luego se procedió a la sonicación realizando tandas de 15 segundos *on* / 5 segundos *off* durante 5 minutos. A continuación se realizó la centrifugación del sonicado durante 45 minutos a 10.000 x g a 4°C y el extracto líquido se filtró con el uso de filtros de 0.8 μm y 0.2 μm consecutivamente.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por una IMAC, empleando una columna HisTrap GE Healthcare de 1 mL y una bomba peristáltica. La columna fue pre-equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador A y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna a un flujo de 0.5 mL/minuto. A continuación se realizó un lavado con 10 volúmenes de amortiguador A (a un flujo de 1 mL/minuto) y posteriormente se eluyeron las proteínas unidas mediante escalones de 5 volúmenes de columna de 50, 200 y 500 mM imidazol. Se recolectaron fracciones de 1 mL a las cuales se les midió absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Cary con el fin de hallar su concentración proteica y realizar un cromatograma, es decir un gráfico de absorbancia en función del volumen de elución. A su vez, las fracciones obtenidas luego de la purificación fueron visualizadas mediante SDS-PAGE al 15% utilizando una tinción con Coomassie coloidal durante toda la noche. De dicho gel se extrajo una de las bandas cuyo peso molecular coincidía con el de la proteína de interés y se realizó un estudio de espectrometría de masa con el fin de confirmar que la secuencia de la proteína purificada sea precisamente hTrx1.

A continuación se procedió a un cambio de amortiguador y corte de la cola de histidinas, para lo cual se realizó una diálisis donde se incubaron las fracciones con contenido proteico en amortiguador NaPi 50 mM, pH = 7.4, NaCl 150 mM, DTPA 0.1 mM y trombina en una concentración final de 3U/mg a temperatura ambiente por 16 h sin agitación. La trombina remanente se quitó mediante SEC, para lo cual se utilizó una columna Superdex 75 conectada a un equipo ÄKTA FPLC y equilibrada con 5 volúmenes del amortiguador utilizado en la diálisis. A

continuación se sembraron 500 μ L de la muestra (previamente concentrada utilizando un filtro Amicon de 5 kDa y centrifugada a 20.000 rpm por 10 minutos) y se procedió a eluir colectando automáticamente fracciones de 0.5 mL a la vez que se obtuvo un cromatograma.

Se colectaron las muestras que se correspondían con el peso molecular de hTrx1 (~12 kDa) y se visualizaron en una SDS-PAGE 15%. Además, la concentración proteica de las fracciones se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm y por último se evaluó la actividad enzimática de hTrx de las fracciones obtenidas (sección 3.2.1).

3.1.3. Expresión y purificación del mutante C59A tripanotión sintetasa de Crithidia fasciculata

Para la expresión de la forma recombinante del mutante C59A de TryS de *C. fasciculata* se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa Tuner DE3 (Novagen) cedidas por el grupo de trabajo de Marcelo Comini del Institut Pasteur de Montevideo, transformadas con el plásmido pET19b-CfTryS C59A.

Se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo de colonias de placa en 20 mL de medio LB ampicilina (100 μ g de ampicilina/mL de medio) que se incubó a 37°C, 220 rpm durante 16-18 h aproximadamente. Luego se inocularon 10 mL de dicho pre-cultivo en un frasco Erlenmeyer de 5L conteniendo 1L de medio de autoinducción ZYM suplementado con ampicilina 100 μ g/mL de medio final, que se incubó a 37°C, 220rpm, durante 4h. El medio ZYM se compone de triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaHPO₄ 25 mM, KH₂PO₄ 25 mM, NH₄Cl 50 mM, Na₂SO₄ 5 mM, glicerol 0.5%, glucosa 0.05%, α -lactosa 0.2% y MgSO₄ 2 mM. A continuación se incubó por 16-18 hs a 25°C, 120 rpm.

Posteriormente se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 3.000 x g a 4°C durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en amortiguador A (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH=8) en una relación de 5 mL de amortiguador A/g de pellet. Para iniciar la lisis celular e inactivar la acción de serin proteasas se agregó lisozima y PMSF en concentraciones finales de 3.1 mg/mL y 1 mM respectivamente. Se incubó en hielo por 40 minutos y luego se agregó DNAsa y MgSO₄ en concentraciones finales de 2 U/mL y 10 mM respectivamente. Se retomó la incubación en hielo

por 20 minutos. Luego se procedió a la sonicación utilizando los siguientes parámetros: tiempo - 2 minutos, impulso *on*: 30 s, impulso *off*: 60 s y amplitud 40%. A continuación se centrifugó a 9000 x g por 1 h a 4°C para separar los restos celulares del sobrenadante. Previo al pasaje por la columna de afinidad, el extracto líquido se filtró utilizando filtros de 0.47 µm para eliminar partículas solubles.

La purificación de la proteína recombinante se realizó por IMAC, empleando dos columnas HisTrap - GE Healthcare de 1 mL conectadas en serie y una bomba peristáltica. La columna fue pre-equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador B (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH=8) y luego se aplicó el extracto soluble filtrado a la columna a un flujo de 0.5 mL/minuto. A continuación se colocó la columna en el equipo ÄKTA Prime FPLC y se realizaron 2 lavados sucesivos: el primero con amortiguador B, el segundo con 5% v/v de amortiguador C (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH=8). La elución de la proteína se realizó de modo isocrático con 15 mL de amortiguador C recolectando fracciones de 1 mL.

Para almacenar las fracciones de elución se procedió luego a quitar el imidazol mediante un cambio de buffer a través de una SEC utilizando una columna HiTrap Desalting GE - Healthcare de 25 mL. La misma fue equilibrada con 10 volúmenes de amortiguador HEPES 100mM, MgSO₄ 10 mM, y EDTA 0.5 mM, pH=7.2. La proteína se eluyó a un flujo de 0.5 mL/min, recolectando fracciones de 1 mL.

Para visualizar las fracciones obtenidas luego de la purificación y determinar el nivel de expresión y grado de pureza obtenidos, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 12%. Además, la concentración proteica de las fracciones se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar de TryS, $\epsilon = 131000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Por último se evaluó la actividad enzimática de CfTryS C59A en las fracciones obtenidas (sección 3.2.2).

***Gel de poliacrilamida 12%

Para preparar 10 mL de gel separador al 12% se debieron agregar y mezclar: 3.3 mL de agua destilada, 4.0 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30%, 2.5 mL de buffer de separación (Tris-HCl 1.5 M pH=8.8), 0.1 mL de SDS 10%, 0.1 mL de APS 10% y 4 μ L TEMED.

Para preparar 4 mL de gel concentrador al 5% se debieron agregar y mezclar: 2.7 mL de agua destilada, 0.67 mL de acrilamida/bis-acrilamida al 30%, 0.5 mL de buffer de concentración (Tris-HCl 0.5 M pH=6.8), 40 μ L de SDS 10%, 40 μ L de APS 10% y 4 μ L TEMED.

3.2. Ensayos enzimáticos

3.2.1. Determinación de actividad de hTrx1 con insulina y DTT

Para medir actividad tiorredoxina de hTrx1 se utilizó como base un protocolo existente en el cual se determina actividad tiorredoxina de *E. coli* mediante reducción de los puentes disulfuro intercatenarios de la insulina determinando la precipitación de la cadena β libre, que puede ser seguida mediante turbidimetría (utilizando un $\lambda = 650$ nm) [38].

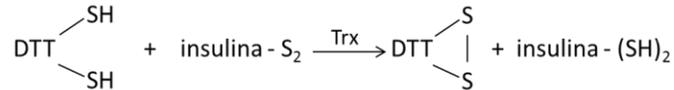


Figura 12 - Reacción de reducción de insulina por hTrx1 mediante DTT

Las condiciones utilizadas en este ensayo de actividad son las siguientes; para un volumen total de 100 μ L las concentraciones finales de insulina y DTT fueron 130 μ M y 1.5 mM respectivamente y se utilizaron dos concentraciones de hTrx1 diferentes, 20 y 100 μ M. El experimento se realizó a pH = 7.4 utilizando un amortiguador NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, DTPA 0.1 mM. La reacción se inició con el agregado de DTT y se registró la absorbancia en un lapso de 12 minutos. Como control se realizó el ensayo sin la presencia de hTrx1.

3.2.2 Determinación de actividad sintetasa de TryS

La actividad sintetasa de CfTryS C59A se determinó espectrofotométricamente utilizando un ensayo enzimático acoplado (Figura 13) [22]. En dicho sistema, la oxidación de NADH por la lactato deshidrogenasa (LDH) es directamente proporcional al consumo de ATP por la TryS. La enzima encargada de conectar ambas reacciones es la piruvato quinasa (PK) al regenerar ATP a partir de ADP y fosfoenol piruvato (PEP), produciendo piruvato que es reducido a lactato por la LDH a expensas de NADH. Se siguió su oxidación en el tiempo midiendo absorbancia a 340 nm, longitud de onda a la cual absorbe el NADH.

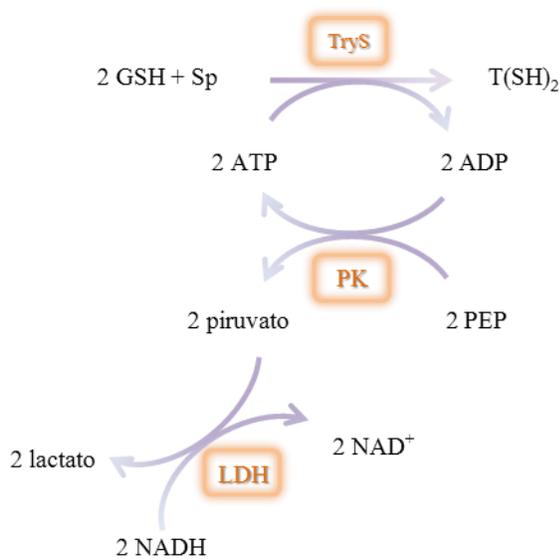


Figura 13 - Esquema del ensayo acoplado para la determinación de la actividad sintetasa de CfTryS C59A. El sistema de síntesis de T(SH)₂ por TryS, puede acoplarse a un sistema de regeneración de ATP. Los sistemas se acoplan mediante la piruvato quinasa (PK) que regenera ATP y consume fosfoenol piruvato (PEP) dando piruvato. Este último es reducido por la lactato deshidrogenasa (LDH) a expensas de NADH cuya oxidación puede seguirse en el tiempo a 340 nm.

Para este ensayo se utilizó una cubeta de cuarzo en la cual el volumen final fue de 120 μ L. La mezcla de reacción consistió en DTT 0.8 mM, GSH 0.8 mM, PEP 3.6 mM, ATP 3.1 mM, LDH 1.6 U y PK 1.6 U en amortiguador HEPES 100 mM con EDTA 0.5 mM y MgSO₄ 10 mM.

A la mezcla de reacción se agregó concentraciones variables de TryS (0.3 y 0.61 μ M) y NADH a una concentración final de 240 μ M. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente hasta obtener una línea de base estable a 340 nm, y se inició la reacción agregando espermidina (Sp) en una concentración final de 9.3 mM.

A su vez se realizó un ensayo control para comprobar que el sistema acoplado funcione correctamente. Para ello, a la mezcla de reacción se agregó NADH en una concentración final de 240 μM y luego ADP cuya concentración final fue de 3.1 mM.

Se siguió la oxidación de NADH, mediante medidas de absorbancia a 340 nm en el tiempo durante aproximadamente 2 minutos.

3.3. Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión

Previo a la síntesis del tiol es necesaria la expresión y purificación de tripanotión sintetasa (ver 3.1.3).

3.3.1. Síntesis de tripanotión y cuantificación de fosfato

Se utilizó como base un protocolo existente con algunas modificaciones [22]. La metodología utilizada para la síntesis de tripanotión consiste en permitir la circulación de los sustratos necesarios por una columna HisTrap en la cual se encuentra inmovilizada la enzima CfTryS C59A que contiene una cola de histidinas en su extremo aminoterminal. Simultáneamente, teniendo en cuenta que en la reacción de síntesis se da la hidrólisis del ATP, fue posible cuantificar fosfato (mediante el uso de verde de malaquita, VM) para seguir el avance de la reacción.

Para realizar la síntesis se equilibró una columna HisTrap GE Healthcare con 10 volúmenes de amortiguador A (HEPES 100 mM, MgSO_4 10 mM pH = 7.2) y se sembraron 2 mL de CfTryS C59A (stock ~ 7.3 μM) previamente purificada. A continuación se dejó recircular una solución que contiene los sustratos de T(SH)₂; la misma consistió en GSH 5 mM, Sp 2.5 mM, ATP 1 mM y DTT 2 mM en amortiguador MOPS 100 mM, MgSO_4 10 mM pH = 7.2. La recirculación se llevó a cabo hasta que se alcanzó la máxima cantidad de fosfato estimada para el final de la reacción de síntesis, que se alcanzó luego de 6 h.

Hay que tener en cuenta que la reacción entre VM y el fosfato resulta en un producto verde que absorbe a 620 nm. Como se puede observar en el gráfico $\text{abs}_{620\text{nm}}$ vs. tiempo (Figura 15), la

absorbancia se comienza a estabilizar al pasar 20 minutos de reacción. Por tanto al tomar alícuotas para la medida de fosfatos hubo que tener en cuenta dicho tiempo.

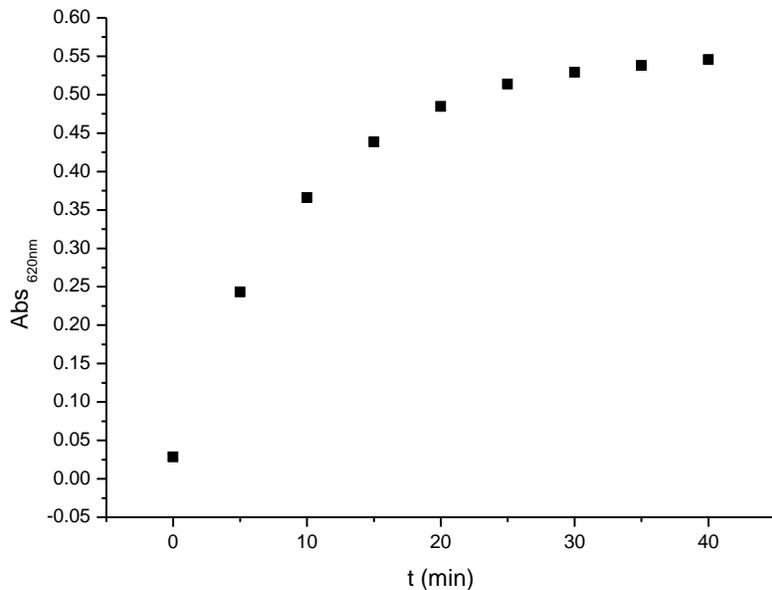


Figura 14 - Absorbancia obtenida a 620 nm a lo largo del tiempo para la reacción de verde de malaquita con fosfato.

Para comenzar se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones variables de fosfato, entre 0 y 2 nmoles (a partir de un stock Na_3PO_4 40 μM) en un volumen final de 150 μL y se midió absorbancia a 620 nm en una placa de 96 pocillos utilizando un equipo VARIOSKAN. Para ello, 100 μL del volumen total corresponden al VM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente se procedió a medir absorbancia y por último se graficaron los valores obtenidos en función de los moles de fosfato.

Utilizando la curva de calibración obtenida fue posible seguir el avance de la reacción tomando alícuotas cada 1 h, incubando 20 minutos y midiendo la absorbancia a 620 nm (hasta obtener los 50 nmoles de fosfato calculados para el término de la reacción). Las medidas se realizaron mezclando 50 μL de muestra en la dilución adecuada (de forma que estén dentro del rango de la curva de calibración) y 100 μL de VM.

3.3.2. Purificación de tripanotión

Para realizar la purificación del tiol se utilizó una resina del tipo Sp sephadex, una resina catiónica que cuenta con grupos sulfopropilo. Dicha resina funciona como un intercambiador catiónico, por tanto teniendo en cuenta que el tripanotión posee cargas positivas, quedará retenido a la misma y luego será eluido con un cambio en la fuerza iónica. El procedimiento se realizó en *batch*, para lo cual se equilibró la resina con 50 mL de una dilución 1/3 del buffer A. Luego de filtrada se resuspendió la misma con 50 mL de muestra también diluida 1/3 y se dejó agitando por 2 hs. Posteriormente se filtró la resina en la cual el tripanotión está retenido y se le agregó el agente reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 2 mM. Para realizar la elución, se resuspendió la resina en acetato de amonio 100 mM, se dejó durante toda la noche en cámara fría y se filtró.

Para corroborar la pureza de la muestra se tomó una alícuota y se derivatizó con monobromobimano en relación 3:1 con respecto a la concentración de tioles. Se analizó por cromatografía líquida HPLC (ver sección 3.4.3).

3.4. Procedimientos generales

3.4.1. Reducción de tioles

Para la realización de las reacciones con los diferentes blancos, es necesario que los tioles se encuentren en estado reducido. Para ello, se utilizó DTT como agente reductor.

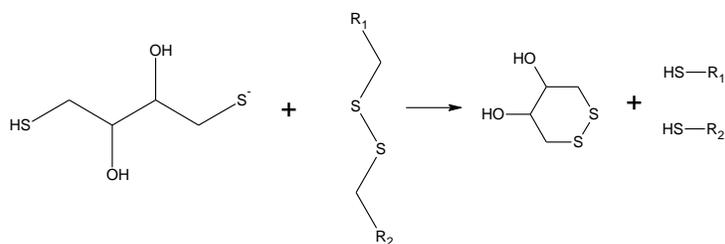


Figura 15 - Reacción de reducción de un enlace disulfuro con ditioneitol (DTT).

Luego de incubar a temperatura ambiente por 45 minutos para que se lleve a cabo la reacción de reducción, se quitó el DTT mediante gel filtración, utilizando una columna HiTrap Desalting -

GE Healthcare de 5 mL, conectada a un equipo ÄKTA Prime FPLC. La misma se equilibró con 20 mL de amortiguador tris 1.2 mM, acético 0.9 mM, pH = 7.4. Se inyectó 1 mL de muestra y se recolectaron fracciones de 0.6 mL a un flujo de 0.5 mL/min. El patrón de elución se siguió midiendo absorbancia a 280 nm.

3.4.2. Cuantificación de tioles con DTDPy

Para realizar las medidas de concentración de tioles se utilizó el reactivo 4-4'-ditiodipiridina (DTDPy), que al reaccionar con un tiol resulta en el producto 4-tiopiridona (Figura 16) el cual es cuantificable por absorbancia a 324 nm. Éste, presenta un coeficiente de extinción de $21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

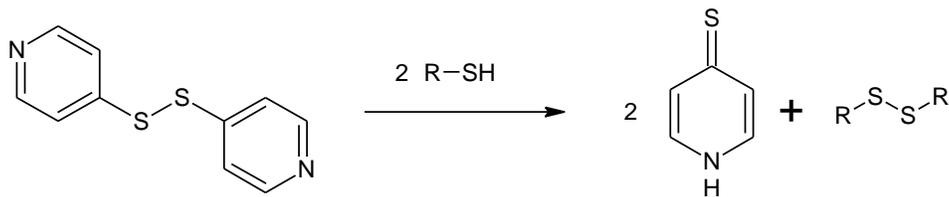


Figura 16 - Reacción general de un tiol con DTDPy

3.4.3. Corridas de HPLC

Para realizar las cromatografías en el equipo de HPLC se utilizó una columna de fase reversa C18, utilizando un $\lambda_{\text{ex}} = 396 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 482 \text{ nm}$. El flujo utilizado es de 0.5 mL/min, eluyendo con el siguiente gradiente:

Tabla 2 - Gradiente realizados para corridas en HPLC. Donde los solventes utilizados son A- 2.5 mL/L ácido acético pH 3; B- Metanol

Tiempo (min)	Soluciones
0-5	Elución isocrática con 90% solvente A y 10% solvente B
5-30	Gradiente lineal de 10 a 100% de solvente B
30-35	Solvente B

3.4.4. Preparación de compuesto 1

Para los ensayos que involucraron el compuesto 1 se utilizó un stock de concentración 7 mM, disuelto en DMSO. Al momento de realizar los ensayos se preparó una dilución 100 μ M, con 1 equivalente de NaOH 20 mM y llevado a volumen con agua.

3.5. Estudios cinéticos entre los compuestos y los distintos blancos

Las reacciones de alquilación llevadas a cabo pueden ser seguidas mediante fluorimetría, lo cual nos permitió realizar los ensayos cinéticos necesarios para determinar las distintas constantes de velocidad. Se tuvo en cuenta que no todos los blancos son fluorescentes; a continuación se describe la metodología utilizada para el caso de las proteínas TXN y Trx y los tioles GSH y HSA.

3.5.1. *Proteínas fluorescentes: TbTXN y hTrx1*

En el caso de los blancos proteicos como Trx o TXN se tuvo en cuenta su fluorescencia intrínseca debida al triptófano cercano a su sitio activo (WCXXC).

Para el caso de Trx ha sido demostrado que el espectro de emisión posee máximos a 340 nm correspondientes al Trp, luego de haber excitado a 280 nm, y que a su vez, dicho valor se ve modificado al variar ciertas condiciones del medio y al haber cambios en el estado de óxido-reducción del sitio activo [39]. Por tanto fue posible seguir la reacción de alquilación en el tiempo entre el compuesto 1 y las proteínas utilizando un $\lambda_{ex} = 280$ nm y $\lambda_{em} = 340$ nm.

Se trabajó en condiciones de pseudo primer orden, es decir utilizando la concentración de compuesto en exceso (siendo ésta variable) con el fin de que sea considerada constante durante la reacción. Los cursos temporales se ajustaron a la ecuación exponencial de primer orden:

$$F = Amp \cdot e^{-k_{obs} t} + A_{inf} + bt \quad (\text{ec. 1})$$

donde F corresponde a la fluorescencia en el tiempo t , Amp es la fluorescencia final menos la inicial, k_{obs} corresponde a la constante de pseudo primer orden, A_{inf} es la fluorescencia a tiempo final y b es un parámetro de ajuste lineal en los casos en que hay otro proceso de orden

cero que se superponga con la reacción en estudio. La determinación de k_{obs} para diferentes concentraciones iniciales de compuesto permite la determinación de la constante de segundo orden aparente k_{ap} de la siguiente manera:

$$k_{obs} = k_{ap} [\text{compuesto}] \quad (\text{ec. 2})$$

Las condiciones de reacción se presentan en la tabla 3; todos los ensayos fueron llevados a cabo a 25°C.

Tabla 3 - Se presentan las condiciones iniciales para las reacciones llevadas a cabo con compuesto 1

Tiol	[RSH] (μM)	[C1] (μM)	[mBBr] (μM)	pH
tbTXN	1	20-60	-	7.2
hTrx1	1	10 - 50	-	7.2
GSH	0.5 (en DTPA 1mM)	4 - 24	8	8.2
HSA	0.9	20 - 130	16	8.6

Observación: Para todos los casos se realizó un control sin compuesto.

3.5.2. Tioles no fluorescentes: $T(\text{SH})_2$, GSH y HSA

Tres de los blancos en estudio, $T(\text{SH})_2$, GSH y HSA, no poseen un fluorocromo que permita seguir el avance de la reacción de alquilación por tanto la metodología utilizada consistió en el uso de reacciones paralelas estudiadas en un ensayo de competencia. Para ello se utilizó la reacción de alquilación por 4-bromometil-3,6,7-trimetil-1,5-diazabicyclo[3.3.0]octa-3,6-dieno-2,8-diona, conocido como monobromobimano (mBBr). La reacción que se lleva a cabo entre este bromoalcano y un tiolato es una sustitución nucleofílica (Figura 17) y el producto es un tioéter fluorescente cuyo $\lambda_{ex} = 396 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$ [40].

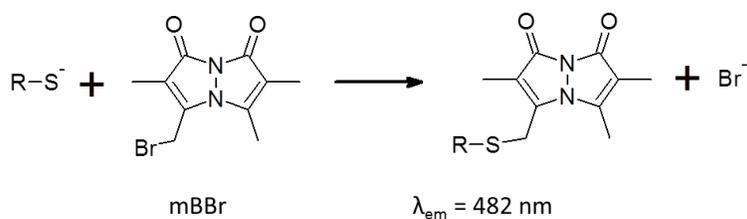
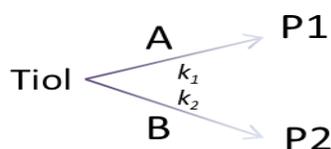


Figura 17 - Reacción general de alquilación de un tiol por monobromobimano

Cuando un tiol reacciona en paralelo con dos alquilantes presentes en gran exceso (mBBr y compuesto), el curso temporal de la aparición de cualquiera de los dos productos tiene la forma exponencial habitual de primer orden con una constante de velocidad (k_{obs}) dependiente de la concentración de ambos alquilantes y la constante de velocidad de las dos reacciones en competencia.



A y B son agentes alquilantes

P2 es un producto que se puede seguir en el tiempo

Teniendo en cuenta:

La ley de velocidad: $\frac{-d[\text{tiol}]}{dt} = k_1 [A][\text{tiol}] + k_2 [B][\text{tiol}]$

$[\text{tiol}] = [\text{tiol}]_o e^{-k_{obs}t}$ (*)

donde $k_{obs} = k_1 [A] + k_2 [B]$

Por balance de masas se cumple: $[\text{tiol}]_o - [\text{tiol}] = P1 + P2$ (**)

En la reacción los productos mantienen la relación: $\frac{[P1]}{[P2]} = \frac{k_1 [A]}{k_2 [B]}$ (***)

Si se despeja P1 de (**) y se sustituye en (***) $\rightarrow [\text{tiol}] = -P2 \frac{k_1 [A]}{k_2 [B]} - P2 + [\text{tiol}]_o$

Si $[\text{tiol}]$ se sustituye en (*) $\rightarrow -P2 \frac{k_1 [A]}{k_2 [B]} - P2 + [\text{tiol}]_o = [\text{tiol}]_o e^{-k_{obs}t}$

Reordenando esta última, se obtiene la forma integrada de la ley de velocidad para $P2$

$$P2 = \frac{[tiol]_0 k_2 [B]}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) \quad (\text{ec. 3})$$

Entonces, si se ajusta un curso temporal de $P2$ a la ecuación exponencial anterior se obtiene el valor de k_{obs} y sabiendo que $k_{obs} = k_1 [A] + k_2 [B]$ un gráfico de k_{obs} vs. $[A]$ determinará mediante su pendiente el valor de k_1 . (Así, conociendo la constante de velocidad k_1 , las concentraciones de los dos alquilantes y determinando experimentalmente k_{obs} , se puede obtener el valor de la constante desconocida k_2 [41]).

Concretamente en este caso:

$$k_{obs} = k_1 [mBBr] + k_2 [compuesto] \quad (\text{ec. 4})$$

De la pendiente del gráfico k_{obs} vs. $[compuesto]$ se obtiene el valor de k_2 , constante de velocidad de segundo orden para la reacción de alquilación del tiol por el compuesto; mientras que a partir la ordenada en el origen, se obtiene k_1 , constante de velocidad de segundo orden para la reacción de entre el monobromobimano y el tiol.

Una gran ventaja que posee este método es que la reacción con mBBr tiene una sensibilidad que permite el seguimiento de la formación del producto en el tiempo, en concentraciones extremadamente pequeñas (en el orden nanomolar).

En la tabla 3 (sección 3.5.1) se presentan las condiciones de reacción para todos los ensayos cinéticos (a 25°C).

3.5.3. Validación del método por competencia con monobromobimano

Se llevó a cabo la validación del método por competencia con mBBr, mediante la reacción de competencia entre yodoacetamida (IAM, agente alquilante) y los tioles GSH y HSA. Para el caso del GSH, se siguió la formación de GS-bimano en el tiempo para concentraciones crecientes de

IAM, mediante la emisión de fluorescencia a 482 nm (utilizando $\lambda_{ex} = 396$ nm). A partir de allí se determinaron las diferentes k_{obs} para cada concentración de IAM. Luego se determinó la constante de velocidad de la reacción mediante un gráfico de segundo orden (k_{obs} vs. [IAM]). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes, $[GSH]_0 = 0.5 \mu\text{M}$, $[mBBr] = 8 \mu\text{M}$, $[IAM] = 0$ a $300 \mu\text{M}$. Se trabajó a pH 8.5 a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

De la misma forma se realizó la validación con albúmina en las siguientes condiciones, $[HSA]_0 = 0.5 \mu\text{M}$, $[IAM] = 0$ a $300 \mu\text{M}$, $[mBBr]_0 = 8 \mu\text{M}$, pH 8.4, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Expresión y purificación de triparredoxina de *Trypanosoma brucei*

Para poder realizar los ensayos cinéticos correspondientes a la alquilación de TbTXN fue necesario efectuar previamente su expresión y purificación.

El primer paso de la purificación de TXN consistió en el pasaje del material soluble del cultivo bacteriano por una IMAC. El contenido de las fracciones obtenidas se analizó mediante su siembra en una SDS PAGE al 15 % (Figura 18-A). Como se puede observar, el peso molecular de las bandas obtenidas en el segundo lavado y las seis primeras fracciones es consistente con el peso molecular esperado para las proteínas Trx y TXN unidas (28 kDa aproximadamente).

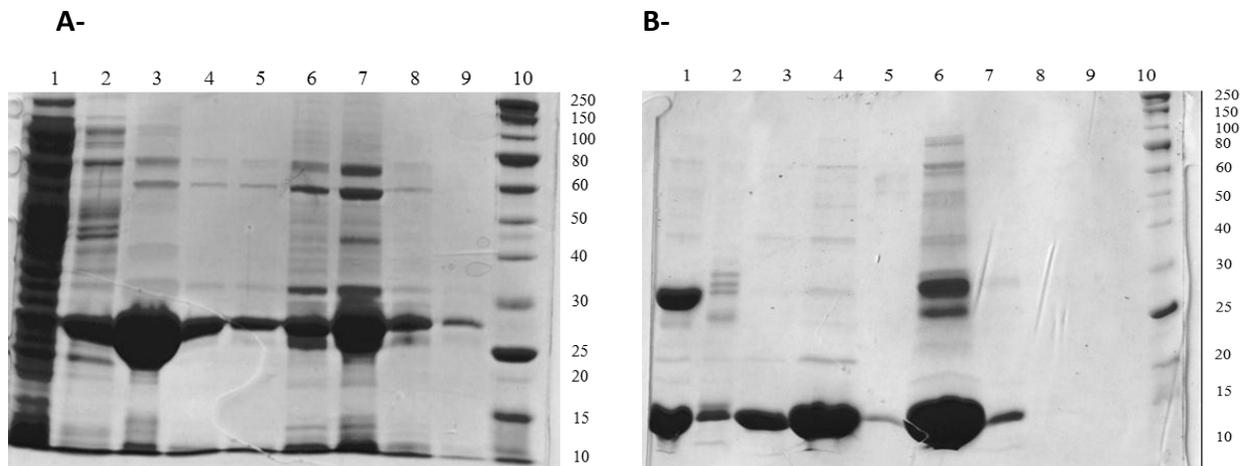


Figura 18 - A- SDS PAGE 15 % post HisTrap. Carriles: 1- FNU, 2- Lavado 1, 3- Lavado 2, 4- F1, 5- F2, 6- F3, 7- F4, 8- F5, 9- F6, 10- PM, **B-** SDS PAGE 15 %. Carriles: 1 y 2- corresponden al lavado 2 y una mezcla de las fracciones 1 a 6 obtenidas de la primer IMAC con el agregado reciente de TEV, 3- Lavado 1 post digestión, 4- FNU, 5- F1, 6- F3, 7- F4, 8- F5, 9- F6, 10- PM

De las fracciones obtenidas fueron elegidas para la digestión con la proteasa de TEV el lavado 2 y las fracciones 1 a 4 por su alto contenido en His-Trx-TXN que como se mencionó en la sección 3.1.1, ambas proteínas están separadas por un sitio de corte para dicha proteasa. Una vez realizada la digestión, la muestra fue separada mediante una IMAC, en la cual es de esperar que quede retenida a la columna la cola de histidinas unida a EcTrx y que TbTXN eluya en la fracción no unida (FNU). Nuevamente, las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante SDS PAGE 15% (Figura 18-B) confirmando que la FNU (carril 4) es la fracción que contiene TXN. Los carriles 1 y 2 corresponden al lavado 2 y una mezcla de las fracciones 1 a 6 obtenidas de la primer IMAC

con el agregado reciente de proteasa por cual es de esperarse que la digestión no se lleve a cabo. Sin embargo, el hecho de haber congelado las muestras y haberlas sembrado un día posterior puede haber resultado en el corte de las mismas ya que se observan bandas alrededor de los 15 kDa. A su vez, en el carril 1 aparece una banda cercana a los 25 kDa que concuerda con el peso molecular de la proteasa de TEV. El carril 6, en el cual se observa una banda de gran intensidad correspondiente a EcTrx también se observan 2 bandas entre los 25 y 30 kDa dando la pauta que no se dio la digestión proteica en su totalidad y que por tanto sigue habiendo His-Trx-TXN, y que a su vez la proteasa haya eluido con altas concentraciones de imidazol.

Para finalizar la etapa de purificación, se midió concentración proteica a la fracción que contiene la TXN, mediante absorbancia a 280 nm resultando en 362 μ M.

4.2. Expresión y purificación de tiorredoxina 1 humana (hTrx1)

Previo a ensayos cinéticos con hTrx1, fue necesaria su expresión y purificación a partir de una cepa recombinante. Luego de su expresión, la fracción soluble del lisado bacteriano se sometió a una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. A las fracciones obtenidas se le midió absorbancia a 280 nm con el fin de determinar las concentraciones proteicas y así se obtuvo el cromatograma de la Figura 19-A. En el mismo se pueden observar dos picos de acuerdo a cómo se dio la elución de la columna; el hecho que existan estos dos picos puede dar indicio de que hayan dímeros presentes en la solución proteica. Las fracciones correspondientes a ambos picos más una tercera zona que presentó un leve aumento de la absorbancia (pico 3) fueron colectadas para ser sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante 15 % (Figura 19-B), tanto en presencia y ausencia de β -mercaptoetanol con el fin de verificar si hay realmente dímeros presentes. En todos los carriles se observa una banda cuyo peso molecular corresponde al de hTrx1 (12 kDa), confirmando su presencia pero descartando la presencia de dímeros.

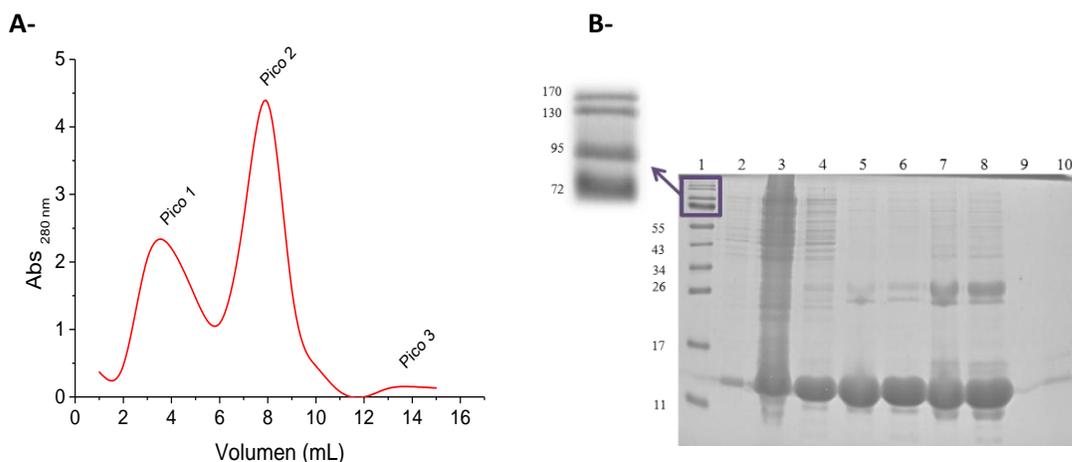


Figura 19- A- Cromatograma post- IMAC, **B-** SDS PAGE 15% post IMAC. Carriles: 1- PM, 2-Lavado pre-IMAC, 3- FNU, 4- Lavado 1, 5- Pico 1 -βMe, 6- Pico 1 + βMe, 7- Pico 2 -βMe, 8- Pico 2 +βMe, 9- -, 10- Pico 3 + βMe

A continuación se extrajo del gel anterior un fragmento de la banda presente en el carril 6 con el fin de realizar un análisis por espectrometría de masas y de esa forma comprobar la identidad de la proteína y su pureza. Un aspecto que llamó la atención de este análisis, es que la extensión de 6 histidinas que se esperaba estuviese en el extremo amino terminal no se encontraba allí. Por el contrario, a partir de este resultado, se concluyó que la cola de histidinas estaba presente en el extremo C-terminal. Como consecuencia de este hallazgo, no fue posible su digestión con trombina ya que el sitio de corte para la misma está presente en Nt. Una explicación posible es que haya habido algún error durante la construcción del plásmido para lo cual lo correcto hubiese sido realizar la secuenciación del mismo como control. De todas formas, el hecho que la cola no pueda digerirse no afecta al momento de las reacciones de alquilación.

Posteriormente, se realizó un segundo paso de purificación de la proteína mediante SEC con el fin de obtener un grado mayor de pureza de la proteína. El perfil de elución de la cromatografía muestra la presencia de tres picos correspondientes a los volúmenes de retención 8.4, 11.7 y 13.6 mL (Figura 20-A). Estos picos más una zona entre los dos primeros que presentó una meseta fueron colectados y sembrados en una SDS PAGE 15% para determinar cuáles

fracciones contenían la proteína (Figura 20-B). A partir de su análisis se determinó que el tercer pico (sembrado en el carril 7) corresponde a hTrx1 de acuerdo al peso molecular que presenta. En el carril 1 donde se sembró el marcador de peso molecular se observa una banda entre las de 11 y 17 kDa que puede deberse a una contaminación proveniente de la siembra del carril 2, en el cual se sembró una muestra correspondiente al pre-pasaje por la gel filtración.

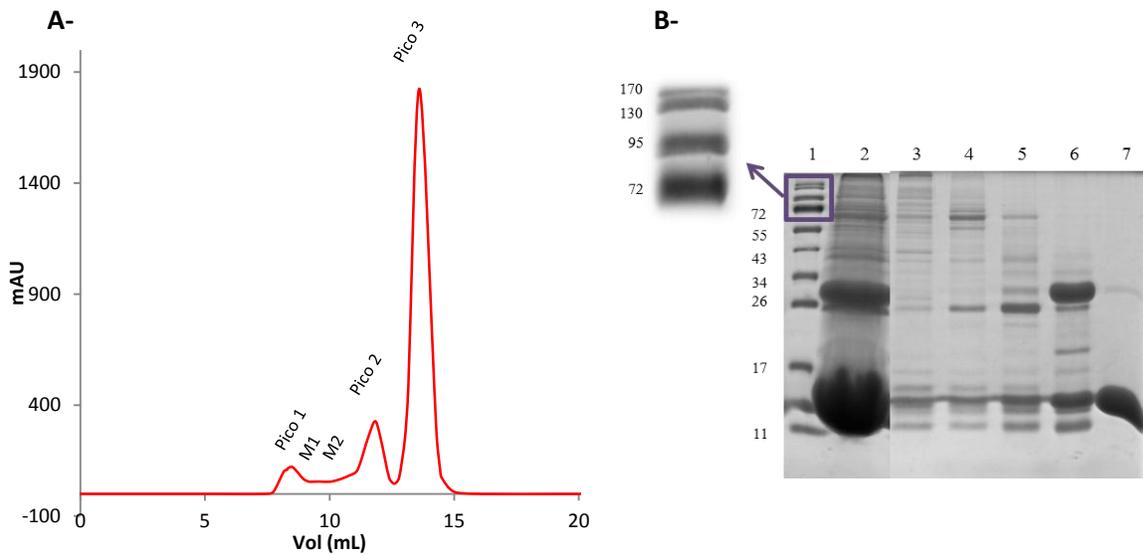


Figura 20 - A- Perfil de elución obtenido en la SEC. **B-** SDS PAGE 15% post SEC. Carriles: 1- PM, 2-Lavado pre-SEC, 3- Pico 1, 4- meseta 1 (M1), 5- meseta 2 (M2), 6- Pico 2, 7- Pico 3

4.2.1. Actividad tiorredoxina de hTrx1

Para poder determinar si la proteína humana purificada posee actividad Trx, se realizó un ensayo en el cual se sigue la precipitación de insulina a través de medidas de absorbancia a 650 nm. La precipitación se da a través de la reducción de insulina por la hTrx1. Por tanto como se puede ver en la Figura 21 se observa el cambio de absorbancia a 650 nm a lo largo del tiempo debido a la precipitación de insulina indicando que hTrx1 la está reduciendo, por tanto se demuestra que la proteína purificada es activa. Esto lo vemos al comparar las curvas de 20 y 100 μ M de proteína con el control, el cual no contaba con la presencia de hTrx1. Con este resultado obtenido, fue posible continuar y llevar a cabo las reacciones correspondientes para determinar las constantes cinéticas de reacción planteadas para este trabajo.

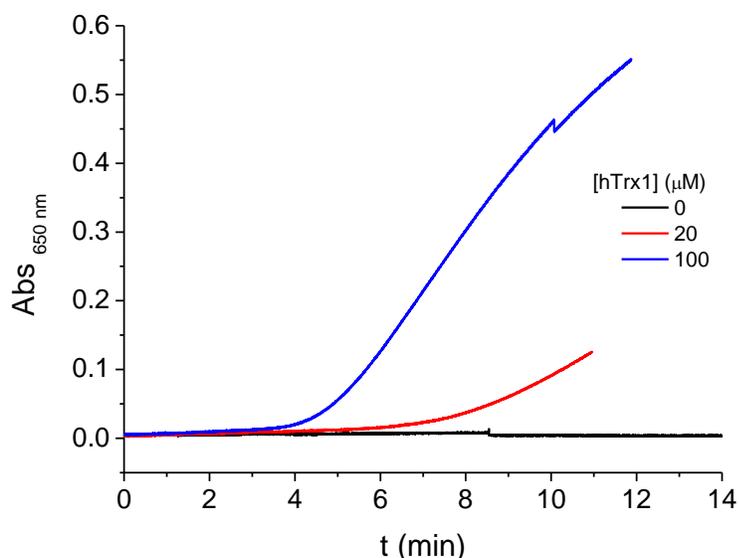


Figura 21 - Actividad tiorredoxina seguida mediante precipitación de insulina a 650 nm. La línea negra corresponde al control (sin el agregado de hTrx1), las líneas rojas y azul a 20 μ M y 100 μ M de hTrx1.

4.3. Expresión y purificación del mutante C59A Tripanotión sintetasa de *Crithidia fasciculata*

Previo síntesis del tiol de bajo peso molecular, fue necesaria la expresión y purificación de TryS de *C. fasciculata*. Como se mencionó con anterioridad, se utilizó una mutante que tenía inserta una alanina en la posición 59 en lugar de su cisteína, la cual es la principal responsable de la actividad amidasa de la enzima. Por tanto esta proteína será incapaz de hidrolizar el producto para generar sus sustratos, es decir que no es capaz de generar GSH, Sp y el intermediario Gsp a partir de tripanotión.

Luego de la expresión de CfTryS C59A, utilizando un medio de autoinducción se continuó con la purificación de la enzima. Para ello, la fracción soluble del cultivo bacteriano fue sembrada en una columna HisTrap y el contenido de las fracciones que se obtuvieron fueron analizadas mediante electroforesis en una SDS PAGE al 12% (Figura 22-A). Como puede observarse en los carriles 7, 8 y 9 se encuentran las fracciones cuyas bandas coinciden con el peso molecular de la enzima, 74 KDa aproximadamente. Solamente se seleccionaron las fracciones correspondientes al carril 8 por ser las de mayor grado de pureza. La concentración de CfTryS C59A que se obtuvo luego de su expresión y purificación fue de 7.3 μ M en un total de 5 mL.

Una vez obtenida la proteína se procedió a confirmar si se contaba con una enzima activa, para lo cual se midió actividad sintetasa de CfTryS C59A mediante un sistema acoplado como ya se mencionó en la sección 3.2.2. En el gráfico que se muestra a continuación (Figura 22-B) se puede observar cómo disminuye a lo largo del tiempo la cantidad de NADH en el sistema al ser oxidado por la enzima lactato deshidrogenasa. Este hecho implica que en el sistema acoplado se está produciendo a su vez la hidrólisis de ATP a ADP y que por tanto se cuenta con una TryS activa.

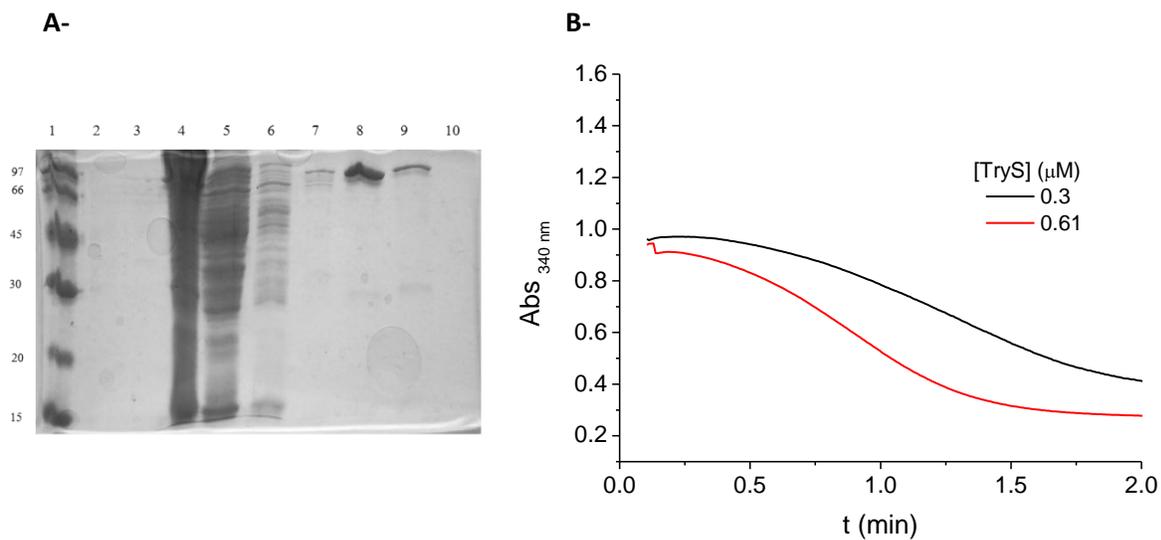


Figura 22 - A- SDS PAGE 12 % post IMAC. Carril 1- PM, 2- 4 hs de cultivo a 37°C, 3- F_{soluble} post sonicado, 4- F_{no soluble} post sonicado, 5- F_{NU}, 6- F₁, 7- F₁₁, 8- F₁₂ a F₁₆, 9- F₁₇, 10- **B-** Gráfico de absorbancia a 340 nm en función del tiempo de reacción obtenidos luego del ensayo de actividad TryS.

4.4. Síntesis bioquímica y purificación de tripanotión

4.4.1. Síntesis de tripanotión y cuantificación de fosfato

Una vez obtenida la enzima encargada de la síntesis de tripanotión se procedió a realizar dicha síntesis para posteriormente poder determinar la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de alquilación del tiol por C1.

Como ya se mencionó, se tomó como base un protocolo existente con la diferencia que se inmovilizó la enzima TryS en una IMAC de forma que los sustratos recirculen por la columna. Si

bien se encontró una metodología para el seguimiento de la reacción a través de la cuantificación de fosfato, no es seguro que se esté dando la formación de $T(SH)_2$.

Para la primera etapa, de síntesis, se realizó el seguimiento de la misma a través de la formación de fosfato mediante el uso de verde de malaquita. Para ello fue necesario realizar una curva de calibración (Figura 23-A) y tomar alícuotas de la mezcla recirculante cada 1 hora hasta que el consumo de fosfato debido a la hidrólisis del ATP se dio en su totalidad. En este caso se esperaba obtener como máximo 50 nmoles de fosfato, que fueron obtenidos luego de 6 horas de reacción (Figura 23-B). Se puede visualizar que al transcurrir el tiempo de reacción la velocidad de formación de fosfato varía; entre las 2 y 4 hs es donde se observa la mayor velocidad. El hecho que al comienzo la reacción sea lenta puede deberse a la inhibición de la tripanotión sintetasa por sustrato, específicamente por GSH [22].

Paralelamente, se realizó un control sin enzima, a partir de la misma mezcla utilizada en la reacción de síntesis. El mismo, indica que no hay formación de fosfato debido a otros factores (Figura 23-B).

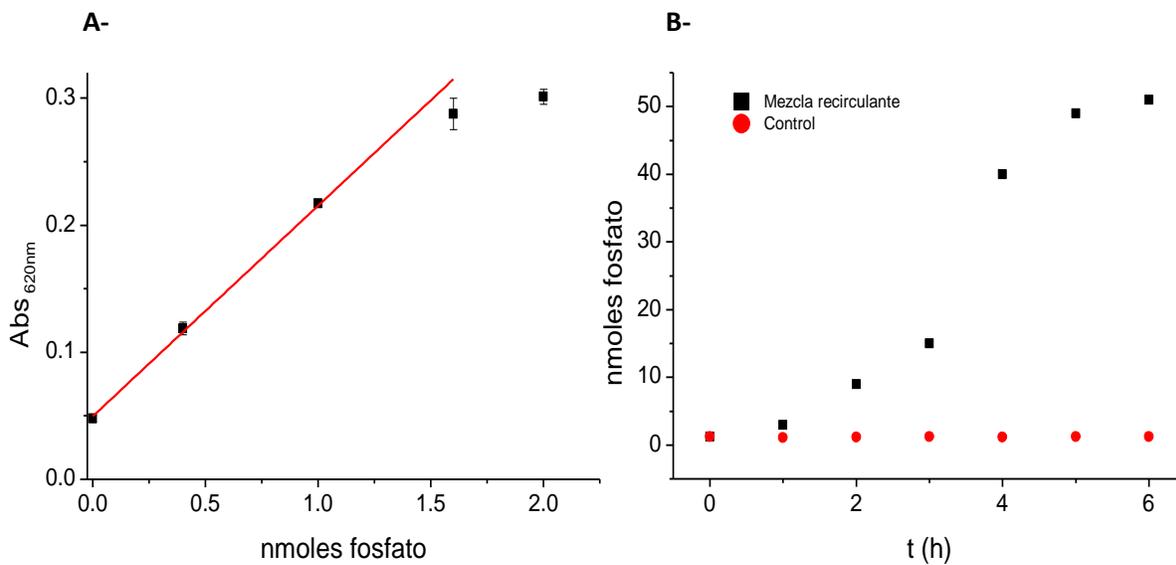


Figura 23 - A- Curva de calibración para el seguimiento de la formación de fosfato. **B-** Formación de fosfato en el tiempo de reacción. Control - puntos rojos, Mezcla recirculante - cuadrados negros,

4.2.2. Purificación de tripanotión

Para la realización de la purificación del tiol se utilizó una resina de intercambio iónico. En la resina catiónica queda retenido el tripanotión y es luego eluido con acetato de amonio. Al realizar la medida de tioles post-purificación resultó un rendimiento de 11%, muy bajo para lo esperado. Es probable que la resina no haya sido lo suficientemente efectiva. Un aspecto a tener en cuenta es que la medida que se realizó en esta instancia es de tioles totales, es decir que, puede haber restos de sustratos e intermediarios tiólicos (GSH, Gsp), a pesar que la medida de fosfato indique que la reacción culminó. Otro aspecto a tener en cuenta es que se realizaron medidas de tioles reducidos, por tanto es probable que parte del tripanotión esté en estado oxidado (TS₂) y no sea cuantificado.

Para verificar el contenido de la muestra purificada y confirmar la presencia del tripanotión, se tomó una alícuota de la muestra post-purificación y se derivatizó con mBBr. Ésta se sembró en una columna C18 de fase reversa conectada a un equipo de HPLC, para poder ser detectada mediante emisión de fluorescencia. A su vez, se comparó con dos muestras estándar de mBBr y una de tripanotión derivatizado (Figura 24).

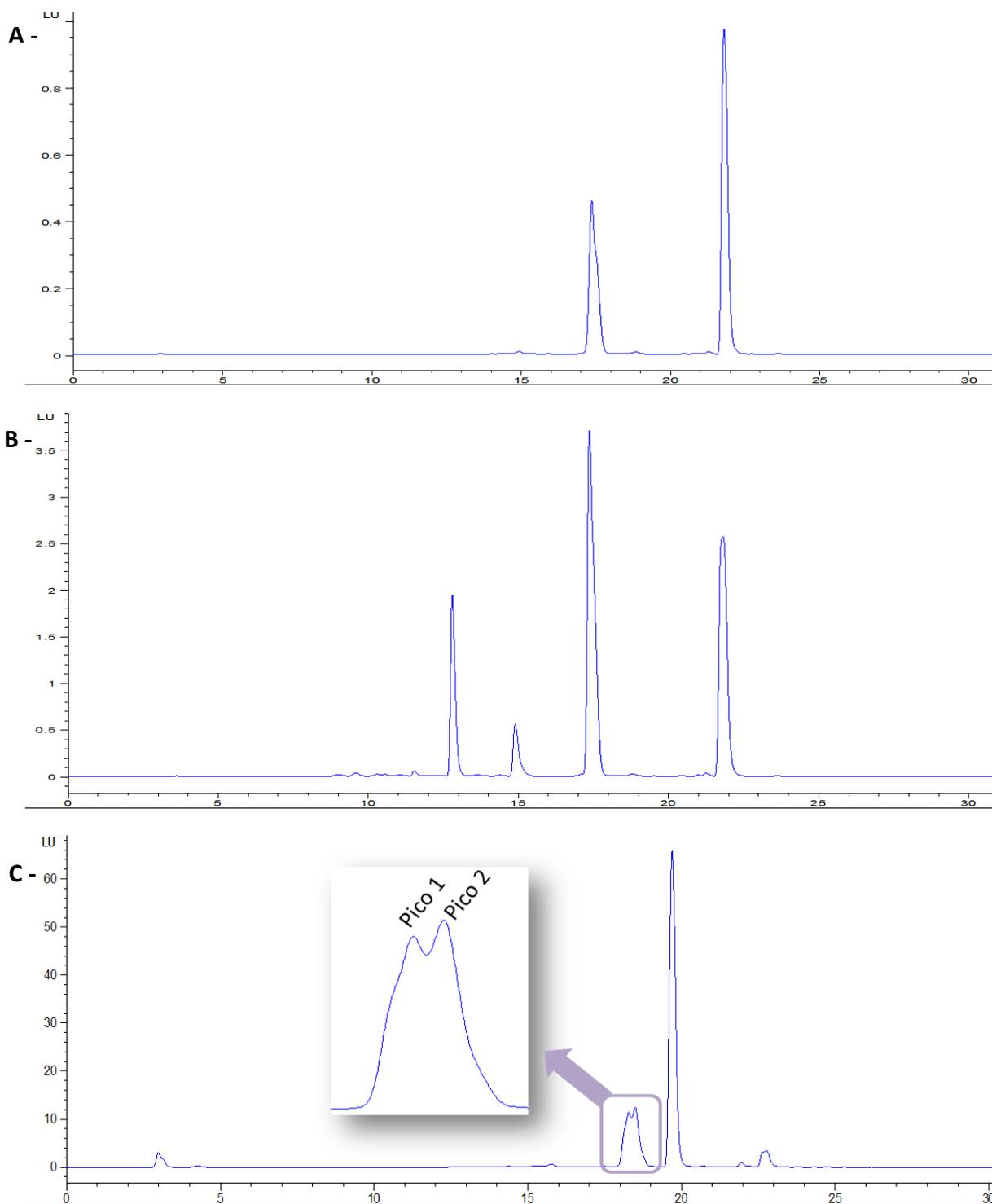


Figura 24 - Cromatogramas obtenidos luego de realizar HPLC. **A-** mBBr, dos picos de tiempos de retención 17.5 y 22 minutos, **B-** T(SH)₂ derivatizado con mBBr, posee cuatro picos, dos correspondientes al mBBr y dos a los 13 y 15 minutos **C-** muestra post purificación derivatizada con mBBr, se denomina "pico 1" y "pico 2" a las fracciones colectadas para su posterior análisis por espectrometría de masa.

Al analizar los cromatogramas obtenidos del HPLC se puede observar que en el estándar de mBBr (Figura 24-A) se aprecian dos picos cuyos tiempos de retención son 17.5 y 22 minutos, en el caso del estándar de tripanotión (Figura 24-B) puede observarse la presencia de cuatro picos, dos que corresponden a los tiempos de retención del mBBr y dos más a los 13 y a los 15 minutos. El hecho que se observen dos picos en las corridas de las muestras estándar indicaría que poseen algún tipo de contaminante o impureza. En el caso de la muestra purificada y derivatizada (Figura 24-C) el patrón de elución no coincide con los tiempos de retención obtenidos para los estándares. Se puede apreciar la presencia de dos picos que no poseen muy buena resolución entre los 17 y 18 minutos y un pico de mayor intensidad a los 20 minutos.

Si bien los picos no coinciden con los patrones de elución de las muestras estándar, los dos primeros picos no muy bien resueltos fueron colectados y analizados por espectrometría de masas (Figura 25).

Todas las estructuras que pudieran estar presentes en la muestra purificada fueron tomadas en cuenta al momento del análisis de espectrometría de masa. Dichas estructuras corresponden a GSH, Gsp y T(SH)₂ unido a una o dos moléculas de mBBr según sea posible. No se obtuvieron resultados positivos ya que no hay picos que se correspondan con los pesos moleculares de las estructuras mencionadas.

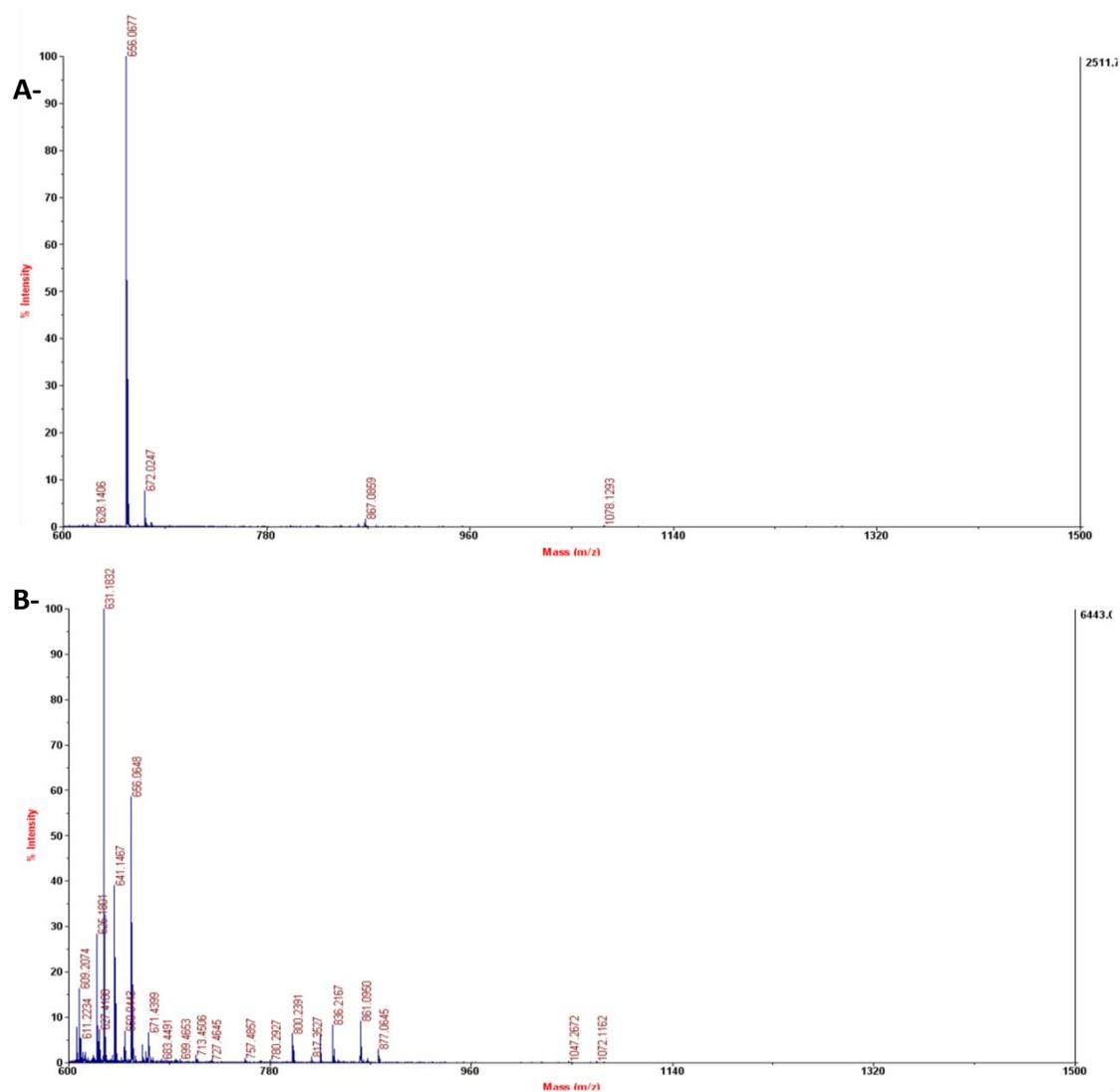


Figura 25 - Espectro de masas de la muestra purificada de T(SH)₂ por MALDI TOF. **A-** pico 1 **B-** Pico 2 correspondientes al HPLC. En ninguno de los 2 espectros se observa la presencia de picos correspondientes a la masa de T(SH)₂.

4.5. Estudios cinéticos entre Compuesto 1 y los distintos blancos

4.5.1. Proteínas fluorescentes: TbTXN y hTrx1

Una vez obtenidas las proteínas necesarias para el trabajo de tesina se comenzaron a realizar los ensayos cinéticos para cumplir con los objetivos planteados.

En primer lugar, se estudiaron las reacciones de alquilación de TbTXN y hTrx1 con el compuesto 1, a fin de determinar las constantes de velocidad de segundo orden, *k*. Como se desarrolló en

la sección 3.5.1, para ambas reacciones se utilizó la fluorescencia emitida a 340 nm a lo largo del tiempo para ver cambios en el estado redox del sitio activo reflejados en la emisión del Trp durante la reacción de alquilación. Por tanto una vez obtenidas las curvas de emisión de fluorescencia a 340 nm (utilizando $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) en función del tiempo fueron ajustadas a la ecuación exponencial de primer orden (**ec.1**), obteniendo así las constantes de pseudo primer orden (k_{obs}) para cada concentración de C1 (Figura 26-A, 26-C).

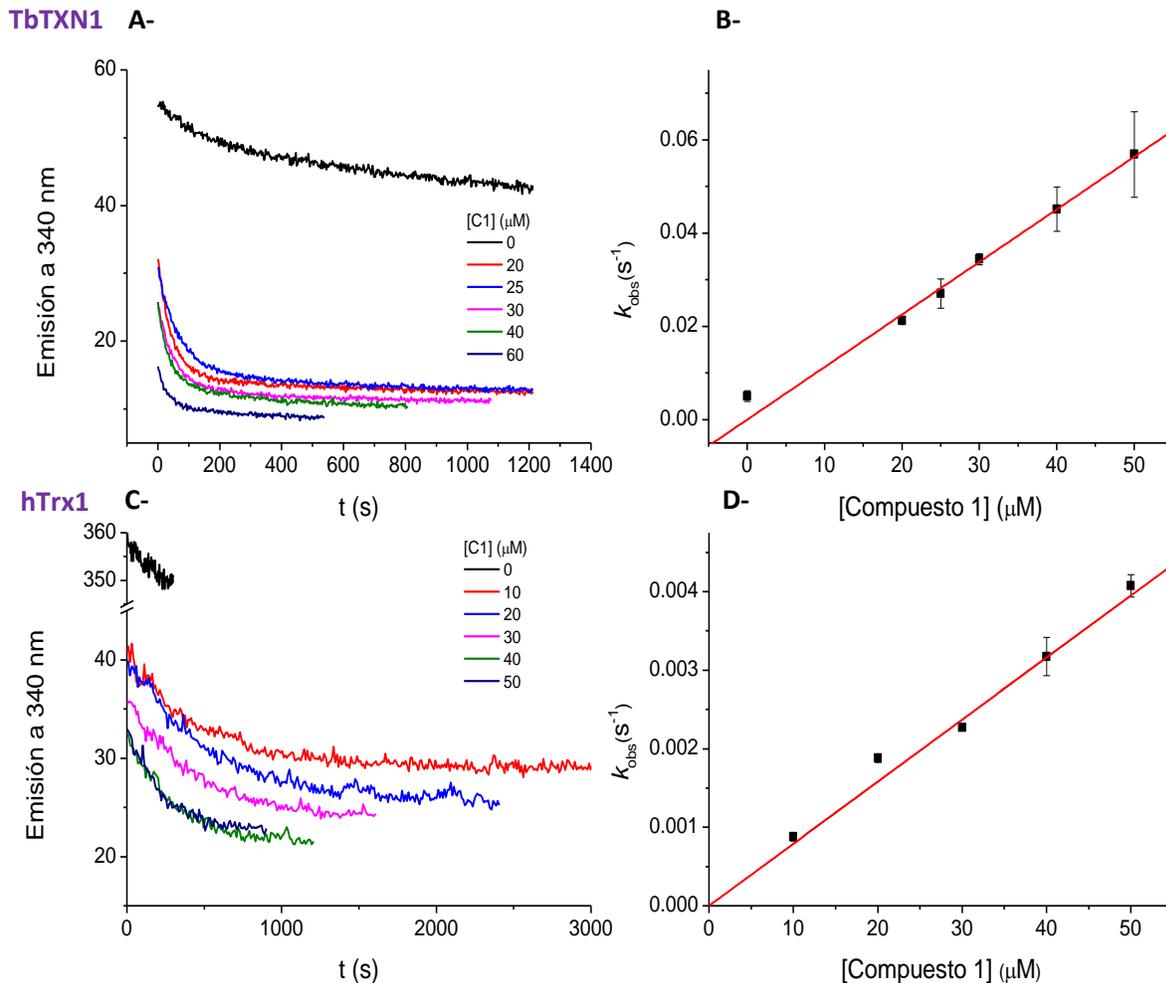


Figura 26 - Ajustes realizados para determinar las constantes de segundo orden de las reacciones de alquilación de TbTXN y hTrx1. En las figuras **A** y **B** se muestran los gráficos de emisión de fluorescencia a 340 nm vs. tiempo y k_{obs} vs. concentración de compuesto para la reacción de TXN y C1, respectivamente. En las figuras **C** y **D** se muestran los gráficos de emisión de fluorescencia a 340 nm vs. tiempo y k_{obs} vs. concentración de compuesto para la reacción de hTrx1 y C1, respectivamente. Todos estos experimentos fueron llevados a cabo a 25 °C y a pH 7.2.

A continuación, utilizando los valores de k_{obs} obtenidos fue posible determinar las constantes de velocidad de segundo orden a partir del ajuste lineal del gráfico k_{obs} vs. [compuesto 1] (Figura 26-B, 26-D). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 4.

Tabla 4 - Constantes de velocidad de segundo orden obtenidas para la reacción de alquilación de tbTXN y hTrx

Proteína	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	pH
tbTXN	1126 ± 12	7.2
hTrx1	77.0 ± 0.3	7.2

Al comparar los valores de las constantes determinadas vemos que la reacción de alquilación de TXN es de quince veces mayor con respecto a la obtenida para hTrx. Con estos resultados, hasta el momento podemos afirmar que es más rápida la reacción de alquilación por el compuesto 1 de TXN que de la hTrx1.

Hay dos aspectos a tener en cuenta al analizar los gráficos anteriores, en primer lugar se puede observar que, al aumentar la concentración de compuesto 1 se da una disminución de la emisión de fluorescencia inicial. Esto es debido a que a 340 nm, donde la emisión de fluorescencia del Trp posee un máximo, el compuesto 1 también absorbe como puede observarse en su espectro (Figura 27). Se produce un efecto de filtro interno en el cual a mayores concentraciones de compuesto la emisión del Trp se ve solapada y se refleja en los gráficos de emisión de fluorescencia en función del tiempo.

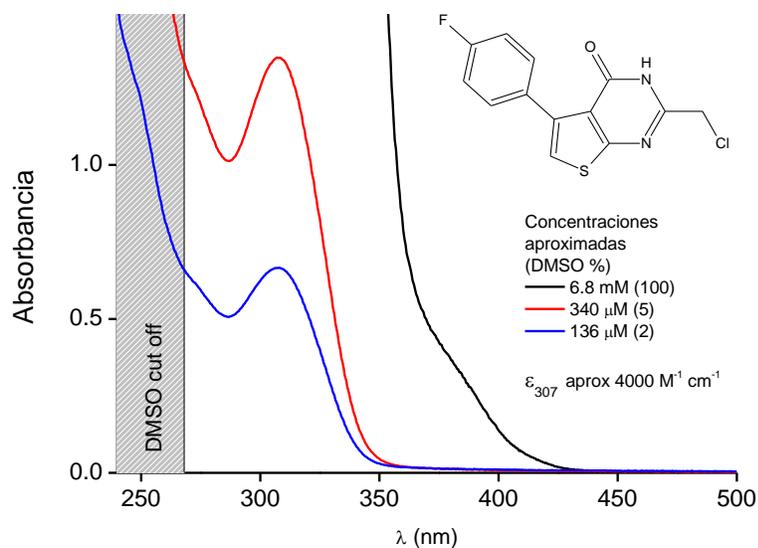


Figura 27 - Espectro UV del compuesto 1. Se observa que posee un pico máximo a 310 nm y que a su vez a 340 nm también absorbe.

En segundo lugar, en condiciones donde no está presente el compuesto, aún se detecta una caída en la fluorescencia en el tiempo tanto para TbTXN como para hTrx1 (Figura 26-A, 26-C). Existe evidencia previa que demuestra que la fluorescencia emitida por el Trp adyacente al sitio activo en Trx de *Escherichia coli* disminuye al oxidarse la proteína [39]. Previo al trabajo de la tesina, en el laboratorio fue llevada a cabo la reacción de alquilación de EcTrx por el compuesto 1. En la Figura 28 se pueden observar los resultados obtenidos, de donde se desprende que el valor de la constante de velocidad de segundo orden es $k = 47 \pm 7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, comparable a lo obtenido para tiorredoxina 1 humana. Si se compara el comportamiento de las corridas de esta reacción con las obtenidas para TbTXN y hTrx1 se puede observar que ante la ausencia de compuesto también se ve una caída en la fluorescencia y que por tanto se podría atribuir este hecho a la autooxidación de la proteína.

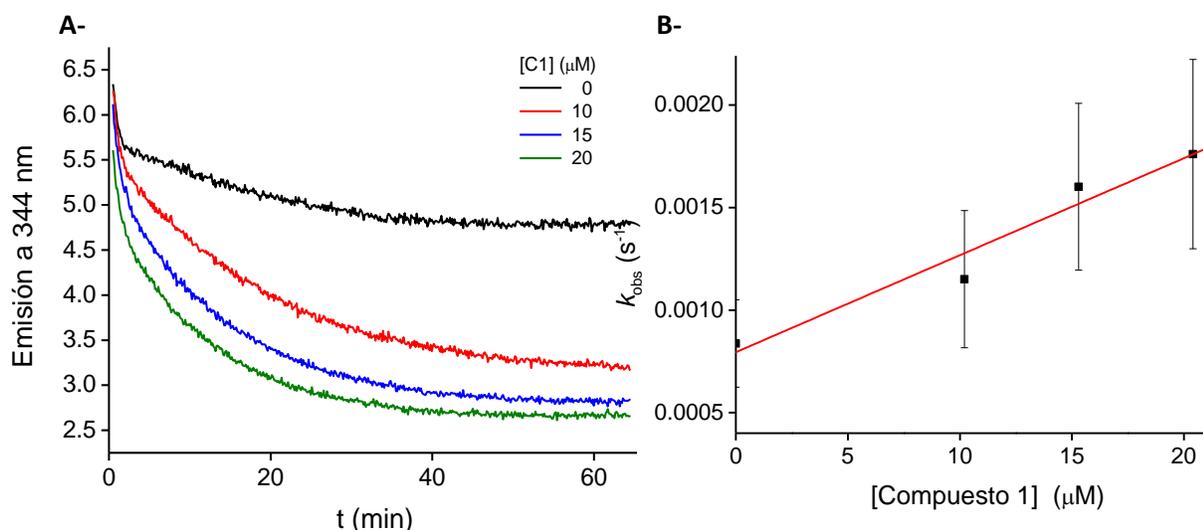


Figura 28 - Gráficos correspondientes a la alquilación de EcTrx por C1. **A** - se muestran los gráficos de emisión de fluorescencia a 340 nm vs. tiempo. **B** - k_{obs} vs. concentración de compuesto para la reacción. Las condiciones del experimento son 25 °C y pH 7.2.

4.5.2. Tioles no fluorescentes: GSH y HSA

- Validación del método por competencia con mBBr

Como ya se mencionó en la sección 3.5.2, la determinación de la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de alquilación entre los compuestos y dos de los blancos en estudio (GSH, HSA) no son capaces de ser determinadas espectrofotométricamente. Por tanto, se realizó mediante ensayos de competencia con mBBr, donde toman lugar reacciones paralelas; por un lado se da la reacción de mBBr con el tiol y por otro lado, la reacción de alquilación del tiol por el compuesto. Como ya se dijo, se siguió la aparición del producto de la reacción con mBBr mediante emisión de fluorescencia a 482 nm.

Para ello, se realizó previamente la validación del método en un ensayo que incluyó el uso de yodoacetamida como agente alquilante y los tioles GSH y HSA en donde se da una competencia entre IAM y mBBr para la reacción con el tiol. En primer lugar, a partir del gráfico de emisión de fluorescencia a 482 nm vs. tiempo se hallaron los valores de las distintas k_{obs} para las diferentes concentraciones crecientes de IAM, ajustando las curvas obtenidas a la **ec.3** descrita en 3.5.2

(Figura 29-A, 29-C). A continuación, se graficaron dichos valores en función de las concentraciones de IAM para poder determinar el valor de la constante, k , a través de un ajuste lineal (**ec.4**) (Figura 29-B, 29-C). En este caso, los valores obtenidos fueron de $k = 3.8 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en el caso del GSH a $\text{pH} = 8.5$, $T = 25^\circ\text{C}$ y $1.62 \pm 0.05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para HSA $\text{pH} = 8.4$, $T = 25^\circ\text{C}$, acordes con el valores obtenidos de la bibliografía a distintos pH y temperaturas, $k = 0.91 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 20°C , $\text{pH} 8$ [42] y $k = 27.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 25°C pH independiente [43].

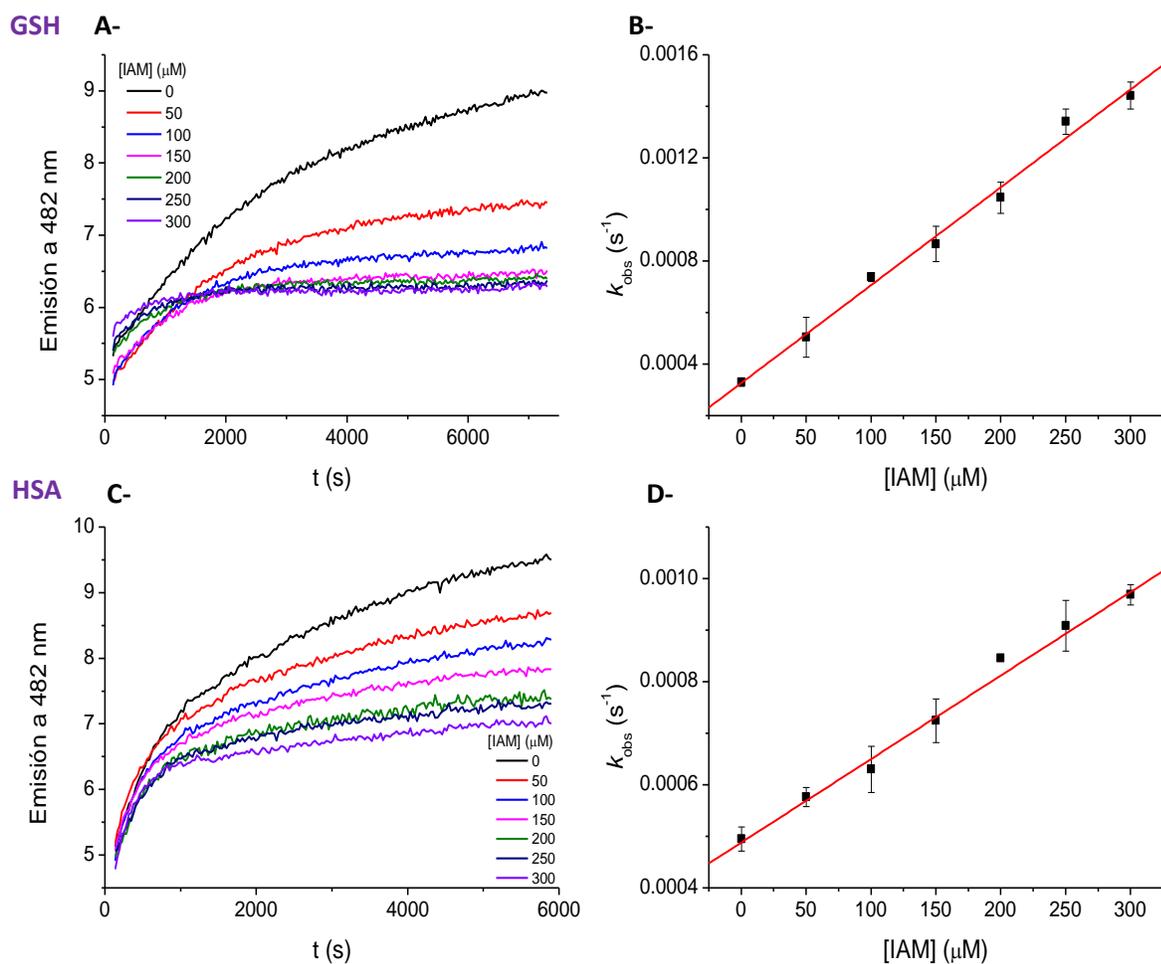


Figura 29- Gráficos obtenidos durante la validación del método por competencia con mBB. **A** y **C** gráficos de emisión de fluorescencia a 482 nm en función del tiempo para distintas concentraciones de IAM para GSH y HSA respectivamente. **B** y **D** gráficos k_{obs} vs. concentración de IAM para GSH y HSA respectivamente. Los valores de las constantes de velocidad de segundo orden obtenidas son $k_{\text{GSH}} = 3.8 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{HSA}} = 1.62 \pm 0.05 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

-Reacciones de alquilación de GSH y HSA

Una vez validado el método por competencia utilizando mBBR para poder seguir los cambios en el tiempo de reacción, fue posible hallar las constantes de velocidad de segundo orden para las reacciones de alquilación de GSH y HSA con el compuesto 1 (Figura 30).

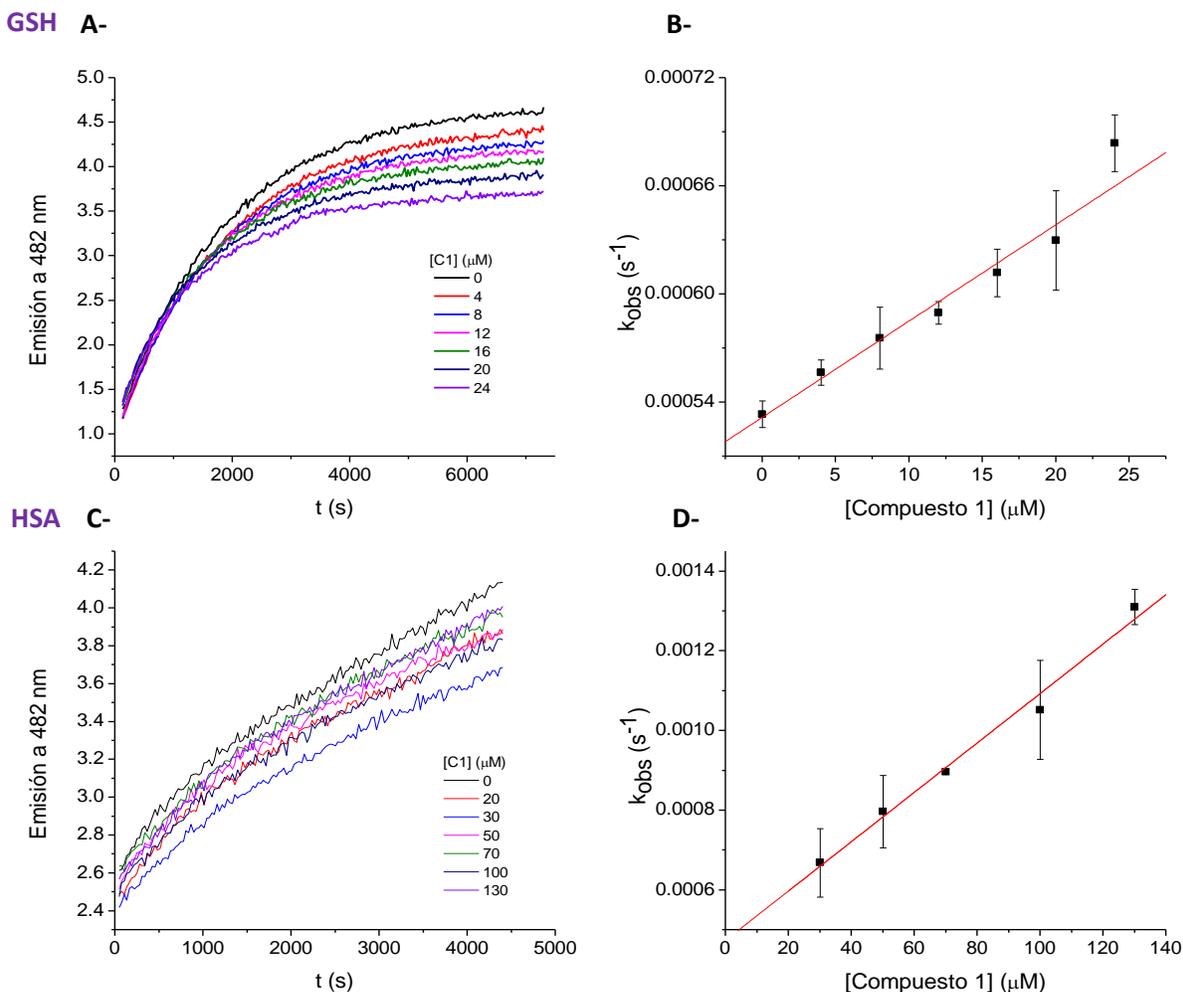


Figura 30- Ajustes realizados para determinar las constantes de segundo orden de las reacciones de alquilación de GSH y HSA. En las figuras **A** y **B** se muestran los gráficos de emisión de fluorescencia a 482 nm vs. tiempo y k_{obs} vs. concentración de compuesto para la reacción de GSH y C1 (pH 8.2), respectivamente. En las figuras **C** y **D** se muestran los gráficos de emisión de fluorescencia a 340 nm vs. tiempo y k_{obs} vs. concentración de compuesto para la reacción de HSA y C1 (pH 8.6), respectivamente.

A partir de los gráficos obtenidos se desprenden las constantes de velocidad de segundo orden. Estos valores pueden observarse en la siguiente tabla:

Tabla 5- Constantes de velocidad de segundo orden obtenidas para la reacción de alquilación de GSH y HSA.

Tiol	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	pH
GSH	5.3 ± 0.5	8.2
HSA	6.4 ± 0.4	8.6

Como se puede ver, las constantes para ambos tioles son menores que los obtenidos para la reacción de alquilación de TbTXN (ver Tabla 4), 212 y 175 veces menor para GSH y HSA respectivamente. Si se compara lo obtenido para hTrx1, la alquilación de GSH es de 15 veces menor y 12 para HSA. Un aspecto a tener en cuenta en estos ensayos es el pH utilizado durante el tiempo de reacción, ya que se llevaron a cabo a un valor de pH de 8.2 y 8.6 para GSH y HSA respectivamente, mayor al valor fisiológico, 7.4. Sabiendo que las constantes de velocidad son más pequeñas a menores valores de pH, estas reacciones serían aún menores a pH fisiológico, lo cual refuerza la idea que se tiene hasta el momento dejando a la alquilación de TXN en primer lugar en cuanto a su rapidez.

Otro dato cinético que se desprende de los ajustes lineales son las constantes de reacción de segundo orden para las reacciones de mBBR con los tioles, a partir de la ordenada en el origen (**ec.4**). Los valores obtenidos son 66.5 M⁻¹s⁻¹ y 29.5 M⁻¹s⁻¹ para GSH y HSA respectivamente. El valor que se obtuvo para la constante de GSH es comparable con datos reportados de donde se desprende que a pH 8.2 tiene un valor de 31 M⁻¹s⁻¹ [44].

4.6. Solubilidad del compuesto 2

Para poder comenzar a trabajar con el compuesto 2, se partió tomando como base las mismas condiciones en las cuales es posible disolver C1 (ver 3.4.4). Al momento del agregado del NaOH, visualmente se pudo observar la precipitación de la solución, por tanto se intentó variar algunas condiciones de disolución dentro de las cuales se incluye el pH y el agregado de proteínas

transportadoras con las cuales pueda formar un complejo que sea soluble. En cuanto al pH, se intentó trabajar tanto en medio alcalino como neutro sin encontrar resultados exitosos.

En lo que refiere al uso de proteínas transportadoras, se utilizó HSA con el objetivo de la formación de un complejo entre la proteína y el compuesto con el fin de facilitar su solubilidad, para luego sí lograr su reacción con los blancos en estudio. La metodología, consistió previamente en bloquear el tiol de la HSA utilizando yodoacetamida de forma de alquilarlo y así evitar su reacción con el compuesto. La forma de lograrlo fue la siguiente: se partió de 1 mL de una solución stock de HSA 1.6 mM en agua a la cual se le agregó IAM (preparada en tris 0.6 M, acético 0.3 M) en una concentración final 2 mM. Luego se pasó la solución anterior por una columna HiTrap Desalting, obteniendo así una solución libre de IAM remanente y cuya concentración de HSA fue de 850 μ M. Para la formación del complejo C2-HSA se añadió a la solución anterior el compuesto (5.8 mM diluido en DMSO) en una concentración final de 580 μ M.

Para determinar si se daba la precipitación del complejo y detectar posibles cambios con respecto a la solución de HSA se realizaron espectros de las soluciones en presencia y ausencia de C2; las condiciones se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6 - Concentraciones finales de los componentes de las mezclas para la obtención de espectros en presencia y ausencia de compuesto 2.

[HSA] (μ M)	[NaOH] (mM)	DMSO (%)	C2 (μ M)
640	15	10	-
640	15	10	580

En el espectro obtenido (Figura 31-A) se puede visualizar, para el caso de HSA el espectro característico de una proteína, con su máximo de absorbancia a 280 nm. Al analizar el espectro del complejo vemos que hay cambios principalmente cercanos a los 300 nm con respecto a lo observado para la HSA. A su vez se observa que no se da la precipitación de C2, aspecto que se refleja en la absorbancia nula al comienzo del espectro. Por otro lado, se realizó, el espectro

diferencial (Figura 31-A, interior) en el cual podemos observar que el pico máximo se encuentra alrededor de los 292 nm. Por otro lado, se realizó el espectro del compuesto 2 en presencia de DMSO (Figura 31-B), donde se observa que la absorbancia máxima es a los 285 nm y que confirmando lo anterior, absorbe a 300 nm.

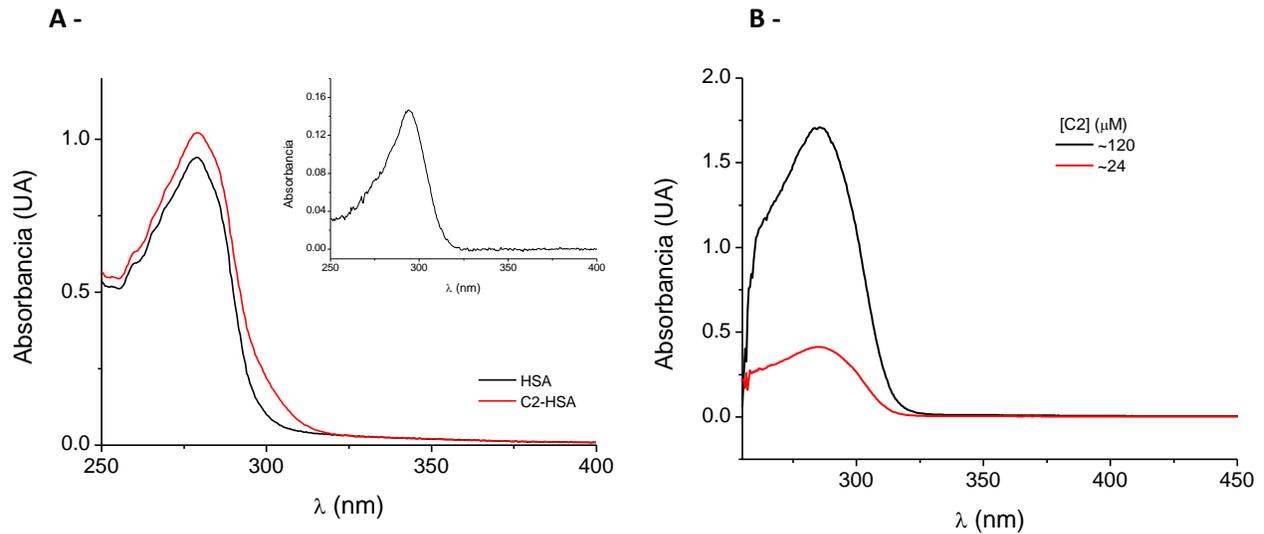


Figura 31 - A - Se presentan los espectros correspondientes a la albúmina (línea negra) y al complejo C2-HSA (línea roja). No se observa la precipitación en la solución donde está presente C2. En el gráfico interior se presenta el espectro diferencial, máximo de absorbancia a 292 nm. **B** - Espectro de C2 en presencia de DMSO para dos concentraciones diferentes. Se puede observar un pico máximo en 285 nm.

Una vez encontradas las condiciones en las cuales no se dio la precipitación del compuesto, se intentó llevar a cabo la reacción de alquilación de TbTXN. Las concentraciones utilizadas en la mezcla de reacción para un volumen final de 100 μL son [TbTXN] = 6.3 μM, [C2] = 0 - 116 μM a pH 7.2 y 25 °C.

Para determinar el valor de la constante de velocidad para la reacción de alquilación de triparredoxina se siguió la misma metodología que para los casos anteriores (ver alquilación de TbTXN por C1). Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente figura:

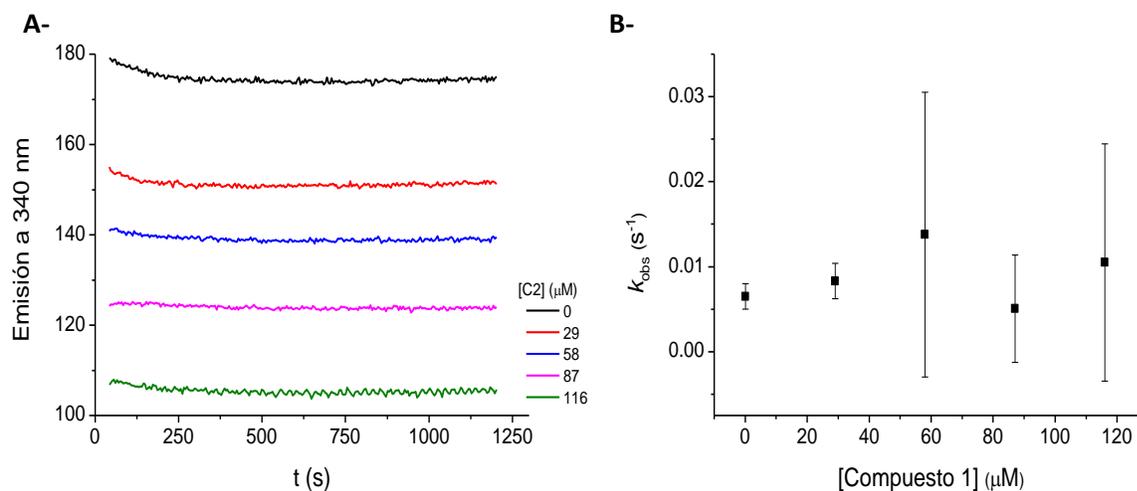


Figura 32 - Ajustes realizados para determinar las constantes de segundo orden de la reacción de alquilación de TXN y HSA. **A** - gráficos de emisión de fluorescencia a 340 nm vs. tiempo. **B** - k_{obs} vs. concentración de compuesto 2.

Si se observan y comparan las corridas para cada concentración de C2 se puede ver que no hay cambios significativos en el tiempo, hecho que se confirma al analizar el gráfico de k_{obs} vs. [C2], en el cual la constante de pseudo primer orden se mantiene constante al aumentar la concentración de compuesto. Otro aspecto a tener en cuenta es que las intensidades de fluorescencia en este ensayo son mayores a las esperadas (ver compuesto 1) que podría atribuirse a la albúmina presente en la muestra.

4.7. Consideraciones finales

Una vez analizados los resultados obtenidos en esta tesina, los describimos en base a los objetivos planteados, teniendo en cuenta los diferentes compartimentos desarrollados al comienzo. Como puede observarse y en base a lo que fue descrito a lo largo del trabajo, no se pudo obtener todas las constantes planteadas (Tabla 7).

Tabla 7 - Constantes de velocidad para las reacciones de alquilación de los distintos blancos, de acuerdo al compartimento donde se encuentran.

		C1		C2	
		k ($M^{-1} s^{-1}$)	pH	k ($M^{-1} s^{-1}$)	pH
Células <i>T. Brucei</i>	T(SH) ₂	-	-	-	-
	GSH	5.3 ± 0.5	8.2	-	-
	TXN	1126 ± 12	7.2	-	-
Células del hospedero	Trx	77.0 ± 0.3	7.2	-	-
	GSH	5.3 ± 0.5	8.2	-	-
Plasma	HSA	6.4 ± 0.4	8.6	-	-

En primer lugar, para el compuesto 2, luego de haber encontrado las condiciones en las cuales es posible su disolución se determinó que no es capaz de reaccionar con el tiol de TXN, al menos en dichas condiciones.

Por otro lado, no se pudo realizar con éxito la síntesis y purificación de tripanotión. Si bien la metodología se ha podido mejorar en cuanto al seguimiento de la reacción, hace falta encontrar un método que sea más específico, es decir, que se pueda seguir directamente la formación de tripanotión. Una de las opciones a tener en cuenta podría ser mediante el uso de tripanotión reductasa; a la vez que ésta reduce al tripanotión se da la simultánea oxidación de NADPH, la cual es posible seguir en el tiempo a través de medidas de absorbancia a 340 nm.

A lo largo de este trabajo se determinó que de todas las reacciones de alquilación estudiadas, la más rápida es la alquilación de triparredoxina por el compuesto 1, al comparar las constantes de velocidad. Si bien, los resultados obtenidos en este trabajo, son desde el punto de vista cinético y nos están indicando las reacciones de alquilación que se dan con más rapidez, hay que tener en cuenta otros aspectos que no se han comentado y que juegan un rol importante en el alcance de los compuestos a su blanco. Por un lado, la permeabilidad de membrana, ya que depende de ella en gran parte el hecho que los compuestos puedan alcanzar los tioles. Por

otro lado, hay que recordar que a diferencia de los tripanosomas, dentro de las células del hospedero existen sistemas como el de las glutatión transferasas (GST), capaces de catalizar la reacción entre glutatión y los compuestos alquilantes. Estas GST podrían actuar detoxificando los compuestos protegiendo así a la tiorredoxina de su alquilación y por ende a las células de mamífero.

Si bien no podemos comparar velocidades de reacción entre los distintos compartimentos por lo antes mencionado, sí podemos realizar una comparación para cada uno de ellos en particular. Para ello debemos tener en cuenta las concentraciones en las que se encuentran los distintos tioles en cada compartimento (Tabla 8) así como su relación con la velocidad de reacción: $v = k [\text{tiol}][C1]$ donde se considera la concentración de C1 muy baja. Hay que tener en cuenta a su vez que a pH fisiológico, las constantes halladas para GSH y HSA serán menores (las consideramos 10 veces menor para el cálculo de las velocidades de reacción). Se resumen en la tabla 8 las velocidades de reacción para cada tiol de los diferentes compartimentos.

En primer lugar, consideramos el interior parasitario, para lo cual tenemos en cuenta dos fases del parásito donde las concentraciones de TXN y GSH han sido reportadas (ver Tabla 8): *procíclica*, que transcurre dentro del insecto vector y *sanguínea*, que toma lugar dentro del hospedero. Calculando la relación entre velocidades de alquilación de TXN y GSH vemos que la velocidad de alquilación de triparredoxina es de aproximadamente 330 y 180 veces mayor para las fases procíclica y sanguínea respectivamente. Este hecho hace que TXN se vea mejor protegido por GSH dentro de la célula de mamífero por su alta concentración. En el plasma, la concentración de HSA es ampliamente mayor que las de Trx y GSH existentes (ver Tabla 8) lo que resulta en que la velocidad de alquilación de HSA es 3300 y 100 veces mayor que para Trx y GSH respectivamente, hecho razonable sabiendo que es el tiol mayoritario en este compartimento. Por último, dentro de la célula del hospedero, de los tioles allí presentes, GSH es el que posee una concentración mayoritaria frente a Trx. En este caso, en presencia de C1, Trx se verá protegida de la alquilación gracias a la alta concentración de glutatión. Si comparamos las velocidades de alquilación de ambos tioles vemos que la correspondiente al GSH es casi cinco veces mayor que para hTrx1.

Tabla 8 - Comparación cinética de blancos de C1

Compartimento	Blanco	Fase del ciclo	[Blanco] (mM)	v (s ⁻¹)
Citosol <i>T. Brucei</i>	TXN	Sanguínea	0.1	0.1126
	GSH	Procíclica	3.4×10^{-5} [45]	0.038
		Sanguínea	1.2	6.36×10^{-4}
		Procíclica	0.22 [21]	1.16×10^{-4}
Citosol mamífero	GSH	-	3 [46]	5.3×10^{-3}
	Trx	-	5×10^{-3} [47]	3.85×10^{-4}
Plasma	HSA	-	0.4	2.56×10^{-4}
	Trx	-	1×10^{-6} [36]	7.7×10^{-8}
	GSH	-	5×10^{-3}	2.65×10^{-6}

Se puede decir, que los hallazgos obtenidos en esta tesina aportan un acercamiento a la posibilidad de que al menos uno de los compuestos estudiados pueda ser utilizado como potencial fármaco para las enfermedades causadas por *T. brucei*.



5. BIBLIOGRAFÍA

1. Lejon, V., M. Bentivoglio, and J.R. Franco, *Human African trypanosomiasis*. Handb Clin Neurol, 2013. **114**: p. 169-81.
2. Brun, R., et al., *Development of novel drugs for human African trypanosomiasis*. Future Microbiol, 2011. **6**(6): p. 677-91.
3. Wery, M., *Drug used in the treatment of sleeping sickness (human African trypanosomiasis: HAT)*. Int J Antimicrob Agents, 1994. **4**(3): p. 227-38.
4. Konig, J., et al., *Antitumor quinol PMX464 is a cytotoxic anti-trypanosomal inhibitor targeting trypanothione metabolism*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 8523-33.
5. Myler, P.J., *Searching the Trityp genomes for drug targets*. Adv Exp Med Biol, 2008. **625**: p. 133-40.
6. Flohe, L., *The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases*. Biotechnol Adv, 2012. **30**(1): p. 294-301.
7. Flohe, L., *The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases*. Int J Med Microbiol, 2012. **302**(4-5): p. 216-20.
8. Koch, O., et al., *Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56788.
9. Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
10. Hanschmann, E.M., et al., *Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(13): p. 1539-605.
11. Imlay, J.A., *Pathways of oxidative damage*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 395-418.
12. Nielsen, J.W., et al., *A fluorescent probe which allows highly specific thiol labeling at low pH*. Anal Biochem, 2012. **421**(1): p. 115-20.
13. Fairlamb, A.H. and A. Cerami, *Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida*. Annu Rev Microbiol, 1992. **46**: p. 695-729.
14. Reckenfelderbaumer, N. and R.L. Krauth-Siegel, *Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of Trypanosoma brucei trypanaredoxin*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17548-55.
15. Fueller, F., et al., *High throughput screening against the peroxidase cascade of African trypanosomes identifies antiparasitic compounds that inactivate trypanaredoxin*. J Biol Chem, 2012. **287**(12): p. 8792-802.
16. Castro, H. and A.M. Tomas, *Peroxidases of trypanosomatids*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(9): p. 1593-606.
17. Wilkinson, S.R., et al., *Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13453-8.
18. D'Silva, C. and S. Daunes, *The therapeutic potential of inhibitors of the trypanothione cycle*. Expert Opin Investig Drugs, 2002. **11**(2): p. 217-31.
19. Nogoceke, E., et al., *A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in Crithidia fasciculata*. Biol Chem, 1997. **378**(8): p. 827-36.
20. Comini, M.A., et al., *Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1289-302.
21. Krauth-Siegel, R.L. and M.A. Comini, *Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1236-48.
22. Comini, M.A., et al., *Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues*. Int J Parasitol, 2009. **39**(10): p. 1059-62.

23. Fyfe, P.K., et al., *Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17672-80.
24. Castro, H., et al., *Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12607.
25. Milman, N., et al., *Mitochondrial origin-binding protein UMSBP mediates DNA replication and segregation in trypanosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19250-5.
26. Diechtierow, M. and R.L. Krauth-Siegel, *A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(4): p. 856-68.
27. Castro, H., et al., *Two linked genes of Leishmania infantum encode tryparedoxins localised to cytosol and mitochondrion*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **136**(2): p. 137-47.
28. Hansen, R.E. and J.R. Winther, *An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations*. Anal Biochem, 2009. **394**(2): p. 147-58.
29. Ferrer-Sueta, G., et al., *Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction*. Chem Res Toxicol, 2011. **24**(4): p. 434-50.
30. Irigoien, F., et al., *Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(6): p. 733-42.
31. Pineyro, M.D., et al., *Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?* Gene, 2008. **408**(1-2): p. 45-50.
32. Trujillo, M., et al., *Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34175-82.
33. Vickers, T.J. and A.H. Fairlamb, *Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27246-56.
34. Fiorillo, A., et al., *The crystal structures of the tryparedoxin-tryparedoxin peroxidase couple unveil the structural determinants of Leishmania detoxification pathway*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(8): p. e1781.
35. Sela, D., N. Yaffe, and J. Shlomai, *Enzymatic mechanism controls redox-mediated protein-DNA interactions at the replication origin of kinetoplast DNA minicircles*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 32034-44.
36. Turell, L., R. Radi, and B. Alvarez, *The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 244-53.
37. Stols, L., et al., *A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site*. Protein Expr Purif, 2002. **25**(1): p. 8-15.
38. Holmgren, A., *Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9627-32.
39. Holmgren, A., *Tryptophan fluorescence study of conformational transitions of the oxidized and reduced form of thioredoxin*. J Biol Chem, 1972. **247**(7): p. 1992-8.
40. Sardi, F., et al., *Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection*. Anal Biochem, 2013. **435**(1): p. 74-82.
41. Espenson, J.H., *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, in *Series in Advanced Chemistry*1995, McGraw-Hill. p. 46-69.
42. Dahl, K.H. and J.S. McKinley-McKee, *The reactivity of affinity labels: A kinetic study of the reaction of alkyl halides with thiolate anions--a model reaction for protein alkylation*. Bioorganic Chemistry, 1981. **10**(3): p. 329-341.

43. Halász, P. and L. Polgár, *Use of Methyl Iodide for Probing the Polarity of the Immediate Environment of—SH Groups in Thiolenzymes*. European Journal of Biochemistry, 1976. **71**(2): p. 563-569.
44. Portillo-Ledesma, S., et al., *Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin-5 Peroxidatic Cysteine*. Biochemistry, 2014.
45. Comini, M.A., R.L. Krauth-Siegel, and L. Flohe, *Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes*. Biochem J, 2007. **402**(1): p. 43-9.
46. Loguercio, C., et al., *Effect of liver cirrhosis and age on the glutathione concentration in the plasma, erythrocytes, and gastric mucosa of man*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(3): p. 483-8.
47. Andersen, J.F., et al., *Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 --> asparagine mutant*. Biochemistry, 1997. **36**(46): p. 13979-88.



Tesina de Grado
Mara Carreño Sastre
Noviembre 2014