

## **Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas – Opción Bioquímica**

PEDECIBA – Biología, Universidad de la República, Uruguay

### **ANÁLISIS FUNCIONAL DE GLUTARREDOXINAS MONOTIÓLICAS DE TRIPANOSOMAS**

**Candidato: MSc. Bruno Manta**

**Orientadores:**

Dr. Marcelo A. Comini (Institut Pasteur de Montevideo)

Dra. R. Luise Krauth-Siegel (Universidad de Heidelberg, Alemania)

**Tribunal:**

Dr. Rafael Radi (Facultad de Medicina, Universidad de la República)

Dr. Alejandro Buschiazzi (Institut Pasteur de Montevideo)

Dr. Gustavo Salinas (Facultad de Química, Universidad de la República)

Defensa oral prevista para el 9 de octubre 2013

## Presentación y créditos

A continuación se presenta la Tesis de Doctorado en Ciencias Biológica - Opción Bioquímica (PEDECIBA – Biología, Universidad de la República) titulada “Análisis funcional de glutarredoxinas monotiólicas de tripanosomas” desarrollada por el aspirante bajo la dirección del Dr. Marcelo A. Comini (Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, Institut Pasteur de Montevideo) y la Dr. R. Luise Krauth-Siegel (Departamento de Bioquímica, Universidad de Heidelberg, Alemania).

Este trabajo de tesis se realizó fundamentalmente en el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas del Institut Pasteur de Montevideo, entre enero de 2009 y diciembre de 2012, con una estadía en el laboratorio de la directora en la Universidad de Heidelberg en el año 2010.

Durante esta etapa contamos con el apoyo esencial de varios grupos y servicios tanto del propio Instituto Pasteur como de la comunidad local e internacional, los cuales hicieron viable el desarrollo y conclusión de este trabajo. Quisiera destacar el aporte de miembros del laboratorio del director de la tesis, como la Dra. Andrea Medeiros (Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina) y la Lic. Luciana Fleitas, miembros de las Unidades Técnicas de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE), Biología Celular (UBC), Proteínas Recombinantes (UPR), Biofísica de Proteínas (UBP), Cristalografía de Proteínas (PXF) y Bioquímica Analítica y Proteómica (UBYPA) del IP-Montevideo y colegas de la comunidad científica local como el Dr. Gerardo Ferrer-Sueta (Facultad de Ciencias, Universidad de la República). Los Dr. Massimo Bellana, Carlo Pavan y Mattia Sturlesse (Universidad de Pádova, Italia) llevaron adelante la resolución de estructuras por resonancia magnética nuclear, proveyendo un aporte invaluable para este trabajo. Finalmente, contamos con el apoyo científico y técnico permanente de la directora de la tesis, Dr. Krauth-Siegel.

Este trabajo de tesis conto el financiamiento de varias instituciones, entre las que destacamos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), tanto a través del programa INNOVA como mediante becas de postgrado y movilidad, PEDECIBA (Programas de apoyo a estudiantes), Institut Pasteur Montevideo (IPM), Institut Pasteur International Network (RIIP), COST-Action CM0801, Universidad de Pádova y programa Bio-NMR de la Unión Europea.

Parte de los resultados obtenidos en el transcurso de esta Tesis fueron publicados en revistas internacionales arbitradas y presentados en congresos nacionales e internacionales, tanto en formato de poster como de presentación oral. En esta versión escrita se priorizó la presentación de material no publicado y, si bien la información contenida en las publicaciones referidas está incluida en este trabajo, todo el material fue reanalizado. Todas las figuras presentadas en este documento (a excepción de la Figura 1.5) fueron producidas especialmente para este trabajo por el autor y ninguna ha sido publicada en su forma actual. En esta versión destinada a la corrección por parte del tribunal las figuras se incluyen en un documento aparte as figuras con sus leyendas correspondientes.

## Índice general

Capítulo 1.	Introducción	Página 1
Capítulo 2.	La familia de las glutarredoxinas en <i>Trypanosoma brucei</i>	Página 35
Capítulo 3.	Propiedades y conservación de las 1-C-Grx1 en tripanosomas	Página 49
Capítulo 4.	Caracterización bioquímica y biofísica de <i>Tb1-C-Grx1</i> y versiones mutantes	Página 61
Capítulo 5.	Estructura de la forma trunca de <i>Tb1-C-Grx1</i> y comparación con otras glutarredoxinas	Página 91
Capítulo 6.	Aproximación al rol biológico de <i>Tb1-C-Grx1</i> y a su función en la forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i>	Página 117
Capítulo 7.	Conclusión general	Página 133
Capítulo 8.	Materiales y Métodos	Página 136
	Referencias	Página 163

## Índice detallado

		<b>Pág.</b>
<b>Capítulo 1</b>	<b>Introducción</b>	1
1.1	Tripanosomas y tripanosomiasis	2
1.1.1	Clasificación de los tripanosomas y relaciones evolutivas	2
1.1.2	Tripanosomas africanos	3
1.1.3	Tripanosomiasis en animales	4
1.1.4	La tripanosomiasis africana en humanos y su tratamiento	5
1.2	Biología celular y metabolismo en <i>Trypanosoma brucei</i>	9
1.2.1	Variación antigénica y proliferación de la forma infectiva para mamíferos	9
1.2.2	Desarrollo en el insecto vector	11
1.2.3	Desarrollo en condiciones de laboratorio	11
1.2.4	Mitocondria y metabolismo energético	12
1.2.5	Adquisición de hierro por la forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i>	13
1.2.6	Biogénesis de centros ferrosulfurados	14
1.3	Metabolismo redox en tripanosomas	16
1.3.1	Sistemas redox dependientes de tioles	16
1.3.2	Particularidades del sistema redox de tripanosomas	17
1.3.3	Biosíntesis de tripanotión	19
1.3.4	Reacciones directa o indirectamente dependientes de tripanotión	19
1.4	Glutarredoxinas	21
1.4.1	Descubrimiento de las glutarredoxinas	21
1.4.2	Diversidad y clasificación de las glutarredoxinas	22
1.4.3	Topología, estructura secundaria y terciaria	24
1.4.4	Estructura cuaternaria	25
1.4.5	Mecanismo catalítico de glutarredoxinas	26
1.4.5.1	Intercambio tiol-disulfuro	26
1.4.5.2	Glutathionilación y otras "tiolaciones"	27
1.4.5.3	Mecanismo enzimático de las glutarredoxinas	28
1.4.6	Glutarredoxinas monotiólicas	31
1.4.6.1	Identificación	31
1.4.6.2	Coordinación de centros ferrosulfurados por glutarredoxinas	32
<b>Capítulo 2</b>	<b>La familia de las glutarredoxinas en <i>Trypanosoma brucei</i></b>	35
2.1	El atlas de proteínas con plegamiento Trx en <i>Trypanosoma brucei</i>	36
2.2	Las "tiorredoxinas" y proteínas relacionadas	40
2.3	Peroxidasas dependientes de tripanotión y proteínas de unión a ADN con	42

	plegamiento Trx	
2.4	El heterogéneo grupo de las glutarredoxinas	42
2.5	Conservación filogenética de glutarredoxinas de tripanosomátidos	45
<b>Capítulo 3</b>	<b>Propiedades y conservación de las 1-C-Grx1 en tripanosomas</b>	<b>49</b>
3.1	Distribución de dominios en la secuencia de 1-C-Grx1 de tripanosomas	50
3.2	Características de la secuencia de localización mitocondrial	51
3.3	Región intrínsecamente desordenada en el extremo aminoterminal de Tb1-C-Grx1	52
3.4	Características de la secuencia del dominio Grx de Tb1-C-Grx1	54
3.5	Conservación de propiedades entre Tb1-C-Grx1 y glutarredoxinas de organismos fotosintéticos	56
3.6	Relación entre Tb1-C-Grx1 y Tb1-C-Grx2	58
3.7	Conclusiones sobre las propiedades de secuencia de la familia 1-C-Grx1 en tripanosomas y su relación con otras glutarredoxinas	59
<b>Capítulo 4</b>	<b>Caracterización bioquímica y biofísica de Tb1-C-Grx1 y versiones mutantes</b>	<b>61</b>
4.1	Producción y purificación de las proteínas recombinantes	62
4.2	Generación del mutante trunco "Δ76"	64
4.3	Caracterización <i>in vitro</i> de Tb1-C-Grx1 FL y Δ76	65
4.4	Caracterización <i>in vitro</i> de la región aminoterminal de Tb1-C-Grx1	68
4.5	Comportamiento de Tb1-C-Grx1 en solución: ¿dimerización mediada por la región NTE?	69
4.6	Oxidación de Tb1CGrx1 y cambios conformacionales asociados	71
4.6.1	Cisteínas externas al sitio activo en glutarredoxinas	71
4.6.2	Evidencia inicial sobre la formación de especies oxidadas de Tb1-C-Grx1 FL y Δ76	72
4.6.3	Oxidación <i>in vitro</i> de Tb1-C-Grx1 por glutatión disulfuro	73
4.6.4	Oxidación <i>in vitro</i> de Tb1-C-Grx1 por peróxido de hidrógeno	75
4.6.5	Integración de los resultados de oxidación en un modelo con base estructural	76
4.7	Determinación del pKa de las cisteínas de Tb1-C-Grx1	78
4.7.1	pKa de cisteínas del sitio activo en glutarredoxinas	78
4.7.2	Nuevo método para la determinación del pKa de cisteínas basado en la sonda monobromobimano	79
4.7.3	El pKa de los residuos de cisteína de Tb1-C-Grx1 sugiere que ambas regiones de la proteína están relacionadas	79
4.8	Coordinación de centros ferrosulfurados	82
4.8.1	Preguntas abiertas en la coordinación de centros ferrosulfurados por Grx de tripanosomas	82
4.8.2	La cisteína del sitio activo es esencial para la coordinación de centros ferrosulfurados	83
4.8.3	La coordinación del centro ferrosulfurado determina un cambio conformacional	85

4.8.4	<i>Tb1-C-Grx1</i> es capaz de ensamblar centros ferrosulfurados a expensas de tripanotión	85
4.8.5	Estequiometría del cluster formado con tripanotión	86
4.8.6	Conclusiones parciales y preguntas pendientes sobre la coordinación de centros ferrosulfurados en Grx de tripanosomas	88
<b>Capítulo 5</b>	<b>Estructura de la forma trunca de <i>Tb1-C-Grx1</i> y comparación con otras glutarredoxinas</b>	91
5.1	Información estructural disponible para glutarredoxinas	92
5.2	Ensayos de cristalogénesis con <i>Tb1-C-Grx1</i> y versiones mutantes	92
5.3	Resolución de la estructura de <i>Tb1-C-Grx1Δ76</i> por resonancia magnética nuclear	94
5.4	Topología y estructura general de <i>Tb1-C-Grx1Δ76</i>	95
5.5	Búsqueda de homólogos estructurales de <i>Tb1-C-Grx1</i>	96
5.6	Oligomerización en solución y dinámica de <i>Tb1-C-Grx1Δ76</i>	99
5.7	Dinámica conformacional del " <i>cis-Pro loop</i> "	100
5.8	Estructura del sitio activo y del <i>loop</i> β1-α2	103
5.9	Extremo carboxilo terminal y entorno de la cisteína 181	107
5.10	Unión de tioles de bajo peso molecular	108
5.10.1	Estructura y conservación del sitio de unión a glutatión en <i>Tb1-C-Grx1Δ76</i>	109
5.10.2	Unión de tioles de bajo peso molecular <i>in vitro</i>	111
5.11	Resultados preliminares sobre la dinámica y conformación de la <i>Tb1-C-Grx1</i> de largo completo en solución	112
5.12	Conclusión: ¿Homología estructural para funciones conservadas?	115
<b>Capítulo 6</b>	<b>Aproximación al rol biológico de <i>Tb1-C-Grx1</i> y a su función en la forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i></b>	117
6.1	Motivación y aproximación experimental	118
6.2	Generación de líneas transgénicas sobrexpresantes de <i>Tb1-C-Grx1</i>	118
6.3	Caracterización de la línea <i>TbC104S</i>	119
6.4	Comparación <i>TbC104S</i> con <i>TbGrx1</i> y <i>TbWT</i>	121
6.5	Caracterización de la línea <i>TbC181S</i> y comparación con las restantes líneas transgénicas y parental	122
6.6	Efecto de la sobreexpresión de las diferentes versiones de <i>Tb1-C-Grx1</i> para la supervivencia del parásito <i>in vivo</i> y el progreso de la infección	123
6.6.1	Estrategias basadas en la infección con cepas monomórficas	123
6.6.2	Modelos <i>in vivo</i> de infección con las líneas transgénicas <i>TbGrx1</i> y <i>TbC104S</i>	125
6.7	Respuesta a estrés oxidativo y depleción de hierro de la línea <i>TbC104S</i>	127
6.8	Localización subcelular de <i>1-C-Grx2</i> y fenotipo de líneas <i>BSF</i> y <i>PCF</i> sobrexpresantes	128
6.9	Integración de la información biológica obtenida para <i>Tb1-C-Grx1</i>	129
<b>Capítulo 7</b>	<b>Conclusión general</b>	133

<b>Capítulo 8</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	136
8.1	Reactivos y fungibles	137
8.2	Generación de construcciones para expresión de proteínas recombinantes	138
8.2.1	Aspectos generales de la generación de construcciones para la expresión de proteínas recombinantes	138
8.2.2	Clonado de <i>Trypanosoma brucei</i> 1-C-Grx1 y generación de vectores de expresión	139
8.2.3	Clonado de <i>Trypanosoma cruzi</i> 1-C-Grx1 y generación de vectores de expresión	141
8.2.4	Vectores de expresión para <i>Trypanosoma brucei</i> 1-C-Grx2	141
8.3	Expresión de proteínas recombinantes	142
8.3.1	Aspectos generales de la expresión de proteínas recombinantes	142
8.3.2	Expresión y purificación de versiones de Tb1-C-Grx1 y Tc1-C-Grx1 sin etiqueta de afinidad	142
8.3.3	Expresión y purificación de versiones de Tb1-C-Grx1 con cola de histidina	144
8.3.4	Expresión y purificación de la proteasa del virus del grabado del tabaco	144
8.3.5	Expresión y purificación de la desulfurasa de cisteína de <i>Escherichia coli</i>	145
8.3.6	Expresión y purificación de versiones de Tb1-C-Grx1 isotópicamente marcadas para NMR	145
8.4	Herramientas computacionales y bioinformáticas	145
8.4.1	Bases de datos	146
8.4.2	Búsqueda, alineamiento de secuencias y visualización	146
8.4.3	Identificación de péptidos de localización subcelular	147
8.4.4	Análisis <i>in silico</i> de propiedades de secuencias de péptidos y proteínas	148
8.4.5	Análisis de modelos estructurales	148
8.4.6	Gráficas, referencias e imágenes	148
8.5	Procedimientos generales de análisis de calidad y conformación de proteínas recombinantes	149
8.5.1	Medidas espectroscópicas	149
8.5.2	Cuantificación de proteínas	150
8.5.3	Reducción, alquilación, oxidación y cuantificación de tioles proteicos	150
8.5.4	Electroforesis en geles de poliacrilamida	151
8.5.5	Cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz	151
8.5.6	Espectrometría de masa	152
8.6	Ensayos de cristalogénesis	153
8.7	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	153
8.8	Reconstitución <i>in vitro</i> de centros ferrosulfurados	154
8.9	Determinación del pKa de cisteínas	155
8.10	Cultivo de parásitos y caracterización de líneas transgénicas	157
8.11	Análisis fenotípico de las formas infectivas de <i>T. brucei</i> sobreexpresantes de diferentes versiones de 1-C-Grx1	158

8.11.1	Cultivo, recuento manual y cosecha	158
8.11.2	Recuento por citometría de flujo	158
8.11.3	Tratamientos sobre células en cultivo	159
8.11.4	Consumo de glucosa	159
8.12	Western blot e inmunofluorescencia	160
8.13	Infección de animales de laboratorio	161

<b>Referencias</b>	163
--------------------	-----

### **Información suplementaria**

## Abreviaturas

A continuación se listan solo algunas abreviaturas usadas en este trabajo, escogidas por su frecuencia o relevancia, excluyéndose las formulas químicas y los acrónimos usados para las diferentes especies (ej. *Tb* para *Trypanosoma brucei*). Es importante destacar que para mantener la coherencia con las figuras, donde generalmente las siglas son más frecuentes que el texto, las abreviaturas se usan en idioma inglés.

1-C-Grx	Glutarredoxina monotiólica
2-C-Grx	Glutarredoxina ditiólica
AAT	Tripanosomiasis animal africana
BSF	Forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i>
CIA	Maquinaria citosólica de ensamblado de centros ferrosulfurados
DTT	Ditioneitol
FeS	Centro ferrosulfurado (genérico)
GPx	Glutación peroxidasa
Grx	Glutarredoxina, genérico
GSH	Glutación reducido
Gsp	Glutationilpermidina reducida
GspS	Glutationilpermidina sintetasa
GspS <sub>2</sub>	Glutationilpermidina oxidada
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación transferasa
HAT	Tripanosomiasis africana en humanos
ISC	Maquinaria mitocondrial/bacteriana de ensamblado de centros ferrosulfurados
LS	Morfología "long slender" del estadio BSF de <i>T. brucei</i>
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NTD	Enfermedades tropicales desatendidas
PCF	Forma procíclica de <i>Trypanosoma brucei</i>
PDI	Isomerasa de disulfuro de proteínas
Px	Peroxidasa, genérico
RSH	Tiol, genérico
RS <sup>·</sup>	Tiolato, genérico
SIF	Factor de inducción de la forma "stumpy"
SNC	Sistema Nervioso Central
SS	Morfología "short stumpy" del estadio BSF de <i>T. brucei</i>
T(SH) <sub>2</sub>	Tripanotión reducido

TAO	Oxidasa alternativa de tripanosomas
Tf	Receptor de transferrina
TGR	Tiorredoxina-glutati3n reductasa
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TryR	Tripanoti3n reductasa
TryS	Tripanoti3n sintetasa
TS <sub>2</sub>	Tripanoti3n oxidado
TXN	Triparredoxina
VSG	Glicoprote3na variable de superficie

# **Capítulo 1**

## **Introducción**

## 1.1. Tripanosomas y tripanosomiasis

### 1.1.1. Clasificación de los tripanosomas y relaciones evolutivas

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoarios unicelulares flagelados con especies de vida libre y parásitos de insectos, plantas y mamíferos (Maslov et al., 2013; Simpson et al., 2006). Varios miembros de esta familia son ampliamente conocidos por ser patógenos de humanos o ganado, produciendo enfermedades de gran impacto en la salud humana y animal (Barrett et al., 2003). Todas las especies de tripanosomátidos pertenecen al orden *Kinetoplastida* el cual, junto a los grupos *Diplonemida* (organismos de aguas profundas) y *Euglenida* (organismos fotosintéticos) forman el filo *Euglenozoa* (Figura 1.1) (Simpson et al., 2006). Los organismos del orden *Kinetoplastida* comparten entre sí características celulares y bioquímicas como ser el mecanismo de expresión de genes en núcleo y mitocondria, la compartimentalización de la vía glucolítica en un organelo especializado (glicosoma) y la organización del ADN mitocondrial en una estructura compacta denominada kinetoplasto, que da nombre al grupo (Vickerman, 1985) Dentro de los kinetoplástidos, el grupo mejor conocido y que nos interesa a los efectos de este trabajo es *Trypanosoma*, que incluye especies monoflageladas heterotróficas, ya sea de vida libre o parasitaria (Simpson et al., 2002, 2006; Stevens et al., 2001). Varios estudios metabólicos y genéticos propusieron que los tripanosomátidos representan uno de los linajes eucariotas más antiguos, relacionado a los euglénidos (Figura 1.1) los cuales evolucionaron a partir de organismos biflagelados de vida libre del grupo “bodonidos” mediante la colonización de insectos hematófagos en una primera instancia y luego de organismos mamíferos (Ahmadinejad et al., 2007; Cavalier-Smith, 2012; Deschamps et al., 2011; Hannaert et al., 2003a; Jackson et al., 2008, 2008; Simpson et al., 2006). El género *Trypanosoma* posee dos linajes de organismos parásitos (*Trypanosoma* y *Leishmania*) que se separaron tempranamente en la evolución (Stevens et al., 1999), lo cual es coincidente con que presentan diferentes estrategias parasitarias, hospederos, vectores y distribución geográfica (Simpson et al., 2006). A su vez, a partir del taxón *Trypanosoma* divergieron dos clados independientes conocidos como “*brucei*” y “*cruzi*”, los cuales, si bien poseen un ancestro en común (grupo monofilético), evolucionaron de manera independiente y en diferentes regiones del planeta (Simpson et al., 2006).

Dentro del clado “*cruzi*” o tripanosomas del “nuevo mundo” (Américas y Oceanía) (Stevens et al., 1999) se encuentra la especie *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas o “tripanosomiasis americana”, endémica en la mayoría de América Central y del Sur (Barrett et al., 2003) y con una fuerte expansión durante la última década en la región centro-sur de Estados Unidos de América (EUA) (Bern and Montgomery, 2009) (Figura 1.2). Desde su descubrimiento en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas se ha avanzado considerablemente en el entendimiento de esta enfermedad, su agente etiológico y los vectores que lo transmiten, más no así en su tratamiento. La enfermedad de Chagas y el parásito *T. cruzi* han sido objeto de estudio en nuestro país desde hace casi 100 años. Esta tradición rindió su fruto y permitió a Uruguay ser el primer país del continente en certificar la interrupción de la

transmisión vectorial de *T. cruzi* por triatomínidos (ej. *Triatoma infestans*, vinchuca) en 1997<sup>1</sup>. Los parásitos del género *Leishmania*, por su parte, infectan una gran variedad de animales y se han reportado más de 20 especies que infectan humanos, distribuidas por todo el planeta a excepción de Australia y la Antártida (Stevens et al., 2001). La leishmaniasis se manifiesta bajo dos formas predominantes conocidas como cutánea o visceral y es considerada una de las enfermedades tropicales desatendidas (NTD, por sus siglas en inglés) con mayor distribución y morbi-mortalidad (Figura 1.2). En virtud de la complejidad y diversidad de tripanosomas patógenos, en las próximas secciones nos centraremos en los tripanosomas “africanos” y particularmente en la subespecie *T. brucei brucei*<sup>2</sup>, la cuál es el objeto de estudio de nuestro trabajo y un excelente modelo para el estudio tanto de procesos infecciosos parasitarios en general, como de mecanismo esenciales de la biología de células eucariotas (Montagnes et al., 2012). Las referencias a otras especies se realizarán cuando sea relevante por fines comparativos.

### 1.1.2. Tripanosomas africanos

Diferentes subespecies del clado “*brucei*”, entre los que se destaca *T. brucei brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*, son agentes etiológicos de enfermedades inhabilitantes y/o fatales en humanos y ganado (Maudlin, 2006). La mayoría de las enfermedades producidas por los tripanosomas africanos fueron reportadas al mundo occidental a finales del siglo XIX por los contingentes médicos y militares que acompañaron la colonización del continente africano por parte de las potencias europeas, si bien existían reportes previos asociados a enfermedades en “esclavos” que hoy sabemos que se trata de síntomas de tripanosomiasis<sup>3</sup>. Durante el siglo XX se describieron decenas de especies, cepas y variedades de tripanosomas africanos (Maudlin, 2006; Steverding, 2008) pero, debido a su similitud morfológica, complejo ciclo de vida (Fèvre et al., 2006; Maudlin, 2006; Stevens et al., 2001) y problemas inherentes a los marcadores usados en las primeras filogenias moleculares (Simpson et al., 2002, 2006), tanto la sistemática como las relaciones evolutivas entre las diferentes especies son aún tema de debate, como sucede -por otro parte- con la mayoría de los organismos del reino *Protozoa* (Adl et al., 2007, 2012; Cavalier-Smith, 2012). En consecuencia, al día de hoy coexisten clasificaciones basadas en marcadores moleculares con otras serotípicas o de origen clínico como ser, por ejemplo, la clasificación de los tripanosomas patógenos en “*estercoraria*” o “*salivaria*” en función de la vía de transmisión del insecto

---

<sup>1</sup> Un excelente resumen de esta tradición científica se recoge en el libro de trabajos del Simposio “A 100 Años del Descubrimiento de la Enfermedad de Chagas: Contribuciones desde Uruguay” editado por las Drs. B. Garat y A. Parodi-Tálice y publicado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en Montevideo en Diciembre de 2009.

<sup>2</sup> El parásito *T. brucei* debe su nombre al médico y microbiólogo escocés Sir David Bruce (1855-1931), reconocido como la persona que identificó al agente causante de la enfermedad de Nagana y su mecanismo de transmisión (Steverding, 2008). Los doctores Aldo Castellani (patólogo italiano, 1878-1971) y Eugène Jamot (médico militar francés, 1879-1937) tuvieron también una participación crucial en la caracterización y tratamiento de la enfermedad y sus causas (Maudlin, 2006; Steverding, 2008, 2010; Welburn and Maudlin, 2012).

<sup>3</sup> Este es el caso de los “botones” de Winterbottom, término usado para describir una manifestación clínica hecha en 1803 por el Dr. Thomas M. Winterbottom (1766-1859) para los casos de linfadenopatía cervical posterior (ver texto) asociado con la tripanosomiasis africana (ver “African Sleeping Sickness” de Wellcome Trust Films (1988), disponible en el canal web de la organización, <http://www.youtube.com/watch?v=GizVxIT8S3w>).

vector (Maslov et al., 2013; Simpson et al., 2006; Stevens et al., 2001). Gracias al avance en las técnicas de secuenciación de genomas completos recientemente ha sido posible comenzar a comprender las relaciones evolutivas entre estos organismos, lo que constituye un importante aporte para entender la epidemiología de las enfermedades que causan y sus posibles tratamiento (Balmer et al., 2011a; Brun et al., 2010; Gibson, 2007; Jensen et al., 2008; Lai et al., 2008; MacGregor et al., 2012; Maslov et al., 2013; Maudlin, 2006; Sharma et al., 2009; Steverding, 2010, 2008).

Brevemente, porque se desarrollará en la próxima sección, los tripanosomas africanos son organismos con ciclo de vida digenético y pleiomórfico que alternan entre un hospedero mamífero y un insecto vector, generalmente moscas de la familia *Glossina spp.*, conocidas popularmente como moscas “tsetsé”. El ciclo de vida *natural* de estos parásitos comienza cuando un insecto infectado inyecta mecánicamente cientos a miles de parásitos al picar al hospedero mamífero para alimentarse (Sharma et al., 2009), los cuales inicialmente proliferan en la dermis o vasos sanguíneos superficiales del hospedero y luego migran e invaden el sistema hematolinfático y, posteriormente, órganos internos (Barrett et al., 2003; Brun et al., 2010). A diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania spp.*, los tripanosomas africanos se mantienen siempre como *parásitos extracelulares* (Matthews, 2005). Si bien la forma infectiva podría replicarse de manera indefinida dentro del hospedero mamífero, no está adaptada a las condiciones de vida dentro del insecto. El ciclo se cierra gracias a que parte de la población proliferante se diferencia a una forma capaz de colonizar el tubo digestivo del insecto al ser ingerida en una nueva picadura, asegurando la transmisibilidad (ver Figura 1.5 más adelante).

### 1.1.3. Tripanosomiasis en animales

El parásito *T. brucei brucei* infecta animales domésticos como ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, camellos y caballos. Tanto este parásito como, *T. congolense* y *T. vivax*, todos pertenecientes al clado “*brucei*” (Stevens et al., 2001), determinan la “enfermedad de Nagana” en animales, mientras que *T. evansi* y *T. equiperdum*<sup>4</sup> son los agentes etiológicos de las enfermedades conocidas como “Surra” y “Dourine”, respectivamente, que afectan fundamentalmente a caballos, camellos y búfalos (Brun et al., 1998; Lun et al., 2010). El conjunto de las enfermedades producidas por estos parásitos es conocida como “tripanosomiasis animal africana” (AAT, por sus siglas en inglés) y es considerada la enfermedad del ganado más importante en el continente africano ya que tiene un efecto directo en la economía de los países de la zona endémica, causando la muerte de cerca de 3 millones de cabezas de ganado por año<sup>5</sup> y

---

<sup>4</sup> Resultados filogenéticos recientes indican que *T. evansi* y *T. equiperdum* serían subespecies de *T. brucei* de origen recientemente y derivadas de la subespecie *T. b. brucei* (Jensen et al., 2008; Lai et al., 2008).

<sup>5</sup> Datos disponibles en el Plan de Acción del “Pan African Tse-Tse and Trypanosomiasis Eradication Campaign” (PATTEC) lanzado por la Organización del África Unida en 2001, disponible en: [http://www.africa-union.org/Structure\\_of\\_the\\_Commission/depPattec.htm#](http://www.africa-union.org/Structure_of_the_Commission/depPattec.htm#)

un efecto indirecto por pérdidas económicas estimadas en 5000 millones de dólares por año<sup>6</sup>. Con la excepción de *T. equiperdum*, que es de transmisión sexual y tiene un ciclo de vida monogenético (Brun et al., 1998), las otras especies son digenéticas y son transmitidas fundamentalmente por moscas de género *Glossina spp.* pero también por otros insectos hematófagos como tábanos (Brun et al., 1998; Desquesnes and Dia, 2003, 2004) o inclusive por mordeduras de murciélagos (Hamilton et al., 2012). Si bien en la zona endémica (“cinturón tsetse”, Figura 1.3) la relevancia de esta vía de transmisión “alternativas” es menor se piensa que las mismas han tenido un importante impacto en la dispersión de la AAT fuera de África (Jensen et al., 2008). Por ejemplo, se han reportado brotes de la enfermedad de Surra (*T. evansi*) tanto en zonas de Europa como de Asia (Gutierrez et al., 2010; Tuntasuvan et al., 2003). A su vez, tanto *T. evansi* como *T. vivax*, fueron introducidos en América Central a mediados del siglo XIX con la importación de ganado a la Guyana Francesa (Dávila and Silva, 2000) y, a pesar de que la mosca tsetse no está presente en el continente americano, estos parásitos se han distribuido ampliamente mediante vectores no tradicionales como tábanos y murciélagos<sup>7</sup>, llegando inclusive a zonas subtropicales como la Pampa Argentina o el sudeste de Brasil, donde la enfermedad es bien conocida entre los criadores de caballos como “mal das cadeiras” (Batista et al., 2007, 2009, 2012; Dávila and Silva, 2000; Rodrigues et al., 2009; Da Silva et al., 2011).

#### 1.1.4. La tripanosomiasis africana en humanos y su tratamiento

La tripanosomiasis africana en humanos (HAT, por sus siglas en inglés)<sup>8</sup> o “enfermedad del sueño” es una de las NTD más distribuidas en el continente africano y es causada por las subespecies *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*, estrechamente emparentadas con *T. b. brucei*. El desarrollo de la enfermedad presenta una fase inicial en la cual el parásito invade y prolifera en el torrente sanguíneo y otra tardía en la cual se da la invasión del sistema nervioso central (SNC) y proliferación en el líquido cefalorraquídeo, acompañada de intensas migrañas, trastornos del sueño y disfunciones mentales, terminando generalmente en la muerte de la persona infectada (Barrett et al., 2003; Brun et al., 2010). La región endémica de esta enfermedad está determinada por la zona donde habita la mosca tsetse (Welburn and Maudlin, 2012) e incluye aproximadamente a 70 millones de personas, distribuidas en 36 países. La región es, además, endémica por otra gran cantidad de enfermedades infecciosas, incluyendo NTD de amplia difusión como las helmintiasis (Figura 1.2). Los principales focos activos se encuentran en zonas rurales extremadamente pobres y de difícil acceso (Brun et al., 2010; Simarro et al., 2012), determinando

---

<sup>6</sup> Datos al 2009 publicados por el “Programme Against African Trypanosomiasis” (PAAT) establecido por la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas (UN) en 1997, disponible en <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/paat/about.html>.

<sup>7</sup> Recientemente Hamilton y colaboradores propusieron que la transmisión por murciélagos ha cumplido un rol central en la evolución y difusión del tripanosoma *T. cruzi* en el continente americano (Hamilton et al., 2012)

<sup>8</sup> Por información actualizada ver sitio web de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [http://www.who.int/trypanosomiasis\\_african/en](http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en), sitio web del Centro para el control de enfermedades de Estados Unidos (CDC) <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness> o sitio web de la iniciativa de Drogas para Enfermedades Desatendidas (DNDi) <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/hat.html>.

que aproximadamente el 10% de la población del África subsahariana viva en zonas de riesgo medio a alto de contraer la infección, las cuales representan el 7.4 % del área total de los países afectados (Simarro et al., 2012). A su vez, la zona endémica cubre 1.5 millones de km<sup>2</sup> de tierra cultivable de gran importancia económica (Matovu et al., 2001; Simarro et al., 2012) (Figura 1.3).

La subespecie *T. b. rhodesiense* es endémica de la zona este y sur de África (Figura 1.3) (Simarro et al., 2012) y las infecciones por este parásito cursan como una enfermedad aguda caracterizada por una alta carga parasitaria, anemia y trombocitopenia severa, acompañadas por la hipertrofia del sistema reticuloendotelial y el hígado. Estos parásitos pueden atravesar la barrera hematoencefálica induciendo así un estado comatoso en un tiempo relativamente corto (semanas a meses) después de la infección (Brun et al., 2010). Si no se trata, la patología evoluciona hacia una pancarditis con falla cardíaca y edema pulmonar, determinando la muerte en poco tiempo (Barrett et al., 2003). *T. b. gambiense*, por su parte, se encuentra concentrado en las regiones este y centro del continente Africano (Simarro et al., 2012) (Figura 1.3) y presenta un período de latencia más largo, con un progreso lento hacia un estado crónico. En la fase precoz de esta enfermedad (fase 1) la manifestación clínica más habitual es un tipo de linfadenopatía mencionada anteriormente como “botones de Winterbottom” (Brun et al., 2010; Kennedy, 2012) (ver nota al pie N°3). En el caso de *T. b. gambiense* la invasión del fluido cerebroespinal (fase 2) puede ocurrir de 3-10 años después de la infección resultando, general pero no universalmente, en la muerte de la persona infectada (Jamonneau et al., 2012).

Mientras que *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* son capaces de infectar humanos, la subespecie *T. b. brucei* es sensible al “factor tripanolítico” (TLF), una actividad tripanocida presente en el plasma humano formada por la apolipoproteína L1, la proteína relacionada a la haptoglobina (HpRP) y lipoproteínas del alta densidad (HDL) (Pays and Vanhollebeke, 2009). La resistencia de *T. b. rhodesiense* al TLF se debe a que este organismo expresa una glicoproteína de superficie denominada SRA (por “serum resistance associated”), ausente en *T. b. brucei* (Fèvre et al., 2006; Pays and Vanhollebeke, 2009). Dado que ambas subespecies son genéticamente idénticas y solo se diferencian en el gen SRA, Balmer y colaboradores (Balmer et al., 2011b) propusieron que *T. b. rhodesiense* es tan solo una variante fenotípica de *T. b. brucei*. Estas propuestas coinciden con la epidemiología de la enfermedad producida por *T. b. rhodesiense*, que se considera una zoonosis con reservorios animales domésticos y salvajes, mientras que no es el caso para *T. b. gambiense*. En consecuencia, la forma infectiva de *T. b. brucei* es un excelente modelo de investigación para la forma más agresiva de HAT producida por *T. b. rhodesiense* (ver a continuación) (Fèvre et al., 2006; Pays and Vanhollebeke, 2009). *T. b. gambiense*, por su parte, puede determinar infecciones crónicas en humanos por lo cual también logra escapar al efecto lítico del TLF y recientemente se identificó que el mecanismo molecular de esta resistencia está al menos parcialmente asociado a una glicoproteína de superficie específica de esta subespecie (Uzureau et al., 2013). Desde el punto de vista epidemiológico, la diferencia en el cuadro clínicos que presentan las infecciones por estas dos subespecies tiene un profundo efecto en su diagnóstico y mortalidad, ya que más del 90% de los casos de HAT reportados y tratados corresponden a *T. b. gambiense*, mientras que las infecciones

zoonóticas por *T. b. rhodesiense*, que son rápidamente letales (80% de las personas infectadas muere dentro de los primeros 6 meses de contraída la infección (Cavalli and Bolognesi, 2009), están marcadamente subdiagnosticadas (Brun et al., 2010; Fèvre et al., 2006; Simarro et al., 2012).

Respecto a los datos epidemiológicos, se considera que en la actualidad existen al menos 300000 personas infectadas y se producen unas 50000 muertes por año como consecuencia de esta enfermedad (Fèvre et al., 2006; Simarro et al., 2012). Si bien no se trata de la NTD más distribuída en el África subsahariana (Figura 1.2), posee un enorme impacto social y económico debido a su efecto en la calidad de vida de las personas infectadas y en el acortamiento significativo de su esperanza de vida (Hotez and Kamath, 2009)<sup>9</sup>. La falta de recursos humanos y económicos combinado con la situación geopolítica de los países más afectados (por ejemplo, la República Democrática del Congo es uno de los países con menor Índice de Desarrollo Humano y concentra el 85% de los nuevos casos, (Maurice, 2013)) complican el control de la enfermedad. Sumado a esto, el único tratamiento disponible hasta el momento es farmacológico y hay pocas perspectivas de poder desarrollar una vacuna en el corto plazo (Bethony et al., 2011). Las drogas actualmente en aplicación para tratar la HAT son solo cinco (Figura 1.4) (Cavalli and Bolognesi, 2009; Jacobs et al., 2011a; Steverding, 2010)<sup>10</sup>. La pentamidina (desarrollada en 1941) y la suramina (1921) solo son eficientes en la etapa aguda (fase 1) de la infección. Son relativamente bien aceptadas por el paciente, con algunos potenciales efectos secundarios (Kennedy, 2012), pero su aplicación solo es útil si el parásito no invadió aún el SNC, lo cual debe determinarse mediante punción lumbar y observación histológica, lo que requiere que el paciente sea diagnosticado en un centro de salud fijo o ambulante (Brun et al., 2010; Cavalli and Bolognesi, 2009; Kennedy, 2012) y, además, la vía de aplicación de ambas drogas es mediante inyecciones intramusculares (pentamidina) o intravenosas (suramina) (Kennedy, 2012). Una vez que el parásito invadió el SNC (fase 2) las drogas que se utilizan son el melarsoprol (1949) y la efluornitina (1990). El primero es un arsenato orgánico altamente tóxico, doloroso para el paciente, que requiere al menos 10 días continuos de inyecciones, condiciones de hospitalización y que mata al 5% de quienes lo reciben (Kennedy, 2012). Sumado a esto, en los últimos años se ha reportado el aislamiento de cepas con resistencia a esta droga (Barrett et al., 2011; Matovu et al., 2001). La efluornitina, por su parte, si bien presenta menor toxicidad requiere casi 60 inyecciones por el lapso de 2 semanas y es solo efectiva contra *T. b. gambiense* (Cavalli and Bolognesi, 2009; Jacobs et al., 2011a; Matovu et al., 2001). Claramente, las drogas actuales distan de ser las ideales ya que fueron desarrolladas hace décadas, mayoritariamente para uso veterinario, no son seguras para el paciente, poseen una eficacia limitada en las etapas finales de la infección y, muy importante, son de difícil administración si se tiene en cuenta las precarias condiciones e infraestructura de los centros de salud existentes en las zona endémicas (Steverding, 2010).

---

<sup>9</sup> El índice DALY (“Disability-adjusted life year”) es la medición más utilizada para calcular el costo de una enfermedad infecciosa sobre una población y se puede entender como el acumulado de años de vida saludables perdidos por la enfermedad, la incapacidad o la muerte prematura. Este valor para HAT asciende a 1.5 millones de años considerando datos de 2009 (Hotez and Kamath, 2009).

<sup>10</sup> Ver (Steverding, 2010) para una revisión sobre la historia de las las drogas para el tratamiento de HAT y su relación con la industria química europea.

Hacia 1960 la HAT se encontraba relativamente controlada (Simarro et al., 2011) pero durante la segunda mitad del siglo XX y luego del retiro de las potencias europeas de la mayoría de los países africanos, el control epidemiológico cesó y la enfermedad se desarrolló a niveles sin precedentes (Simarro et al., 2012; Steverding, 2008). Afortunadamente en las últimas 2 décadas surgieron proyectos esperanzadores ya sea de erradicación del vector (Maudlin, 2006; Welburn and Maudlin, 2012) o universalización del acceso a drogas (Steverding, 2008) que contribuyeron a reducir en un 60% en el número de nuevos casos por año hacia finales de la primera década del siglo XXI (Cavalli and Bolognesi, 2009; Simarro et al., 2011). En general, se trata de iniciativas conjuntas entre instituciones científicas de larga tradición en el estudio de HAT como el “Swiss Tropical and Public Health Institut” (Swiss-TP)<sup>11</sup> o el “London School of Hygiene and Tropical Medicine” (LSHTM)<sup>12</sup>, instituciones médicas sin fines de lucro (como ser DNDi<sup>13</sup> o Médicos Sin Fronteras<sup>14</sup>), organismos internacionales como la OMS y laboratorios farmacéuticos como Sanofi-Aventis o Bayer (Simarro et al., 2011)<sup>15</sup>. En 2007 la OMS autorizó la realización de pruebas clínicas en el terreno con la nueva droga pafuramidina (Cavalli and Bolognesi, 2009) (Figura 1.4), la primera droga de vía oral disponible para el tratamiento de la fase 1 de la enfermedad. Lamentablemente, los tratamientos fueron interrumpidos y la droga retirada luego de un corto período de pruebas por presentar toxicidad hepática (Steverding, 2008)<sup>16</sup>. En 2009 la OMS aprobó el uso de una terapia combinada de efluornitina con nifurtimox (Figura 1.4) una de las dos drogas de referencia para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Barrett et al., 2003; Cavalli and Bolognesi, 2009). El tratamiento combinado (NETC, por sus siglas en inglés) dio excelentes resultados (Priotto et al., 2009; Simarro et al., 2011) y es ahora el tratamiento estándar recomendado para la fase 2 de la infección por *T. b. gambiense* (Kennedy, 2012). Sin embargo, bajo el impulso de las agencias internacionales se han desarrollado decenas de nuevos prototipos (Barrett et al., 2011; Brun et al., 2010; Steverding, 2010) los cuales, de ser aplicables, auguran un futuro muy prometedor para el tratamiento de esta enfermedad (Brun et al., 2011). Entre ellos, es relevante destacar el nitroheterociclo fexinidazol<sup>17</sup> (Torreele et al., 2010) y el compuesto de boro SCYX-7158<sup>18</sup>

---

<sup>11</sup> Swiss Tropical and Public Health Institut, sitio web: <http://www.swisstph.ch>

<sup>12</sup> London School of Hygiene and Tropical Medicine, sitio web: <http://www.lshtm.ac.uk/>

<sup>13</sup> La DNDi posee una plataforma de ensayos clínicos de HAT en la República Democrática del Congo, sitio web: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/hat/clinical-trial-platform.html>

<sup>14</sup> Médicos sin Fronteras (MSF), sitio web: <http://www.msf.org>

<sup>15</sup> Desde 2001 Sanofi-Aventis ha donado a la OMS ~1.5 millones de dosis de melarsoprol (Arsobal®), pentamidina (Pentacarinat®) y eflornithine (Ornidyl®) mientras que Bayer aportó grandes cantidades de suramina (Germanin®) y nifurtimox (Lampit®). Por más información ver <http://www.ifpma.org/global-health/neglected-tropical-diseases.html>.

<sup>16</sup> **Maleato de Pafuramidina** (DB289), información en: <http://www.swisstph.ch/about-us/departments/medicines-research/pharmaceutical-medicine/experience/pafuramidine-maleate-db289.html>

<sup>17</sup> **Fexinidazol**: actualmente en fase II/III, tratamiento a pacientes en el terreno. El desarrollo de esta droga es el fruto de un proyecto de la DNDi comenzado en 2005 en colaboración con el Swiss-TP y los programas nacionales de control de la tripanosomiasis africana de la República Democrática del Congo y la República Centroafricana, con la colaboración de MSF y varias agencias financiadoras de EUA y Europa. El medicamento es co-desarrollado por la compañía farmacéutica francesa Sanofi y DNDi. Por más información ver: <http://www.dndi.org/media-centre/press-releases/1505-new-oral-drug-candidate-hat.html>.

<sup>18</sup> **Oxaborol SCYX-7158**: actualmente en fase I, tratamiento a voluntarios sanos en Paris, Francia. El desarrollo del compuesto fue el resultado de una colaboración entre DNDi, las farmacéuticas estadounidenses Anacor

(Jacobs et al., 2011b) que se encuentran en etapa de evaluación clínica en humanos desde 2012 (Figura 1.4). Sin embargo, la generación de resistencia cruzada entre los nitrocompuestos fexinidazol y nifurtimox ha encendido una señal de alarma sobre la posible aplicación de ambas drogas en el terreno (Sokolova et al., 2010). Sumado a ello, se ha reportado la aparición, cada vez más frecuente, de focos de resistencia a efluornitina en determinadas regiones de Africa (Barrett et al., 2011).

## **1.2. Biología celular y metabolismo en *Trypanosoma brucei***

Como se comentó anteriormente, la infección producida por los tripanosomas africanos puede perdurar durante meses o años dentro del hospedero mamífero, a pesar de que el patógeno habite principalmente el torrente sanguíneo, donde los mamíferos concentran gran parte de su potencial inmunológico. A su vez, la mayoría de los tripanosomas africanos son organismos digenéticos que alternan entre un hospedero mamífero y otro invertebrado, por lo cual las formas adaptadas a la proliferación en un organismo no son viables en el otro y viceversa. Esto determina que los tripanosomas africanos hayan desarrollado un ciclo de vida complejo (Figura 1.5) con notables sistemas de adaptación a las condiciones del hospedero de turno, algunos de los cuales desarrollaremos en esta sección (para revisiones ver (Fenn and Matthews, 2007; Matthews, 2005; Seed and Wenck, 2003; Vickerman, 1985)).

### **1.2.1. Variación antigénica y proliferación de la forma infectiva para mamíferos**

Uno de los principales retos que debe enfrentar *T. brucei* para proliferar en el torrente sanguíneo del hospedero mamífero es el sistema inmunitario. Estos parásitos han desarrollado un sofisticado sistema de evasión basado en variar constantemente el repertorio de antígenos que exponen en su superficie. La superficie celular de estos parásitos está absolutamente cubierta por una proteína conocida como "glicoproteína variable de superficie" (VSG) la cual, con ~15 millones de copias (*T. b. brucei*), representa el ~20% de las proteínas totales del mismo (Vickerman, 1969) (Figura 1.5). En una primera instancia, esta envoltura actúa como un escudo previniendo la acción lítica de componentes de la inmunidad innata (ej. sistema del complemento) pero, dado que son moléculas altamente inmunogénicas, no evita la producción de anticuerpos. Si bien *T. b. brucei* posee unos 1500 genes para VSG (aproximadamente el 10% del genoma (Berriman et al., 2005)<sup>19</sup>, solamente uno (o muy pocos) son expresados cada vez, asegurando que la cobertura celular sea prácticamente homogénea y que la respuesta inmune humoral se desarrolle contra esa variante antigénica de VSG, determinando, en el plazo de algunos días, la muerte de los parásitos inmunogénicos por lisis mediada por anticuerpos (Pays and Vanhollebeke, 2009). Sin

---

Pharmaceuticals y SCYNEXIS dentro de un consorcio que incluye a Pace University (EUA) y el Swiss-TP. Por más información ver: <http://www.dndi.org/media-centre/press-releases/1169-oxa-phasei.html>

<sup>19</sup> Para ser más precisos, el 93% de los genes de VSG son pseudogenes (Berriman et al., 2005) y la variación antigénica implica complicados procesos de recombinación génica que escapan a los objetivos de este trabajo (para una revisión reciente ver (Horn and McCulloch, 2010)).

embargo, la variante antigénica que puebla la superficie está constantemente sometida a recambio. La “variación antigénica” implica procesos epigenéticos de recombinación y silenciamiento que suceden estocásticamente a una frecuencia de una vez cada  $10^3$ - $10^6$  divisiones celulares (MacGregor et al., 2012) y permiten al parásito contar con -potencialmente- millones de variantes de VSG distintas (para revisiones recientes ver (Figueiredo et al., 2009; Horn and McCulloch, 2010)). De esta manera, los anticuerpos contra la versión inicial de VSG no reconocerán los epítopes de la nueva VSG y una nueva población clonal proliferará colonizando al hospedero. Los ciclos periódicos de generación de anticuerpos y variación antigénica dan lugar a los perfiles ondulantes de parasitemia característicos de las infecciones naturales (MacGregor et al., 2012; Pays and Vanhollebeke, 2009)

El segundo proceso que controla la proliferación del parásito dentro del hospedero mamífero es la diferenciación a una forma no proliferativa. Las dimensiones y morfología de los parásitos proliferantes en la sangre del mamífero no son homogéneas y varían marcadamente entre especies (Sharma et al., 2009) o estadios de la infección (Vickerman, 1985), alternando entre formas finas y alargadas, conocidas como “long slender” (LS), y otras más compactas denominadas “short stumpy” (SS), así como estadios intermedios (Fenn and Matthews, 2007; Seed and Wenck, 2003). En ambos casos se trata de formas tripomastigotas, es decir, células alargadas con la salida del bolsillo flagelar en la parte posterior de la célula y con el flagelo proyectándose hacia el extremo anterior adherido al cuerpo celular (Matthews, 2005). La naturaleza pleiomórfica de la forma infectiva de los parásitos africanos fue identificada tempranamente en el siglo XX (Maslov et al., 2013; Maudlin, 2006) así como la demostración de que solo la forma LS es proliferativa y solo la forma SS puede transmitir la infección al insecto. A medida que el número de parásitos en sangre aumenta, un factor soluble derivado del propio tripanosoma denominado “stumpy-inducing factor” (SIF) -de naturaleza aún desconocida- comienza a acumularse (Vassella et al., 1997), determinando cambios morfológicos y metabólicos que llevan a la diferenciación de LS a SS, una forma no proliferativa pero viable para la transmisión al insecto (Figura 1.5). Los cambios más importante que sufre LS son: *i*) la detención del ciclo celular en  $G_1/G_0$  (Vassella et al., 1997), *ii*) la reorganización de una mitocondria funcional (ver más adelante, (Feagin et al., 1986; Tyler et al., 1997)), *iii*) cambios en el perfil de expresión génica y proteómico (Butter et al., 2013; Gunasekera et al., 2012; Kabani et al., 2009; Kolev et al., 2010; Nilsson et al., 2010; Urbaniak et al., 2012), *iv*) aumento en la resistencia a sistema inmune del hospedero sin recurrir a variación antigénica (MacGregor et al., 2012), *v*) activación de la capacidad de muerte celular programada (Welburn et al., 2006) y *vi*) preparación para las condiciones físicas (pH, temperatura) y químicas (proteasas) que se encontrará en el insecto (Nolan et al., 2000). Debido a que el factor desencadenante de la diferenciación responde a un mecanismo de “quorum sensing”, la forma SS se acumula en los picos de parasitemia (Fenn and Matthews, 2007). De esta manera, luego de las olas iniciales de parasitismo mediadas por la proliferación de la forma LS se genera la forma SS, portando diferentes versiones antigénicas y una marcada resistencia al sistema inmunitario, determinado a la vez el carácter crónico de la infección y su transmisibilidad (MacGregor et al., 2012).

### 1.2.2. Desarrollo en el insecto vector

El desarrollo dentro del insecto demora 20-30 días, durante los cuales los tripanosomas que ingresaron por vía digestiva durante la alimentación sufren múltiples cambios que los preparan para poder volver a infectar a un mamífero (Fenn and Matthews, 2007; Sharma et al., 2009). Los parásitos LS ingeridos no son infecciosos para el insecto y serán eliminados, mientras que algunos SS logran invadir el intestino de la mosca (Gibson and Bailey, 2003; Seed and Wenck, 2003). Para establecer la infección estos parásitos deben diferenciarse a la forma de tripomastigota procíclico, lo cual sucede en las primeras horas (Figura 1.5). Uno de los eventos característicos es el recambio de la principal glicoproteína de superficie (VSG) por una envoltura donde predominan proteínas denominadas colectivamente prociclinas, las cuales se caracterizan por poseer un gran número de repeticiones de residuos de glutamato y prolina o 5 a 6 repeticiones del pentapéptido GPEET (Roditi and Clayton, 1999; Sharma et al., 2009). Esta forma es proliferativa, coloniza el intestino y migra en sentido anterior mientras continúa su diferenciación hacia una forma alargada tipo epimastigota, también proliferativa. En la última etapa se da la invasión y colonización del epitelio de las glándulas salivales por esta forma epimastigota y un nuevo cambio de la "cobertura celular" hacia la proteína BARP (*brucei alanine rich protein*) (Figura 1.5). Por último, los parásitos se desprenden del epitelio y se diferencian a tripomastigotas metacíclicos no replicativos, cambiando la proteína de superficie nuevamente a VSG. El repertorio de VSG "metacíclicas" es limitado en comparación al que expresa la forma LS (Gibson and Bailey, 2003; Sharma et al., 2009) pero dado que la población de tripanosomas metacíclicos en la glándula salival es policlonal -lo que implica que cada célula expresa un VSG específico- la diversidad de VSG es suficiente para aumentar las probabilidades de consumir la infección en un hospedero mamífero (MacGregor et al., 2012). Es importante destacar que la forma epimastigota que coloniza las glándulas salivales puede reproducirse sexualmente, determinando que dos o más cepas co-infectantes generen progenies híbridas, con importantes consecuencias en la epidemiología de esta enfermedad ya que en las zonas endémicas las moscas pueden resultar infectadas simultáneamente por más de una subespecie de *T. brucei* (Fenn and Matthews, 2007; Macleod et al., 2007; Sharma et al., 2009; Welburn and Maudlin, 1999).

### 1.2.3. Desarrollo en condiciones de laboratorio

La diferenciación de LS a SS y, posteriormente, a la forma procíclica determina cambios ultraestructurales y metabólicos muy importantes. Las bases moleculares de este proceso comenzaron a elucidarse recién en la década del '70 a raíz del desarrollo de técnicas para el mantenimiento *in vitro* de estos parásitos, primero en co-cultivos con fibroblastos y luego en condiciones axénicas<sup>20</sup>. Las cepas epidémicas fueron generalmente guardadas por institutos de salud especializados nacionales o internacionales (Swiss-TP,

---

<sup>20</sup> El proceso que llevó al desarrollo de técnicas para el cultivo de *T. brucei* y el linaje de la mayoría de las cepas de interés científico se detalla en el sitio web del Dr. Georges Cross (cultivo: [http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2\\_culture\\_commentary.html](http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_culture_commentary.html), pedigrís: [http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2\\_pedigrees.html](http://tryps.rockefeller.edu/trypsru2_pedigrees.html)).

LSHTM, etc.) (Maudlin, 2006) y mantenidos por pasaje en roedores. Con el paso del tiempo, este procedimiento determinó la selección de cepas que perdieron su capacidad de infectar insectos ya que no se diferencian a la forma SS, las cuales se denominan cepas *monomórficas*, (Tyler et al., 1997). En la actualidad, las cepas monomórficas son las más usadas en investigación ya que presentan varias ventajas desde el punto de vista práctico (McCulloch et al., 2004), incluyendo que pueden diferenciarse *in vitro* hacia una forma equivalente a la que infecta el intestino de la mosca (tripanosomas procíclicos), son metabólicamente equivalentes a la forma LS y puede desarrollar variación antigénica (Fenn and Matthews, 2007; Magez and Caljon, 2011). En virtud de ello, en condiciones de laboratorio la forma infectiva recibe el nombre genérico de “forma sanguínea” (BSF, por sus siglas en inglés) mientras que a la forma que infecta el intestino del insecto se la denomina “procíclica” (PCF) y esta es la nomenclatura utilizada en este trabajo.

#### **1.2.4. Mitocondria y metabolismo energético**

Todas las especies de tripanosomátidos poseen características ultraestructurales muy distintivas entre las que destaca el flagelo (sobre el cual no hablaremos en este trabajo, ver (Kohl and Bastin, 2005)), los glicosomas y la mitocondria (Figura 1.6) . Los glicosomas son organelos de membrana simple, evolutivamente relacionados a los peroxisomas, donde se compartimentalizan las enzimas encargadas de la mayor parte de la vía glicolítica y algunas enzimas esenciales en otras rutas metabólicas (gliconeogénesis, vía de las pentosas fosfato, salvataje de purinas, biogénesis de pirimidinas, etc. (Michels et al., 2006)). Esto puede entenderse como una adaptación metabólica del parásito a vivir en el torrente sanguíneo del mamífero donde, a pesar de la presión impuesta por el sistema inmunitario, el acceso a glucosa y otros nutrientes es prácticamente ilimitado (Seed and Wenck, 2003). El metabolismo energético de la BSF depende exclusivamente de la degradación de glucosa a piruvato en la vía glucolítica con la subsecuente producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato (ver a continuación) (Hannaert et al., 2003b).

Los tripanosomas poseen *una única mitocondria* por célula, la cual recorre todo el largo celular y carece de estructura interna (crestas), además de presentar varias características extraordinarias en comparación con otros eucariotas (van Hellemond et al., 2005). Entre ellas destaca el kinetoplasto, que no es otra cosa que el genoma mitocondrial organizado en miles de segmentos de ADN circular concatenados que forman superestructuras conocidas como maxi- y minicírculos, y su maquinaria replicativa (Figura 1.6) (Jensen and Englund, 2012). A su vez, la replicación de la mitocondria está asociada estrechamente al ciclo celular y se realiza de manera coordinada con éste (Schneider, 2001). La expresión del material genético mitocondrial tampoco es convencional, ya que depende de un complejo mecanismo de edición postranscripcional y luego, para su traducción a proteínas, requiere de tRNA importados del citosol, dada su ausencia en el genoma mitocondrial (Jensen and Englund, 2012; Schneider, 2001). Desde el punto de vista metabólico, la característica más llamativa de la mitocondria de

la BSF es que no presenta un ciclo de los ácidos tricarbónicos activo ni enzimas de la cadena respiratoria con citocromos (Bienen et al., 1993) y, por lo tanto, no realiza fosforilación oxidativa (Priest and Hajduk, 1994). La situación opuesta sucede en la forma procíclica, donde la mitocondria está completamente desarrollada, posee una cadena respiratoria completa y es capaz de realizar catabolismo energético, fundamentalmente por degradación de aminoácidos (Priest and Hajduk, 1994). La transición LS a SS involucra (BSF a PCF, en términos generales) requiere, entre otras cosas, la maduración y remodelado estructural y funcional de la mitocondria (Tyler et al., 1997).

A pesar de no realizar fosforilación oxidativa, la mitocondria es esencial para la BSF (Cristodero et al., 2010) ya que varios procesos celulares vitales suceden en ella. El más importante es, sin duda, la respiración. A pesar de la ausencia de citocromos, la mitocondria de la forma sanguínea respira a expensas de una oxidasa terminal conocida como “oxidasa alternativa de tripanosomas” (TAO, por sus siglas en inglés) (Clarkson et al., 1989). TAO está evolutivamente relacionada con las oxidasas alternativas presentes en plantas (Hannaert et al., 2003a) y se localiza en la membrana mitocondrial interna, con su sitio activo mirando hacia la matriz. Se trata de una enzima dependiente de hierro que cataliza la reducción de oxígeno molecular ( $O_2$ ) a expensas de electrones del ubiquinol, rindiendo ubiquinona y agua (Figura 1.6). La TAO tiene un rol esencial en el balance energético de la BSF ya que la ubiquinona es reducida nuevamente a expensas de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa presente en el espacio intermembrana, en un proceso que consume glicerol-3-fosfato y NADH, lo que es esencial para mantener activa la vía glucolítica en ausencia de ciclo de Krebs (Helfert et al., 2001)<sup>21</sup>. Sumado a esto, otros procesos metabólicos esenciales tienen lugar en esta mitocondria, como la síntesis de un precursor de la timidina (Roldán et al., 2011) y la biogénesis de centros ferrosulfurados (Manta et al., 2012), que comentaremos a continuación.

### **1.2.5. Adquisición de hierro por la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei***

El hierro es un elemento indispensable para todos los organismos vivos debido a su función estructural o funcional en varias enzimas metabólicas esenciales. *T. brucei* no es la excepción ya que varios procesos esenciales dependen de hierro (revisado en (Manta et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010) como la respiración por TAO recién mencionada, la biosíntesis de nucleótidos por la ribonucleótido reductasa (Dormeyer et al., 2001) o varias proteínas centrales en las defensas antioxidantes como las superóxido dismutasas dependientes de hierro (Dufernez et al., 2006; Wilkinson et al., 2006). A su vez, la disponibilidad de este metal a nivel sistémico cumple un rol crítico durante el proceso de infección, ya que el hospedero restringe el acceso al mismo por parte del patógeno para de esta forma controlar su proliferación (Sutak et al., 2008; Taylor and Kelly, 2010).

---

<sup>21</sup> Es interesante destacar que no hay genes homólogos para TAO en *T. cruzi* y *Leishmania spp.* (Chaudhuri et al., 2006).

Por su condición de parásito extracelular, *T. brucei* está obligado a adquirir el hierro del torrente sanguíneo del hospedero, el cual es transportado como hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) unido a la proteína plasmática transferrina (Tf) (Figura 1.7). El secuestro de la Tf plasmática requiere un receptor de membrana específico compuesto por un complejo heterodimérico de variantes de las VSG conocidas como *ESAG6* (una versión trunca de VSG carente del dominio C-terminal) y *ESAG7* (carente del anclaje GPI a membrana) expresadas desde la misma región telomérica donde se da la expresión de VSG (Salmon et al., 1994; Steverding et al., 1995). El receptor de transferrina (TfR), formado por el producto de ambos genes *ESAG6* y *ESAG7* se localiza en el bolsillo flagelar, el único sitio donde se da la endocitosis en estos tripanosomas (Grab et al., 1993). La unión de Tf al receptor determina su endocitosis y, una vez en la vía endocítica, se da la acidificación del endosoma y liberación del hierro unido (Grab et al., 1992). A diferencia de lo que sucede en mamíferos (Hentze et al., 2010), la Tf “descargada” no es reciclada a la membrana junto con el receptor sino que es proteolizada probablemente por acción de la catepsina L (Steverding et al., 2012), liberando el hierro en el interior del endosoma. La forma en que el hierro liberado de la Tf accede al citosol aún no está resuelta pero, análogamente a otros eucariotas, se supone la acción concertadamente de ferrireductasas y transportadores de cationes divalentes presentes en la membrana lisosomal (Taylor and Kelly, 2010). Sin embargo, recientemente Taylor *et al.* (Taylor et al., 2013) reportaron que el transporte del metal a través de la membrana endolisomas depende de una proteína relacionada a mucolipinas (MLP1) y no de transportadores como DTM1 o relativos, ausente en el genoma de este organismo. En *T. brucei* la expresión de TfR está regulada por la disponibilidad de hierro (Fast et al., 1999) y sometida a un proceso de hipervariación similar al de las VSG (Gerrits et al., 2002), a pesar de que el mecanismo es aún desconocido ya que estos parásito no poseen elementos de control postranscripcional convencionales y sensibles a los niveles de hierro como sucede en levaduras (Ehrensberger and Bird, 2011) o mamíferos (Hentze et al., 2010). La disminución del hierro disponible, ya sea como una respuesta sistémica del organismo, por el efecto de quelantes, anticuerpos específicos o cambio en el tipo de Tf (por ejemplo, cambio en la especie de mamífero parasitada) determina no solo la sobreexpresión de TfR sino también, generalmente, la expresión de una nueva versión del receptor (Ansorge et al., 1999) que le permitirá evadir la respuesta inmunitaria y/o aumentar la afinidad de TfR por Tf, en un escenario de competencia con el hospedero por un recurso limitado (Taylor and Kelly, 2010)<sup>22</sup>.

### 1.2.6. Biogénesis de centros ferrosulfurados

En células eucariotas la mayoría del hierro adquirido es derivado hacia la mitocondria donde tiene lugar la biogénesis de grupos hemo y de centros ferrosulfurados (FeS). Los FeS son cofactores formados por

---

<sup>22</sup> El/los mecanismo(s) de incorporación de hierro en los tripanosomas intracelulares (*T. cruzi*, *Leishmania spp.*) son aun menos conocidos. En el caso de *T. cruzi* en particular la disponibilidad de hierro no sería un problema al infectar macrófagos ya que estos son los principales movilizados de hierro a través de la eritrofagocitosis (revisado en (Bruno Manta et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010)).

átomos de hierro y azufre inorgánico siendo los centros binucleares [2Fe-2S] los más sencillos y abundantes, mientras que los de mayor complejidad se originan a partir de un proceso de maduración (Lill et al., 2012; Wang and Pantopoulos, 2011) (Figura 1.8) Generalmente actúan como cofactores de proteínas que los unen a expensas de la cadena lateral de residuos de cisteína, histidina o aspartato (Beinert et al., 1997). En eucariotas se han reportado ~100 proteínas dependientes de FeS y la mayoría son componentes esenciales de cadenas de transporte de electrones debido a la capacidad de los átomos de hierro de alternar entre estados de oxidación ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (para revisiones recientes ver (Balk and Pilon, 2011; Lill and Mühlenhoff, 2008; Roche et al., 2013; Xu and Møller, 2008; Ye and Rouault, 2010)). A pesar de la simplicidad química de estos cofactores, su biosíntesis e inserción en apoproteínas requiere una maquinaria especializada, evolutivamente muy antigua y conservada desde bacterias a humanos. En bacterias, existen tres sistemas de biogénesis de FeS, todos codificados en operones específicos y fuertemente regulados. El sistema de “fijación de nitrógeno” (NIF, por sus siglas en inglés) fue la primera maquinaria descrita y está exclusivamente presente en ciertos grupos de bacterias simbiotas donde cumple funciones en la maduración de la enzima nitrogenasa, dependiente de FeS y molibdeno<sup>23</sup>. Los otros dos sistemas, denominados ISC (por “iron-sulfur cluster”) y SUF (por “sulfur utilization factor”) están ampliamente distribuidos en bacterias y son los responsables de la síntesis de FeS en condiciones basales y de estrés, respectivamente (Roche et al., 2013). La mitocondria y plástidos heredaron los sistemas ISC y SUF, respectivamente, de sus endosimbiontes primitivos. Adicionalmente, en eucariotas la maduración de FeS también puede darse en el citosol a expensas de una maquinaria específica denominada CIA (“cytosolic iron-sulfur cluster assembly” (Sharma et al., 2010)). Si bien se trata de sistemas independientes en términos general los cuatro funcionan de manera homóloga en base a la acción coordinada de cuatro procesos: *i*) generación de sulfuro a expensas de tioles, *ii*) abastecimiento de  $\text{Fe}^{2+}$  y *iii*) ensamblado de un centro Fe-S inicial sobre una proteína soporte y *iv*) transferencia del FeS a la proteína aceptora final, si bien el sistema CIA no es completamente autónomo y requiere necesariamente a la maquinaria mitocondrial para ser funcional (Lill et al., 2012) (Figura 1.9).

La maquinaria mitocondrial, estrechamente relacionada al sistema bacteriano ISC, es la única esencial en eucariotas (Xu and Møller, 2008) y se esquematiza muy resumidamente en la Figura 1.9. El sulfuro ( $\text{S}^{2-}$ ) es generado a partir de cisteína por la acción de la enzima dependiente de piridoxal-5'-fosfato llamada desulfurasa de cisteína (EC 2.8.1.7, Nsf1 en *S. cerevisiae*)<sup>24</sup>. La reacción produce alanina y un intermediario persulfuro sobre una cisteína conservada del sitio activo de la enzima, el cual es reducido a expensas del sistema ferredoxina-ferredoxina reductasa dependiente de NADPH. La activación de Nsf1 depende de la formación de un complejo proteico con una proteína pequeña y muy conservada llamada Lsd11

<sup>23</sup> El protozooario *Entamoeba histolitica* parece ser la excepción ya que en su mitocondria rudimentaria posee proteínas equivalentes a la maquinaria SUF (Mi-ichi et al., 2009).

<sup>24</sup> La mayoría de los estudios sobre la biogénesis de centros ferrosulfurados en eucariotas han sido desarrollados en levaduras y, en consecuencia, la nomenclatura de las proteínas involucradas sigue ese criterio. En este trabajo utilizaremos los nombres asignados a levaduras y, cuando sea necesario, se hará referencia a la nomenclatura correspondiente en mamíferos o bacterias.

(Wiedemann et al., 2006). La forma en la cual el hierro liberado de la vía endosomal accede a la mitocondria no está definida (Richardson et al., 2010), ni tampoco como es incorporado en la vía de biogénesis de FeS, si bien es un hecho que la proteína Yfh1 (frataxina en mamíferos) cumple un rol en ello. El último requerimiento son proteínas en condiciones de recibir el FeS mientras se forma para luego transferirlo a sus aceptores finales. En ello participan proteínas soporte (“scaffold”) del tipo U (Isu1/2 en levaduras) o A (IscA en levaduras) así como chaperonas de la familia de las HSP70 (Ssq1 en levaduras) o Dna-J (Jac1 en levaduras), el factor de intercambio de nucleótidos Mge1 y, como veremos más adelante, proteínas de la familia de las glutarredoxinas.

El estudio sobre la biogénesis de FeS en tripanosomas fue impulsado por la secuenciación de los genomas de tres especies representativas (*T. brucei* (Berriman et al., 2005) *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005) y *L. major* (Ivens et al., 2005)). En base a comparación de secuencias fue posible identificar varios de los componentes de esta vía en tripanosomas (revisado en (Manta et al., 2012), algunos de los cuales han sido caracterizados funcionalmente en *T. brucei*, como la desulfurasa de cisteína (Iscs2, (Smíd et al., 2006)) y su proteína accesoria lsd11 (Paris et al., 2010), proteínas scaffold tipo U (IscU, (Smíd et al., 2006)) y tipo A (Isa1/2 (Long et al., 2011)), la frataxina (Long et al., 2008a, 2008b), dos isoformas de ferredoxina (Changmai et al., 2013) y la glutarredoxina monotiólica 1 (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008; Manta et al., 2013a). Como se comentará en el Capítulo final, dado el alto grado de conservación de las proteínas que participan en esta vía es posible identificar con cierto grado de certeza a algunos de los actores restantes.

### **1.3. Metabolismo redox en tripanosomas**

#### **1.3.1. Sistemas redox dependientes de tioles**

Una de las adaptaciones metabólicas más estudiada de los tripanosomas es su metabolismo redox, es decir, los sistemas enzimáticos y no enzimáticos que utilizan para mantener un entorno intracelular reductor a pesar de la constante generación -endógena o exógena- de moléculas oxidantes. En la mayoría de los organismos parte del poder reductor generado durante la respiración o el catabolismo es consumido por “mecanismos antioxidantes”, los cuales funcionan como sistemas acoplados donde los electrones provenientes del NADH o NADPH se canalizan específicamente hacia enzimas efectoras especializadas en dar cuenta de estos “oxidantes”. Generalmente, en estos sistemas multienzimáticos juega un rol esencial ciertas moléculas pequeñas y difusibles que contienen tioles capaces de alternar entre formas oxidadas y reducidas. En eucariotas y bacterias gram-negativas, esta función es generalmente asumida por el tripéptido glutatión (gamma-glutamilcisteinglicina), capaz de existir tanto en su forma reducida (GSH), con el grupo tiol (RSH) de la cisteína libre o su forma oxidada (GSSG, glutatión disulfuro), donde dos moléculas de GSH están covalentemente unidas a través de un enlace disulfuro entre sus residuos de cisteínas (Figura 1.10). Si bien el GSH puede reaccionar con oxidantes o

blancos celulares *per se*, su función biológica depende de la existencia de enzimas que catalizan su utilización por sistemas antioxidantes o regulatorios con la *cinética* adecuada y en el *compartimento* adecuado (Deponte, 2013; Flohé, 2012a). El “sistema GSH” involucra glutatión peroxidasas (GPx, EC 1.11.1.9), las cuales reducen hidroperóxidos y otros oxidantes a expensas de GSH, glutatión reductasa (GR, EC 1.8.1.7), que reduce la forma oxidada de GSH a expensas de NADPH y proteínas de la familia de las glutarredoxinas (Grx, ver más adelante) o transferasas (glioxalidas, glutatión transferasas, etc.) que catalizan reacciones a expensas de GSH (Deponte, 2013) (Figura 1.11). En la mayoría de los eucariotas coexiste otro sistema redox en paralelo cuyo “brazo efector” es la enzima tiorredoxina (Trx, EC 1.8.1.8), una proteína globular pequeña y muy conservada que posee un sitio activo que puede alternar entre una forma reducida con tioles libres y una forma oxidada a disulfuro (ver más adelante). La Trx oxidada es reducida a expensas de NADPH por la tiorredoxina reductasa (TrxR, EC 1.8.1.9). Los blancos celulares de la Trx son varios e incluyen enzimas de la primera línea de defensa antioxidante, factores de transcripción, proteínas traductoras de señales, etc. (para una revisión reciente ver (Lee et al., 2012)). Si bien ambos sistemas dependen del poder reductor celular generalmente operan como dos “cables redox” independientes alimentando diferentes “terminales” (Figura 1.11), a excepción de la acción de la enzima tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) (Su et al., 2005; Williams et al., 2012), donde se conectan ambos sistemas, o en organismos que presentan versiones “condensadas”, como es el caso de los tripanosomas (ver a continuación).

### 1.3.2. Particularidades del sistema redox de tripanosomas

Una de las características bioquímicas que distingue a los tripanosomátidos es que su sistema redox no depende de GSH *directamente* sino del tripanotión ( $N^1, N^6$ -bisglutathionilperimidina,  $T(SH)_2$ ) un producto de conjugación entre GSH y la poliamina espermidina (Fairlamb et al., 1985, 1986; Krauth-Siegel et al., 2007) (Figura 1.10). Las formas conjugadas de GSH son frecuentes en eucariotas (Wang and Ballatori, 1998) pero la combinación entre GSH y poliaminas es exclusiva de enterobacterias (Chiang et al., 2010; Tabor and Tabor, 1970) y kinetoplastidos<sup>25</sup>. La elucidación del sistema redox dependiente de tioles presente en tripanosomas comenzó en la década de 1970 en Argentina (Boveris et al., 1980) y tomó casi dos décadas, ya que la actividad de las proteínas más representativas de los sistemas redox eucariotas recién mencionadas (ej.: TrxR, GR, GPx, etc.) no fue inmediatamente identificada en estos organismos (Flohé, 2012b; Comini and Flohé, 2012). Al día de hoy sabemos que el sistema redox *mínimo* de

---

<sup>25</sup> Se ha reportado la presencia de  $T(SH)_2$  en los protozoarios *Entamoeba histolytica* (Ondarza et al., 1997, 1999, 2005) y *Naegleria fowleri* (perteneciente al mismo género que *N. gruberi*, Figura 1.1, (Ondarza et al., 2006)). Sin embargo, estos estudios fueron luego refutados por Ariyanayagam y Fairlamb (Ariyanayagam and Fairlamb, 1999) quienes reportaron la ausencia de tripanotión y actividad TryR, e incluso glutatión reductasa, en *E. histolytica*. Por otro lado, nuestra búsqueda de secuencias ortólogas a GspS, TryS o TryR en la base de datos del genoma de *E. histolytica* resultó infructuosa, pero también esperable, ya que estos organismos están solo lejanamente emparentados a los kinetoplastidos (Manta et al., 2013b) (Figura 1.1).

tripanosomas está compuestopor el tripanotión<sup>26</sup>, una flavoenzima dependiente de NADPH específica para la reducción de la forma oxidada de tripanotión (TS<sub>2</sub>) llamada tripanotión reductasa (TryR, EC 1.8.1.12) (Krauth-Siegel et al., 1987), una enzima similar a la Trx denominada triparredoxina (TXN), que cataliza la transferencia de electrones desde el T(SH)<sub>2</sub> hacia los blancos moleculares (Nogoceke et al., 1997), una tiorredoxina auténtica de función desconocida (Reckenfelderbäumer et al., 2000) y enzimas de la familia de las Grx específicas para T(SH)<sub>2</sub> (Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Filser et al., 2008) (Figura 1.11). A su vez, los resultados provenientes de la secuenciación de los genomas de varias especies confirmó la ausencia de genes que codifiquen para TrxR, GR o GPx dependientes de selenio (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005). El sistema dependiente de tripanotión puede entenderse como una versión condensada de los sistemas “GSH” y “Trx” presentes en otros eucariotas, donde se combina el poder reductor de un ditiol de bajo peso molecular y difusible, con la acción de oxidorreductasas polifuncionales como las TXN y Grx que canalizan los electrones hacia distintos blancos biológicos (Figura 1.11) (Manta et al., 2013b).

La singularidad del metabolismo redox de los tripanosomas y su dependencia de T(SH)<sub>2</sub> y no de GSH, como ocurre en otros parásitos humanos (Krauth-Siegel and Leroux, 2012), fue tempranamente identificada como un posible talón de Aquiles (Flohé et al., 1999) y cobró relevancia al identificarse que varias enzimas encargadas de su biosíntesis o utilización no tienen homólogos cercanos en el hospedero mamífero y/o son esenciales para la supervivencia o infectividad de estos organismos (Comini et al., 2005, 2004, 2008; Dormeyer et al., 2001; Krieger et al., 2000; Piacenza et al., 2012; Piñeyro et al., 2008; Torrie et al., 2009; Wilkinson et al., 2003; Wyllie et al., 2008). En consecuencia, en la última década se ha publicado una abrumadora cantidad de trabajos y revisiones sobre las características básicas del sistema dependiente de tripanotión y su potencial como blanco farmacológico (para revisiones ver (Fairlamb and Cerami, 1992; Flohé, 2012b; Irigoín et al., 2008; Jaeger and Flohé, 2006; Krauth-Siegel and Comini, 2008; Krauth-Siegel and Leroux, 2012; Krauth-Siegel et al., 2003, 2005; Manta et al., 2013b; Comini and Flohé, 2012; Müller et al., 2003). Por lo tanto, en la próxima sección nos referiremos exclusivamente a tres aspectos relevantes para el desarrollo de este trabajo: *i*) su biosíntesis, *ii*) el rol del T(SH)<sub>2</sub> en reacciones no catalizadas y *iii*) las funciones del T(SH)<sub>2</sub> mediada por las proteínas efectoras.

Si bien el T(SH)<sub>2</sub> es el tiol más abundante en la mayoría de los tripanosomas, no es el único y es importante destacar dos aspectos adicionales. Primero, en algunos tripanosomas, la concentración intracelular estimada de GSH y Gsp es similar a la de T(SH)<sub>2</sub> (Krauth-Siegel and Comini, 2008; Krauth-Siegel and Leroux, 2012), lo que debe ser tenido en cuenta al considerar algunas reacciones donde existen diferencias entre mono- y ditiolos (ej. glutationilación, ver más adelante). Sumado a ello, si bien se conocen sistemas redox dependientes de T(SH)<sub>2</sub> compartimentalizados en la mitocondria de estos parásitos (Tomás and Castro, 2012), la localización de este tiol en ese compartimento no ha sido

---

<sup>26</sup> A lo largo de todo el trabajo usaremos el término “trippanotión” para referirnos indistintamente a la forma oxidada o reducida. Cuando sea necesario, se hará la excepción indicando a la forma reducida como dihidrotrippanotión, T(SH)<sub>2</sub>, y a la forma oxidada como tripanotión disulfuro, TS<sub>2</sub>.

demostrada, ni tampoco la existencia de una síntesis local específica de T(SH)<sub>2</sub>, aunque no pueden descartarse sistemas de transporte equivalentes a los existentes para el GSH (Lash, 2006), aún no estudiados en tripanosomas (Manta et al., 2013b).

### 1.3.3. Biosíntesis de tripanotión

El tripanotión es el producto de la unión covalente de una molécula de espermidina (Sp) y dos moléculas de glutatión y se forma por dos reacciones dependientes de ATP y catalizadas por enzimas específicas y exclusivas de los kinetoplastidos (Manta et al., 2013b) (Figura 1.12). La primera reacción de conjugación determina la formación de monoglutationilespermidina (Gsp) y la segunda rinde T(SH)<sub>2</sub>. Ambas reacciones pueden ser catalizadas por la tripanotión sintetasa (TryS, EC 6.3.1.9), como sucede en los tripanosomas africanos, o en dos etapas que involucran la acción subsecuente de la Gsp sintetasa (GspS, EC 6.3.1.8) primero y la TryS después, como es el caso del tripanosomátido patógeno de insectos *Crihthidia fasciculata* (Comini et al., 2005; Comini and Flohé, 2012)<sup>27</sup> (Figura 1.12).

### 1.3.4. Reacciones directa o indirectamente dependientes de tripanotión

Por su característica de ditiol, ambos grupos RSH se mantienen siempre covalentemente conectados y cercanos en el espacio, determinando que el tripanotión sea más eficiente que los monotioles GSH o Gsp en reacciones no catalizadas que determina la formación de TS<sub>2</sub>, como por ejemplo la reducción de GSSG (Steenkamp, 2002), lo que puede tener una importante función fisiológicas en tripanosomas ya que los mismos no poseen GR (Krauth-Siegel et al., 2003). A su vez, el T(SH)<sub>2</sub> es capaz de reducir directamente ascorbato (Krauth-Siegel and Lüdemann, 1996), peróxido de hidrógeno (Ariyanayagam and Fairlamb, 2001) o peroxinitrito (Trujillo et al., 2004) con constantes de reacción de primer orden que superan a la de GSH (Thomson et al., 2003). La estructura química de esta molécula determina que el pKa promedio de ambos tioles sea ~7.4 (Moutiez et al., 1994), al menos 1 unidad menor que el pKa del GSH (pKa ~ 9) determinando una mayor abundancia relativa de la especie reactiva (tiolato, RS<sup>-</sup>) de T(SH)<sub>2</sub> a pH fisiológico en comparación con este último. Ambas características favorecen su reacción con oxidantes, especies radicalares y con metales de transición en condiciones fisiológicas (Bocedi et al., 2010; Manta et al., 2013b).

Sin embargo, al igual que en el sistema GSH, el potencial metabólico de este tiol depende fundamentalmente de su uso en vías catalizadas por enzimas que canalizan el flujo de equivalentes de

---

<sup>27</sup> Es interesante destacar que las enzimas involucradas en la biosíntesis de este tiol (sean GspS y TryS) así como la reductasa específica (TryR) están ausentes en eucariotas no relacionados pero fueron identificadas en *E. gracilis* y *B. saltans* (Jackson et al., 2008; Montrichard et al., 1999)(Dr. M.W.Grey, Dalhousie University, Canadá, comunicación personal) en concordancia con la estrecha relación evolutiva entre estos organismos (Manta et al., 2013b) (Figura 1.1).

reducción desde el T(SH)<sub>2</sub> hacia blancos celulares específicos, como ser la detoxificación de xenobióticos o la reducción de oxidantes (Figura 1.13). En eucariotas, la detoxificación de xenobióticos se clasifica en tres fases, una de las cuales incluye la conjugación de GSH a los electrófilos catalizada por enzimas de la familia de las glutatión-S-transferasas (GST) (Deponte, 2013). En la actualidad se considera que estas proteínas están ausentes en tripanosomas, aunque se han identificado al menos dos familias de proteínas no relacionadas que pueden cumplir funciones de “transferasas de tripanotión” (eEF1B (Vickers and Fairlamb, 2004; Vickers et al., 2004) y TDR1 (Denton et al., 2004; Fyfe et al., 2012)) si bien su rol en la resistencia a drogas o xenobióticos no es concluyente (revisado en (Manta et al., 2013b)). Respecto a las defensas antioxidantes, los tripanosomátidos codifican para tres tipos de oxidorreductasas dependientes de tripanotión las cuales comparten una estructura general “tipo Trx” (ver más adelante) y un sitio activo con la secuencia CxxC/S ubicado en una posición muy conservada (Friemann et al., 2003; Hofmann et al., 2001; Manta et al., 2013a). Las tres familias son las tiorredoxinas propiamente dichas (Trx), glutarredoxinas (Grx) y triparredoxinas (TXN), siendo estas últimas las únicas exclusivas de tripanosomátidos y por las cuales vamos a comenzar la descripción.

Las triparredoxinas han sido identificadas en todas las especies de tripanosomátidos (Castro et al., 2004; Levick et al., 1998; Lopez et al., 2000; Lüdemann et al., 1998; Montemartini et al., 1998; Nogoceke et al., 1997; Romao et al., 2009; Wilkinson et al., 2002) y otras especies evolutivamente relacionadas como *E. gracilis* y *B. saltans* (Manta et al., 2013b) mas no en otros organismos. La mayoría de los tripanosomátidos expresan generalmente una isoforma citosólica y otra mitocondrial, si bien la localización precisa de esta última dentro del organelo es aún motivo de estudio (Arias et al., 2013; Castro et al., 2004, 2008, 2010; Romao et al., 2009; Tomás and Castro, 2012). Centrándonos en los parásitos africanos, la TXN citosólica es una de las proteínas más abundante en este compartimento (Comini et al., 2005; Nogoceke et al., 1997) y participa en procesos celulares como ser: *i*) reducción de la ribonucleótido reductasa, esencial para la síntesis de desoxirribonucleótidos (Dormeyer et al., 2001), *ii*) reducción de la forma oxidada de distintos tipos de peroxirredoxinas (Prxs) (Adak and Pal, 2012; Castro et al., 2002a, 2002b; Comini et al., 2007; Diechtierow and Krauth-Siegel, 2011; Hillebrand et al., 2003; Nogoceke et al., 1997; Piñeyro et al., 2011a; Schlecker et al., 2005; Tetaud et al., 2001; Tetaud and Fairlamb, 1998; Trujillo et al., 2004; Wilkinson et al., 2002, 2003) y *iii*) reparación de proteínas oxidadas a través de la reducción de la metionina sulfóxido reductasa (Arias et al., 2011). En consecuencia, no es de extrañar que se haya demostrado que la TXN es indispensable para los tripanosomas africanos (Comini et al., 2007; Wilkinson et al., 2003) así como para *L. infantum* (Romao et al., 2009) y, probablemente, para todos los organismos del género. En todos los casos su mecanismo de acción involucra el intercambio tiol-disulfuro entre el sustrato oxidado y el par de cisteínas del sitio activo WCPC, resultando en la reducción del sustrato y la formación de un disulfuro en la TXN<sup>28</sup>. Una diferencia esencial en la cascada redox de las TXN es que, contrario a lo que sucede en los organismos que dependen de Trx, esta proteína es reducida por T(SH)<sub>2</sub> de forma *no catalizada* y *no directamente* por una flavoproteína dependiente de NADPH como la tiorredoxina reductasa (Budde et al.,

---

<sup>28</sup> El motivo CPC se encuentra en nucleoredoxinas de mamíferos (Funato and Miki, 2007) y plantas (L. Fleitas, comunicación personal), si bien se desconoce si poseen función redox.

2003; Schlecker et al., 2007) (Figura 1.11). Si bien las TXN son estructuralmente muy similares proteínas “tipo Trx” ((Hofmann et al., 2001)), su identidad de secuencia con las mismas es baja (<20 %) y en general está restringida a la región del sitio activo (Lüdemann et al., 1998; Montemartini et al., 1998). En conclusión, la TXN citosólica es la reductasa multiuso más importante de los parásitos africanos y la principal consumidora de los equivalentes de reducción proveniente del tripanotión.

Los genomas de las 3 especies de tripanosomátidos secuenciadas codifican genes para Trx (Krauth-Siegel and Comini, 2008). La Trx de *T. brucei* fue clonada y caracterizada, posee un sitio activo canónico WCGPC (Reckenfelderbäumer et al., 2000), una estructura muy similar a Trx de otros eucariotas (Friemann et al., 2003) y al menos en este organismo, no se trata de una proteína esencial y su función biológica es desconocida (Schmidt et al., 2002) ya que todas las funciones celulares normalmente atribuidas a las Trx parecen recaer en la TXN. Como se comentó, en los genomas secuenciados de tripanosomas no aparecen secuencias para TrxR y, al menos *in vitro*, esta proteína es directamente reducida por T(SH)<sub>2</sub> (Schmidt and Krauth-Siegel, 2003) (Figura 1.11) indicando que su función -aún por definir- es subsidiaria del metabolismo redox dependiente de tripanotión. La proteína ortóloga en *T. cruzi* se expresa en muy bajos niveles en la forma no infectiva del parásito (epimastigota) y, al menos *in vitro*, también presenta actividad redox a expensas de T(SH)<sub>2</sub> (Piattoni et al., 2006).

Finalmente, el tercer grupo lo integran las glutarredoxinas (Figura 1.11), cuyas propiedades bioquímicas, biológicas y estructurales se desarrollarán en detalle en la próxima sección ya que las mismas son el objeto de estudio central de este trabajo de tesis.

## 1.4. Glutarredoxinas

### 1.4.1. Descubrimiento de las glutarredoxinas

El descubrimiento de las “glutarredoxinas” (Grx) se atribuye a Arne Holmgren quien, en 1976, identificó una proteína de *E. coli* de 10 kDa soluble, resistente a la temperatura y capaz de proveer electrones a la ribonucleótido reductasa a expensas de GSH (Holmgren, 1976). No obstante, como destacan Deponte (Deponte, 2013) y Mieyal (Gallogly et al., 2009) en revisiones recientes, es prácticamente un hecho que la actividad “tiol:disulfuro oxidoreductasa dependiente de GSH” propia de las Grx (ver a continuación) ya había sido identificada al menos dos décadas antes y descrita con los nombres de “transhidrogenasa” para la actividad encontrada en hígado de mamíferos (Racker, 1955) y “tioltransferasa” para la actividad encontrada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Askelöf et al., 1974). Sin embargo, la Grx de *E. coli* identificada por Holmgren (*EcGrx1*, ver Figura 1.15 más adelante) se convirtió rápidamente en un excelente modelo para entender esta nueva familia de proteínas liderando las publicaciones sobre el tema durante la primera época y marcando fuertemente el área (Bushweller et al., 1994; Holmgren, 1979; Höög et al., 1983, 1986; Sandberg et al., 1991; Xia et al., 1992). En consecuencia, si bien ninguno de los tres nombres refleja la naturaleza química de la reacción que catalizan estas proteínas (ver más adelante),

el nombre de “glutarredoxina” y su acrónimo Grx son los más difundidos en la literatura actual y son los que usaremos en este trabajo.

#### **1.4.2. Diversidad y clasificación de las glutarredoxinas**

Las Grx son generalmente proteínas pequeñas (80-120 aminoácidos), muy conservadas y presentes en organismos de todos los reinos (Ströher and Millar, 2012). Están relacionadas a nivel de secuencia y estructura con las Trx, con las que comparten un plegamiento característico y un sitio activo (putativo) del tipo CxxC/S. Generalmente se considera que las Grx son oxidoreductasas capaces de catalizar la reducción de disulfuros mixtos entre tioles y GSH, a expensas del propio GSH, reacción conocida como “deglutathionilación”. Como veremos más adelante, esta reacción no es la única en la que participan las Grx y, probablemente, en varios casos no es la más relevante a nivel fisiológico (Chibani et al., 2010; Deponte, 2013; Gallogly et al., 2009; Jensen et al., 2009; Lillig and Berndt, 2012; Lillig et al., 2008; Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2008, 2010; Ströher and Millar, 2012).

La clasificación más sencilla separa a las Grx en dos grandes grupos en función de si el sitio activo posee ambas cisteínas (CxxC, glutarredoxinas ditiólicas, 2-C-Grx) o si, por el contrario, posee solo una, generalmente la primera del motivo CxxC/S (glutarredoxinas monotiólicas, 1-C-Grx). Esta clasificación es ampliamente utilizada, si bien -como veremos- no refleja la complejidad mecánica ni las relaciones evolutivas dentro de esta familia de proteínas. En los últimos años y gracias al aumento en el número de secuencias disponibles a raíz de los proyectos genómicos, fue posible desarrollar análisis más detallados que derivaron en nuevos sistemas de clasificación (Alves et al., 2009; Atkinson and Babbitt, 2009a; Couturier et al., 2009; Ströher and Millar, 2012). Los mismos no solo ayudaron a entender las relaciones evolutivas entre proteínas de la familia “Trx” sino que, a su vez, pusieron de manifiesto la enorme diversidad y complejidad que existe entre Grx ya que las mismas presentan baja conservación de secuencia y una importante diversidad a nivel de organización estructural y secuencia del sitio activo (Alves et al., 2009; Atkinson and Babbitt, 2009a; Couturier et al., 2009; Herrero et al., 2010; Lillig et al., 2008; Rouhier, 2010; Ströher and Millar, 2012).

La primera clasificación basada en relaciones evolutivas a nivel de secuencia fue propuesta por Couturier y colaboradores (Couturier et al., 2009) y organizó a las Grx en 6 familias, con fuerte énfasis en clasificar la asombrosa diversidad de Grx en organismos fotosintéticos. Recientemente Ströher y Millar (Ströher and Millar, 2012) propusieron una nueva clasificación basada en la comparación de elementos de secuencia y modelos estructurales de 130 Grx representativas de organismos de todos los reinos. En esta clasificación las Grx se organizan en tres clases (Figura 1.14). Las Grx de clase I están presentes en todos los organismos y son una mezcla entre proteínas mono- y ditiólicas con una secuencia de sitio activo *consenso* C[G/P][F/Y][C/S] (Atkinson and Babbitt, 2009a; Ströher and Millar, 2012). Todas las Grx de clase I comparten el hecho de ser proteínas relativamente pequeñas (10-16 kDa), monoméricas y de dominio

único. Dentro de este grupo se encuentran las Grx “clásicas” y mejor estudiadas como ser las Grx1-3 de *E. coli* (revisado en (Fernandes and Holmgren, 2004)), las Grx1 y 2 de *S. cerevisiae*, (revisado en (Herrero et al., 2010))<sup>29</sup> y las Grx 1 y 2 humanas (revisado en (Lillig et al., 2008)). Todas ellas presentan sitio activo CPYC y actividad de deglutationilación, lo que puede dar la impresión de que esta es la función primordial de las Grx lo cual, como veremos a continuación, es incorrecto. Además de las Grx ditiólicas procarionas y eucariotas “clásicas”, como las comentadas más arriba, esta clase nuclea varias secuencias de Grx monotiólicas de eucariotas con localización subcelular (predicha o demostrada) en distintos organelos las cuales generalmente presentan sitios activos muy diversos y no son activas en reacciones de deglutationilación. A su vez, muchas Grx de esta clase poseen residuos de cisteína adicionales a los del sitio activo que no muestran patrones de conservación a nivel de secuencia ni siquiera en organismos estrechamente relacionados (Ströher and Millar, 2012). La excepción es la familia de las Grx2 de vertebrados, en las cuales se conserva un par de cisteínas externas al sitio activo que cumplen un rol estructural (Bräutigam et al., 2011).

Las Grx de clase II, por otro lado, son generalmente monotiólicas y con sitio activo C[G/P][M/F/Y][C/S]. Se encuentran tanto en procarionas como en eucariotas y, en estos últimos, son más frecuentes en plantas y protozoarios que en mamíferos (Atkinson and Babbitt, 2009a) (Figura 1.14). En eucariotas se distribuyen en varios compartimentos subcelulares y al menos el 25% de estas secuencias forma parte de proteínas multidominio, siendo la fusión con una tioredoxina propiamente dicha una de las más distribuidas en la evolución (Alves et al., 2009; Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007; Rouhier et al., 2010). Esta fusión Trx-Grx forma la familia de proteínas conocidas como Grx3/PICOT/TRXL2, de distribución ubicua entre eucariotas (Hoffmann et al., 2011). En la mayoría de los casos estudiados, estas proteínas no catalizan reacciones de deglutationilación, si bien hay excepciones como ser la Grx 6 y 7 de *S. cerevisiae* (Mesecke et al., 2008a). La clase III está dominada por las Grx del tipo “CC” porque poseen una secuencia de sitio activo CC(M/L)(C/S). Estas proteínas, identificadas originalmente con el nombre ROXY en *Arabidopsis thaliana* (Xing et al., 2005), se encuentran exclusivamente presentes en angiospermas y constituyen el grupo más abundante de Grx en plantas superiores (Rouhier et al., 2006).

Por lo tanto, a partir de la comparación de gran cantidad de secuencias y estructuras (Alves et al., 2009; Atkinson and Babbitt, 2009a; Couturier et al., 2009; Herrero et al., 2010; Lillig et al., 2008; Ströher and Millar, 2012) podemos obtener algunas generalizaciones que son, cuando menos, paradójicas con la visión que se tiene habitualmente de las Grx: *i*) en bacterias las Grx son generalmente proteínas pequeñas, monoméricas, mono- o ditiólicas y activas en reacciones de deglutationilación y otras reacciones redox, *ii*) las Grx multidominio más frecuentes en procarionas posee sitio activo ditiólico, *iii*) en eucariotas, las Grx ditiólicas son exclusivamente monoméricas, generalmente nucleo-citosólicas y activas en reacciones de deglutationilación y otras reacciones redox, *iv*) una parte importante de las Grx

---

<sup>29</sup> *S. cerevisiae* posee una tercera 2-C-Grx (Grx8) con sitio activo CPDC y propiedades enzimáticas muy peculiares dentro de las Grx de clase I (Eckers et al., 2009). Por su secuencia es probable que se trata de una proteína relacionada a la familia de la isomerasas de disulfuros (PDI) y no una Grx propiamente dicha.

eucariotas son monotiólicas, se localizan en distintos organelos y no catalizan las reacciones redox de intercambio tiol-disulfuro (ver a continuación), v) el 25% de las Grx eucariotas forma parte de proteínas multidominio, las cuales están totalmente ausentes en procariotas y vi) el sitio activo más frecuente en eucariotas es CGFS. Esta diversidad de secuencia y organización, evidentemente, se acompaña de arreglos estructurales específicos que en parte determinan o modulan la función de las Grx, como veremos en las próximas secciones.

### 1.4.3. Topología, estructura secundaria y terciaria

La identidad de secuencia entre las Grx y las Trx se determinó tempranamente y, en concordancia, la topología de estas proteínas pudo ser prevista con buen nivel de confianza aún antes de que existieran estructuras para las mismas (Eklund et al., 1984; Höög et al., 1983)<sup>30</sup>. Al tratarse de proteínas pequeñas, globulares y de fácil expresión en sistemas recombinantes, las Grx fueron modelos ideales para la biología estructural basada en resonancia magnética nuclear (NMR) multidimensional que estaba comenzando a desarrollarse en simultáneo al descubrimiento de estas proteínas. Tal es así que las estructuras de *EcGrx1* en su estado reducido, oxidado y glutationilado fueron resueltas por NMR entre 1991 y 1994 (Bushweller et al., 1994; Sodano et al., 1991b; Xia et al., 1992), menos de una década luego que se reportara la primera estructura de una proteína resuelta por esta técnica. Desde entonces se han reportado decenas de estructuras y todas poseen el plegamiento tipo “Trx” (“Trx-fold” (Martin, 1995a)), nombrado así por haber sido identificado originalmente en la tioredoxina 1 de *E. coli* (Holmgren et al., 1975).

El plegamiento Trx se encuentra en proteínas de todos los organismos y generalmente (pero no de manera exclusiva) asociado a proteínas con funciones “redox” (Atkinson and Babbitt, 2009a). La configuración básica del mismo consiste de una lámina  $\beta$  central formada por 4 hebras  $\beta$ , rodeada por 3 hélices  $\alpha$  (Figura 1.15). Este arreglo mínimo se conserva en Grx, Trx y otras enzimas dependientes de tioles como ser GST, GPx o Prx (Deponte, 2013). La topología del plegamiento Trx es muy conservada ( $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\beta 4-\alpha 3$ ) pudiéndose distinguir dos “motivos”, uno N-terminal integrado por la secuencia  $\beta\alpha\beta$  y uno C-terminal  $\beta\beta\alpha$  conectados a través de una hélice ( $\alpha 2$  en el modelo mínimo). Las hebras  $\beta$  del motivo aminoterminal corren paralelas, mientras que las del carboxiloterminal lo hacen de manera antiparalela, formando en conjunto una lámina  $\beta$  ligeramente torneada característica de este plegamiento. El arreglo de hélices también es muy característico, ya que las dos hélices de los motivos se disponen casi paralelas y sobre el mismo lado de la lámina  $\beta$ , mientras que la hélice que conecta ambos dominios ( $\alpha 2$  en Figura 1.15) se dispone sobre la otra cara de la hoja  $\beta$  y con una dirección perpendicular a las primeras (Martin, 1995a). La variación estructural más frecuente sobre este motivo mínimo se da en

---

<sup>30</sup> En realidad, la primera estructura de Grx obtenida fue la de “T4 thioredoxin” del bacteriófago T4, de manera casi simultánea al artículo de Holmgren de 1976. Sin embargo, esta proteína se consideraba una “Trx” y por lo tanto no se le asignó la denominación de Grx hasta un tiempo después (Sodano et al., 1991a; Söderberg et al., 1978).

los extremos y en algunas conexiones flexibles (*loops*), fundamentalmente entre los elementos  $\beta 2$ - $\alpha 2$  aunque también entre  $\alpha 2$ - $\beta 3$  y  $\beta 4$ - $\alpha 3$  (Figura 1.15) (Atkinson and Babbitt, 2009a; Deponte, 2013; Martin, 1995a).

La gran divergencia de las Grx a nivel de secuencia se refleja a nivel estructural (Atkinson and Babbitt, 2009; Deponte, 2013) lo que dificulta la definición de elementos estructurales *característicos* de Grx, si bien la mayoría de los elementos *típicos* del plegamiento "Trx" están conservados en estas proteínas. A su vez, las Grx de clases I y II comentadas anteriormente (Ströher and Millar, 2012) son tan divergentes entre sí como lo son con cualquier otra superfamilia de proteínas con plegamiento Trx (Atkinson and Babbitt, 2009a). El sitio activo de las Grx (CxxC/S) se ubica en el *loop* formado entre  $\beta 1$  - $\alpha 1$ , con la cisteína N-terminal expuesta al solvente, mientras que el residuo +3 (C o S, generalmente) queda incluido en la primera vuelta de la hélice  $\alpha 1$  (Figura 1.15). En el plegamiento Trx "canónico" hay al menos tres residuos de prolina conservados (Collet and Messens, 2010). El primero es el que está dentro del sitio activo, ubicado generalmente antes de la hélice  $\alpha 2$ , muy conservado en tiorredoxinas pero no en otras proteínas con plegamiento Trx (Figura 1.14) (Atkinson and Babbitt, 2009a). El segundo residuo de prolina conservado se encuentra cinco residuos hacia el extremo carboxílico después del sitio activo y se considera responsable de producir una desviación ("kink") en la hélice  $\alpha 2$ . Este residuo *generalmente* no está presente en las Grx. El tercer residuo de prolina está ubicado en el *loop* anterior a la hebra  $\beta 3$  y posee disposición *cis*, lo cual genera que esta región de la proteína sea conocida como "*cis-Pro loop*" (Collet and Messens, 2010). Si bien este residuo se encuentra lejano en secuencia, se ubica espacialmente cercano al sitio activo en la proteína plegada y se piensa que cumple un rol ya sea en la modulación del potencial redox del sitio activo o en el impedimento de la unión de metales de manera inespecífica (Atkinson and Babbitt, 2009b; Martin, 1995b; Nordstrand et al., 1999; Qi and Grishin, 2005; Ren et al., 2009; Su et al., 2007). Es interesante destacar que esta prolina está más conservada entre proteínas con Trx-fold que los propios residuos del sitio activo. La comparación de las estructuras disponibles de Grx de clase I (generalmente ditiólicas) y II (sitio activo CGFS) permitió la identificación de dos elementos más característicos de estas últimas: *i*) una inserción de cinco residuos formando un *loop* que precede al sitio activo y *ii*) un motivo WP en el *loop* que contiene la *cis-Pro*, involucrado en la unión de GSH (Comini et al., 2013; Fladvad et al., 2005). A su vez, en 1-C-Grx los residuos importantes para la interacción entre la proteína y la glicina carboxiloterminale del GSH están conservados, pero no así los residuos cargados presentes en 2-C-Grx y que se señalan como responsables de la interacción de la proteína con el glutamato del GSH (Herrero and de la Torre-Ruiz, 2007) (ver más adelante).

#### 1.4.4. Estructura cuaternaria

Como regla general, todas las Grx son proteínas monoméricas, independientemente que sean mono- o multidominio. Las únicas excepciones, por el momento, la constituyen las Grx monotiólicas 6 y 7 de levadura (ScGrx6 y ScGrx7), que poseen sitio activo CSYS y CPYS, respectivamente, y localización en la

membrana del retículo endoplásmico vía un elemento transmembrana ubicado en el extremo aminoterminal (Izquierdo et al., 2008; Mesecke et al., 2008b). Se trata de proteínas “excepcionales” en otros aspectos también, ya que ambas presentan actividad redox (Mesecke et al., 2008a). Las GrxC4 de *Populus tremula* (Noguera et al., 2005) y Grx1 de *E. coli* (Kelley et al., 1997) fueron reportadas también como proteínas con equilibrio monómero-dímero durante los estudios de elucidación estructural por NMR, pero es probable que esto sea un artefacto producto de la alta concentración de proteína usada en las condiciones experimentales. Por último, una de las Grx monotiólicas mitocondriales de *T. brucei* (1-C-Grx1) también fue reportada por nuestro grupo como una proteína dimérica (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008), si bien los datos más recientes indican que la proteína es un monómero, como discutiremos en este trabajo.

### **1.4.5. Mecanismo catalítico de glutarredoxinas**

#### **1.4.5.1. Intercambio tiol-disulfuro**

Las glutarredoxinas son, en términos generales, “GSH:disulfuro oxidoreductasas”, es decir, proteínas que catalizan reacciones de intercambio entre tioles y disulfuros, generalmente a expensas de GSH (glutathionilación/deglutathionilación, (Jensen et al., 2009; Lillig and Berndt, 2012)). Las reacciones de intercambio tiol:disulfuro han sido objeto de estudio por décadas, tanto en el ámbito de la fisicoquímica orgánica (ver por ej.:(Wilson et al., 1977)) como en bioquímica (ver por ej. (Jensen, 1959)). La química involucrada en estas reacciones es la misma tanto para moléculas pequeñas como para proteínas y está bien caracterizada (Gilbert, 1990). Sin embargo, los factores intrínsecos producto de la estructura y dinámica de las proteínas determina que aún hoy sea difícil de explicar detalladamente el mecanismo por el cual las Grx -y otras oxidoreductasas- catalizan el intercambio tiol:disulfuro (Collet and Messens, 2010; Gallogly et al., 2009; Gilbert, 1990; Jensen et al., 2009) (Figura 1.16).

En su forma más simple, una reacción de intercambio tiol:disulfuro es una sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), donde un grupo nucleófilo (tiolato) ataca un centro electrófilo (enlace disulfuro), produciendo un estado de transición lineal con la carga deslocalizada entre los 3 átomos de azufre involucrados, que se resuelve con la formación de un nuevo disulfuro y un tiolato como grupo saliente (Figura 1.16, reacción 1). En moléculas pequeñas, la velocidad de esta reacción dependerá de la nucleofilicidad del grupo atacante, la reactividad del átomo central electrófilo, la acidez y estabilidad del grupo saliente (revisado en (Gilbert, 1990; Jensen et al., 2009)). Debido a que el RSH es poco nucleofílico, esta reacción es fuertemente dependiente del pH y su velocidad será mayor cuanto mayor sea la disponibilidad de la forma desprotonada nucleofílica (tiolato,  $RS^-$ ). En el caso del GSH la reacción de intercambio *no catalizada* entre  $G_1SH$  y  $R_2SS_3R$  (Figura 1.16, reacción 2) a pH fisiológico será lenta por la baja disponibilidad de tiolato ( $GS^-$ , <1 %). De cualquier manera, más rápido o más lento, la reacción llegará a un estado de equilibrio basado en las concentraciones iniciales de los componentes y

gobernado por la constante de equilibrio del par en cuestión ( $K_{ox}$ ) la cual, por tratarse de una reacción de oxidorreducción, está asociada a un potencial redox mediante la ecuación de Nernst (Iversen et al., 2010; Jensen et al., 2009).

#### **1.4.5.2. Glutationilación y otras “tiolaciones”**

La *glutationilación* es la formación de un disulfuro mixto entre el GSH y una cisteína proteica (Figura 1.16, reacción 3). Se trata de la modificación postraduccional de “tiolación”<sup>31</sup> mejor estudiada (Pimentel et al., 2012) y la más frecuente en mamíferos, pero no la única posible. Por ejemplo, en el plasma humano aproximadamente el 25% de la albúmina que circula está “tiolada” por cisteína (Turell et al., 2009), varias proteínas de secreción de *E. coli* están “tioladas” por Gsp (Liu et al., 2009) y en actinomicetos (ej. *Mycobacterium tuberculosis*) y firmicutos (ej. *Bacillus subtilis*) ciertos estímulos oxidativos determinan la “tiolación” de factores de transcripción por los glucotioles micotiol (Antelmann and Hamilton, 2012; Van Laer et al., 2012) o bacililtiol (Chi et al., 2011; Helmann, 2011), respectivamente (Figura 1.10). En tripanosomas, por su parte, ciertas proteínas son “tioladas” por GSH o Gsp (Melchers et al., 2007). La glutacionilación se puede racionalizar como una reacción de intercambio tiol:disulfuro entre la proteína reducida y el glutatión oxidado y podría darse, en principio, sobre cualquier tiol proteico libre y accesible al solvente (Ghezzi, 2005; Jensen et al., 2009) (Figura 1.16, reacción 3 y 4). Sin embargo, en condiciones fisiológicas esta reacción es poco probable fundamentalmente porque: *i*) la concentración de GSSG es muy baja (en levaduras, por ejemplo, la relación GSH:GSSG es  $\geq 10000:1$  (Morgan et al., 2012)) y *ii*) el pKa de la mayoría de los tioles proteicos es  $>8$ , determinando una muy baja disponibilidad de tiolato en condiciones “fisiológicas” (Flohé, 2012a; Gallogly et al., 2009; Jensen et al., 2009). La compartimentalización puede cambiar ambos factores y hacer que la glutacionilación directa sea una posibilidad, por ejemplo, debido a la acumulación de GSSG en la vacuola de levaduras (Morgan et al., 2012) o en el retículo endoplásmico de células de mamíferos (Birk et al., 2013), o por la mayor alcalinidad de la matriz mitocondrial (pH 7.6-8.6 (Schwarzländer et al., 2012)), si bien esto no ha sido estudiado en detalle. Es importante destacar que el T(SH)<sub>2</sub>, a pesar de ser el tiol más abundante en tripanosomas, no es un posible agente tiolante por su condición de ditiol y que es posible que este función en tripanosomas sea ocupada por otro tiol de bajo peso molecular como ser GSH o Gsp (Manta et al., 2013b).

---

<sup>31</sup> En este trabajo el término “tiolación” es usado para definir la formación de un disulfuro mixto entre una cisteína proteica y el grupo tiol de una molécula X, por ejemplo, glutationilación para la unión de una molécula de glutatión, cisteinilación para la cisteína o glutationilespermidinilación para la glutationilespermidina. Somos conscientes de que es una definición incorrecta ya que químicamente el término tiolación define la generación de un grupo tiol (RSH) en una molécula que no lo tenía y con esa acepción fue aplicado por primera vez en bioquímica (Benesch and Benesch, 1958). En la actualidad los términos “tiolación” o “S-tiolacion” se utilizan de manera indistinta para definir tanto lo comentado más arriba como la sustitución de un oxígeno carbonílico (oxo) por un átomo de azufre (tiooxo) en la posición 2 de la uridina de ciertos tRNA (“2-thiolation”) (Ikeuchi et al., 2006), si bien en ninguno de los casos se trata de un uso adecuado a la nomenclatura química.

A nivel celular la glutacionilación parece ser un proceso fuertemente regulado y, en coincidencia con su rol señalizador, no todos los tioles proteicos son “glutacionilables”, ni todos los estímulos determinan el mismo patrón de glutacionilación. Se han propuesto varios caminos para la formación de proteínas glutacioniladas a nivel celular y, probablemente, cada uno tenga relevancia en diferentes condiciones fisiopatológicas (por referencias recientes ver por ejemplo: (Dalle-Donne et al., 2009; Jortzik et al., 2012; Mieyal and Chock, 2012; Pimentel et al., 2012; Xiong et al., 2011). Ciertos estímulos endógenos o exógenos pueden determinar la oxidación de tioles proteicos a la forma sulfénico (RSOH) (Roos and Messens, 2011) el cual puede reaccionar *directamente* con GSH, de abundancia milimolar en la mayoría de las células eucariotas, resultando en la “tiolación” de proteínas (Ghezzi, 2005) (Figura 1.16, reacción 3). En este camino *no catalizado* la selectividad recaerá sobre *cuáles* tioles proteicos se oxidan *específicamente* a RSOH a consecuencia del estímulo oxidativo. Esta vía ha sido indicada como responsable de la glutacionilación de proteínas esenciales *in vivo*, como la actina (Sakai et al., 2012) o la Trx (Casagrande et al., 2002), pero su universalidad es muy discutible ya que la oxidación de cisteínas a ácido sulfénico *in vivo* es un mecanismo de señalización fuertemente regulado y probablemente restringido a un pequeño conjunto de cisteínas proteicas en condiciones fisiológicas (Adimora et al., 2010; Ferrer-Sueta et al., 2011). La otra opción es que la “transferencia del grupo GSH” desde GSSG sobre el tiol proteico sea catalizada (Figura 1.16, reacción 4). Si bien existen enzimas que catalizan reacciones de transferencia, como las GST arriba comentadas o las glioxalidas, los sustratos aceptores son generalmente moléculas pequeñas (xenobióticos, metilglioxal, etc.) y no tioles proteicos (Deponte, 2013; Gallogly and Mieyal, 2007). Las únicas proteínas para las cuales se ha reportado la capacidad de “glutacionilar” tioles proteicos a expensas de GSSG son, paradójicamente, las Grx, cuya función enzimática mejor conocida es la reacción en sentido contrario. Este camino catalizado por Grx se ha comprobado *in vitro* (Björnberg et al., 2006; Ruoppolo et al., 1997), *in vivo* (Eser et al., 2009) y en distintos modelos celulares mediante el uso de fusiones de Grx a sondas fluorescentes redox sensibles (Meyer and Dick, 2010) (ver próximo párrafo). En conclusión, la glutacionilación existe *in vivo* y es, probablemente, un mecanismo de señalización o protección contra el daño oxidativo. Si bien no está claro el/los mecanismo/s por el cual se da esta modificación, la evidencia apunta indudablemente a un rol regulador de la Grx, ya sea en su formación o remoción.

#### **1.4.5.3. Mecanismo enzimático de las glutarredoxinas**

Si bien la reacción que mejor describe a las Grx es la *deglutacionilación* (ver a continuación), las Grx se clasifican oficialmente con el código EC 1.20.4.1 (Deponte, 2013), es decir, oxidoreductasa (1) que actúa sobre fósforo o arsénico (20) con un disulfuro como aceptor de electrones (4). Esta clasificación corresponde a la molibdoenzima arsenato reductasa, que cataliza la reducción de arsenato *a expensas de*

*glutarredoxinas* y GSH (Gladysheva et al., 1994; Shi et al., 1999)<sup>32</sup>. Aunque algunas isoformas de Grx sean muy eficientes en estas reacciones *in vitro*, esta función altamente especializada no está presentes en todas las Grx y mucho menos refleja su rol fisiológico, por lo cual obliga a reconsiderar su denominación funcional<sup>33</sup>. Algunas Grx son efectivamente “deglutinationilasas” *in vivo* y cumplen funciones esenciales relacionadas a su actividad redox pero esto no puede generalizarse ni siquiera para las Grx de clase I mejor caracterizadas como *EcGrx1* o *ScGrx1*, proteínas no esenciales cuyos sustratos fisiológicos siguen sin identificarse (revisado en (Deponte, 2013; Ströher and Millar, 2012)). El descubrimiento de las versiones monotiólicas complicó aun más la situación y, como veremos, amplió sustancialmente el espectro de posibles funciones biológicas de las proteínas llamadas, generalmente, “glutarredoxinas”.

El mecanismo catalítico de las Grx ha sido estudiado mayoritariamente en reacciones no fisiológicas de deglutinationilación de disulfuros mixtos entre GSH y  $\beta$ -mercaptoetanol, péptidos sintéticos o albúmina, a expensas de GSH (Gallogly et al., 2008, 2009; Peltoniemi et al., 2006). En términos generales, la reacción global involucra dos etapas discretas (Figura 1.17): en la mitad “oxidativa” la Grx reducida reacciona con el sustrato oxidado (RSSG), resultando glutationilada (Grx-SG) y liberando el primer producto (RSH). En la mitad “reductiva” una molécula de GSH reacciona con la enzima glutationilada liberando GSSG y la enzima reducida (Figura 1.17). Este mecanismo de doble desplazamiento o “ping-pong” es frecuente en oxidorreductasas (Toppo et al., 2009; Trujillo et al., 2007) y presenta ciertas características que merecen ser destacadas (revisado en (Deponte, 2013; Gallogly et al., 2009; Jensen et al., 2009)). El primer paso es un desplazamiento tiol:disulfuro donde la enzima confiere especificidad por GSH formando el disulfuro mixto, probablemente a raíz de la orientación que toma el grupo  $\gamma$ -glutamilo del GSH durante o luego de la formación del nuevo enlace covalente (Deponte, 2013). Se trata de la mitad más rápida del ciclo catalítico fundamentalmente debido a que: *i*) el pKa de la cisteína N-terminal del sitio activo de la Grx es generalmente ácido (<5), *ii*) el estado de transición tiene como átomo central al azufre del glutatión, que es más electrofílico que la cisteína proteica, *iii*) el grupo saliente es aniónico y se protona al dejar el sitio activo, desplazando la reacción hacia los productos y *iv*) el glutatión que queda covalentemente unido a la proteína establece (durante o luego del paso químico) varias interacciones electrostáticas específicas con residuos conservados en la superficie de la proteína. El segundo paso es otro desplazamiento tiol:disulfuro y es la etapa limitante de la velocidad ya que: *i*) el nucleófilo es el GSH libre, el cual a cualquier pH menor a 8 generalmente se encuentra como tiol, lo cual lo hace poco reactivo y determina que deba ser activado para reaccionar con el disulfuro mixto Grx-SG, por un mecanismo aún desconocido y *ii*) una parte del producto conserva las interacciones con el sitio activo formadas durante la primera mitad. En concordancia con lo comentando en el párrafo anterior, en las reacciones de “glutinationilación” catalizadas por Grx el agente “glutinationilante” es el intermediario Grx-SG el cual

---

<sup>32</sup> “Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse (1992)” <http://www.chem.gmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/20/4/1.html>

<sup>33</sup> Más aún, algunas Grx como Grx1 y 2 de *S. cerevisiae* presentan actividad hidropéroxido reductasa (Collinson et al., 2002) y actividad GST con sustratos electrofilos (Collinson and Grant, 2003) y no por ello se define a las Grx dentro de estas familias.

reacciona específicamente con un tiol proteico en un mecanismo simétrico al que acabamos de describir (Eser et al., 2009; Lillig and Berndt, 2012). Claramente, la selectividad en la *glutathionilación catalizada por Grx* estará determinada por las interacciones proteína-proteína entre la forma glutathionilada de la Grx y la proteína “aceptora” del grupo GSH, sobre las cuales no conocemos que existan datos experimentales.

Una característica determinante del mecanismo planteado es que es “monotiólico”, es decir, únicamente es necesaria la participación de la cisteína aminoterminal del sitio activo, estrictamente conservada entre Grx de todas las clases. En consecuencia, sería de esperar que todas las Grx (y otras oxidoreductasas con sitio activo similar)<sup>34</sup> fueran capaces de catalizar esta reacción. Sin embargo, como se comentó anteriormente, la gran mayoría de las Grx monotiólicas estudiadas hasta el momento *no presentan actividad redox* (ver a continuación) a pesar de poseer un sitio activo potencialmente funcional. Las Grx ditiólicas (generalmente de clase I), por el contrario, no solo catalizan las reacciones “monotiólicas” descritas más arriba sino que en algunos casos también utilizan un mecanismo “ditiólico” en donde el segundo paso involucra la formación de un disulfuro intramolecular (Grx-S<sub>2</sub>) entre ambas cisteínas del sitio activo (Deponte, 2013) (Figura 1.17). Si bien la comparación con las Trx indicaría que esta ruta es la favorecida estructural y cinéticamente (Collet and Messens, 2010), no es el caso en las Grx, ya que la reacción de formación de Grx-S<sub>2</sub> depende del ataque nucleofílico de la cisteína carboxiloterminal del sitio activo sobre el disulfuro mixto, lo cual está desfavorecido tanto por motivos de *reactividad*, ya que la disponibilidad de nucleófilo es baja debido a que el pKa de esta segunda cisteína no es ácido como *conformacionales*, ya que la cisteína carboxiloterminal pertenece a la primera vuelta de una hélice  $\alpha$  y el átomo de azufre no está en la posición ideal para atacar el disulfuro. A su vez, la reacción determina la liberación de GSH, el cual está estabilizado por interacciones específicas con la proteína, como se comentó anteriormente (Deponte, 2013; Gallogly et al., 2009; Peltoniemi et al., 2006). Por último, la reducción de Grx-S<sub>2</sub> requiere dos reacciones con GSH, con sus etapas de activación incluidas. Todo esto apunta a que, independientemente de tratarse de Grx mono- o ditiólicas, la formación del disulfuro intramolecular en Grx de sitio activo CxxC es un paso no productivo que compite con la resolución rápida de la especie glutathionilada, también dependiente de GSH. En consecuencia, las funciones catalíticas dependientes del mecanismo ditiólico “tipo Trx” parecen estar restringidas a ciertos sustratos donde hay solapamiento de funciones con la propia Trx, como la reducción de la ribonucleótido reductasa (Deponte, 2013; Marino et al., 2010).

---

<sup>34</sup> Se ha reportado que ciertas Trx de plantas (Bedhomme et al., 2012) o levaduras (Greetham et al., 2010; Silva et al., 2008) pueden deglutathionilar proteínas *in vitro*. Por otro lado la sulfiredoxina -una enzima cuya única función conocida era reducir la forma sulfínico de ciertas Prxs a expensas de ATP y GSH- es capaz de deglutathionilar varias proteínas *in vivo* (Findlay et al., 2006) y ciertos residuos de cisteína glutathionilados de las Prxs *in vitro* (Park et al., 2009).

## 1.4.6. Glutarredoxinas monotiólicas

### 1.4.6.1. Identificación

Las 1-C-Grx fueron originalmente identificadas en la levadura *S. cerevisiae* por el grupo de Enrique Herrero (Universidad de Lleida, España) como genes con importante similitud a las “clásicas” Grx1 y Grx2 (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999) y rápidamente se encontraron homólogos en los genomas de bacterias, protozoarios, mamíferos y plantas (Fernandes et al., 2005; Fomenko and Gladyshev, 2002; Isakov et al., 2000; Lemaire, 2004; Rahlfs et al., 2001). La primera proteína de la familia en ser estudiada *in vitro* e *in vivo* fue la Grx5 de levadura (ScGrx5), una isoforma monodominio de localización mitocondrial a la cual se le atribuyó una función en las defensas antioxidantes del organismo, a pesar de que *in vitro* la proteína no presentaba actividad en el ensayo clásico de actividad glutarredoxina basado en la reducción catalítica del disulfuro entre GSH  $\beta$ -mercaptoetanol a expensas de GSH (Rodríguez-Manzaneque et al., 1999; Shenton et al., 2002). En paralelo a la identificación de ScGrx5 se identificaron las ScGrx3 y ScGrx4, las primeras Grx multidominio (Molina et al., 2004; Tamarit et al., 2003). El resultado más interesante de la primera etapa del estudio de esta nueva familia de proteínas provino de la identificación de que el mutante *knock-out* de ScGrx5, si bien no es letal, presenta acumulación de hierro a nivel mitocondrial y una marcada inactivación de enzimas dependientes de FeS como ser la aconitasa y sensibilidad a oxidantes (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002). En los años siguientes se demostró que la asociación entre las 1-C-Grx y el metabolismo de FeS, que había pasado completamente desapercibida hasta entonces, es una característica evolutiva muy conservada desde bacterias hasta mamíferos y generalmente imprescindible en todos los organismos (Rouhier et al., 2010). Por ejemplo, en 2005 se identificó la única Grx monotiólica de *E. coli* (Grx4) la cual es esencial para la bacteria y está relacionada al control de los niveles de hierro intracelulares (Fernandes et al., 2005; Gerdes et al., 2003). Al mismo tiempo Wingert y colaboradores (Wingert et al., 2005) identificaron que el fenotipo conocido como *shiraz* en el pez cebra, caracterizado por una anemia hipocrómica por defecto en la síntesis de grupo hemo, es causado por una mutación en el gen homólogo a Grx5, relacionando por primera vez ambas vías. Molina-Navarro y colaboradores (Molina-Navarro et al., 2006), por su parte, demostraron que la función de ScGrx5 podía ser subrogada por proteínas homólogas tanto bacterianas como de vertebrados, apuntando a una conservación evolutiva de esta función asociada al metabolismo de FeS. Finalmente, un caso clínico permitió demostrar que una mutación en el sitio de *splicing* del intrón 1 del gen de la Grx5 en humanos, que tiene como consecuencia una drástica reducción de los niveles del ARN mensajero correspondiente, determina un fenotipo en donde varios aspectos del metabolismo del hierro a nivel mitocondrial están alterados (Camaschella et al., 2007; Ye et al., 2010).

#### 1.4.6.2. Coordinación de centros ferrosulfurados por glutaredoxinas

La existencia de una relación entre Grx y el metabolismo de hierro fue un descubrimiento completamente inesperado y, en un principio, no pasó de la descripción de un vínculo entre ciertos fenotipos y la ausencia o disfunción de Grx monotiólicas. La primera evidencia (indirecta) de la existencia de una relación entre las glutaredoxinas y la biosíntesis de FeS provino de estudios con el regulador transcripcional de *E. coli* fumarato nitrato reductasa (FNR), una proteína con un FeS del tipo [4Fe-4S] sensible a oxígeno que participa en el cambio entre respiración aeróbica y anaeróbica. La disminución de GSH mediante butationa sulfoximina determinó una pérdida de actividad del regulador *in vivo* (Tran et al., 2000), mientras que *in vitro* las 3 Grx de *E. coli* (Grx1-3, todas 2-C-Grx) eran capaces de acelerar el ensamblado del FeS sobre la apo-proteína (Achebach et al., 2004). En su momento, estos resultados fueron interpretados a través de un posible rol de las Grx mediante la reducción de los residuos de cisteína de FNR que actúan como ligandos del FeS a expensas de GSH. Al poco tiempo de que el grupo de Herrero pusiera en evidencia la relación entre ScGrx5 y el metabolismo de hierro (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), Mühlhoff y colaboradores (Mühlhoff et al., 2003) ubicaron efectivamente a esta proteína como parte de la maquinaria esencial para la biogénesis de FeS en experimentos *in vivo*, en concordancia con predicciones bioinformáticas que explicaba el fenotipo mutante de la levadura carentes de Grx5 ubicando a esta proteína en algún punto en etapas tempranas de esta vía (Alves et al., 2004). El punto de inflexión se dio poco tiempo después a raíz del trabajo de Lillig y colaboradores (Lillig et al., 2005) con la isoforma mitocondrial de la Grx2 humana. La Grx2 humana, que presenta dos isoformas de diferente localización subcelular codificadas por distintos codones de inicio, se trata de uno los prototipos de Grx "clásicas", con un sitio activo CPYC y actividad en ensayos de reducción de disulfuros mixtos con GSH (Gladyshev et al., 2001; Lundberg et al., 2001). La purificación en gran escala de esta proteína determinó el aislamiento de una fracción dimerica y coloreada, un hallazgo inesperado ya que no se le conocían cofactores. Mediante análisis espectroscópico y cromatográficos de la proteína recombinante se estableció que la especie coloreada correspondía a una especie homodimérica de Grx2 coordinando un FeS, lo cual fue además confirmado a nivel celular mediante radiodetección de hierro radiactivo (Lillig et al., 2005) y, más recientemente, por técnicas de fluorescencia de complementación bimolecular (Hoff et al., 2009).

La coordinación de centros ferrosulfurados por proteínas con plegamiento tipo Trx había sido reportada únicamente para una rara familia de ferredoxinas bacterianas (Yeh et al., 2000) y para mutantes artificiales de Trx con sitio activo CCxC (Masip et al., 2004). En consecuencia, estas nuevas proteínas FeS despertaron rápidamente la atención de varios grupos de investigación. En su versión más simple, un FeS es una estructura tetraédrica formada por dos átomos de hierro unidos a dos átomos de azufre [2Fe-2S] y coordinado por cuatro ligandos más, usualmente cisteína (Figura 1.8) (Beinert et al., 1997). Mediante el uso de espectroscopía de Mössbauer<sup>35</sup> Lillig y colaboradores demostraron que la HsGrx2

---

<sup>35</sup> Se trata de una técnica de resonancia nuclear muy sensible a la geometría del entorno químico del núcleo analizado. Para el caso de cofactores con hierro generalmente se utiliza el isótopo <sup>57</sup>Fe el cual posee una transición

une un FeS del tipo [2Fe-2S] coordinado exclusivamente por cisteínas. Mediante mutagénesis “sitio-dirigida” y modelos estructurales los autores propusieron que la cisteína aminoterminal del sitio activo, la única conservada en todas las Grx, era esencial para la coordinación del FeS (Lillig et al., 2005). Poco tiempo después Rouhier y colaboradores demostraron que una Grx de álamo (GrxC1, sitio activo CGYC) también es capaz de coordinar FeS y dimerizar en torno al centro ferrosulfurado (Feng et al., 2006; Rouhier et al., 2007). Mediante la aplicación de una gran variedad de técnicas espectroscópicas y estructurales (incluyendo la resolución de estructuras por NMR y cristalografía) los investigadores demostraron que la coordinación del FeS se daba a través de las cisteínas aminotermiales del sitio activo, como indicaron Lillig y colaboradores, pero que las posiciones de coordinación restantes eran provistas por los grupos tiol de dos moléculas de GSH, cada una unida *no covalentemente* a la región del sitio activo del monómero (Feng et al., 2006; Rouhier et al., 2007) (Figura 1.18). Este mecanismo de coordinación completamente novedoso fue confirmado bioquímicamente (Berndt et al., 2007) y estructuralmente para la *HsGrx2* (Johansson et al., 2007) y otras Grx de clase I tanto de plantas (*Arabidopsis thaliana* GrxC1 (Riondet et al., 2012) y GrxC5 (Couturier et al., 2011)) como protozoarios (Ceylan et al., 2010; Rada et al., 2009). Sin embargo, estos resultados refieren a 2-C-Grx, para las cuales no existe relación demostrada entre su función biológica y el metabolismo del hierro, con la posible excepción de *HsGrx2* (Lee et al., 2009). Evidentemente, el foco estaba puesto en las 1-C-Grx ya que eran las únicas Grx para las cuales *sí* había una relación demostrada con la biogénesis de centros ferrosulfurados (Lill et al., 2012). Poco tiempo después se demostró que varias proteínas de clase II y algunas 1-C-Grx de clase I eran capaces de coordinar FeS *in vitro* mediante un mecanismo equivalente al identificado en *HsGrx2*. Esto se propuso en base a resultados espectroscópicos, en una primera instancia, para varias Grx de clase II (Picciocchi et al., 2007) que luego fueron confirmados por técnicas espectroscópicas más especializadas y métodos estructurales en la Grx4 de *E. coli* (Iwema et al., 2009), Grx5 de humanos (Johansson et al., 2011; Ye et al., 2010), Grx14 y Grx16 de plantas superiores (Bandyopadhyay et al., 2008; Wang et al., 2012), Grx 6 y 7 de levaduras (Luo et al., 2010; Mesecke et al., 2008a) y una 1-C-Grx de tripanosoma (Comini et al., 2008). Finalmente, a pesar de ser la primer Grx en ser estudiada en su relación al metabolismo de FeS, recién en los últimos meses se confirmó la formación de un FeS sobre ScGrx5 tanto *in vitro* (Shakamuri et al., 2012; Zhang et al., 2013) como *in vivo* (Uzarska et al., 2013). En conclusión, varias Grx monodominio de clase I y II pueden coordinar *in vitro* un FeS de tipo [2Fe-2S] y al menos algunas de ellas también lo hacen *in vivo*, como ser la forma mitocondrial de la Grx2 humana (Hoff et al., 2009; Lillig et al., 2005), la Grx5 de humanos (Lillig et al., 2005; Ye et al., 2010) y levadura (Uzarska et al., 2013), la GrxC1 de *Arabidopsis thaliana* (Riondet et al., 2012) y algunas Grx multidominio como ScGrx3 y HsGrx3 (Haunhorst et al., 2010; Mühlenhoff et al., 2010). Las 1-C-Grx monodominio como Grx5 o similares han sido indudablemente identificadas como parte de la maquinaria de biogénesis de centros ferrosulfurados (Mapolelo et al., 2012; Shakamuri et al., 2012; Ye et al., 2010) proceso que en eucariotas tiene lugar fundamentalmente en la mitocondria (Lill and

---

nuclear a una energía definida y poco variable (ver (Lindahl and Holmes-Hampton, 2011) por más información y referencias específicas).

Mühlenhoff, 2006). Las 2-C-Grx, por su parte, también poseen representantes a nivel mitocondrial en muchos eucariotas y son capaces de coordinar FeS, si bien ésta no parece ser la función principal de este grupo de Grx que son activas en reacciones redox (Ströher and Millar, 2012), por lo cual no ahondaremos más en ellas y solamente se comentaran a efectos comparativos.

## **Capítulo 2**

### **La familia de las glutarredoxinas en *Trypanosoma brucei***

## 2.1. El atlas de proteínas con plegamiento Trx en *Trypanosoma brucei*

El plegamiento Trx (Figura 1.15) es uno de los arreglos estructurales con mayor representación y distribución en la evolución (Wolf et al., 1999). Consideradas en su conjunto, las proteínas con este arreglo de estructuras secundarias forman uno de los grupos más grandes, integrado por al menos 20 familias<sup>36</sup> de proteínas homólogas<sup>37</sup> (Meng and Babbitt, 2011). A nivel estructural, las proteínas con plegamiento Trx se distribuyen en más de 1000 arquitecturas de dominios posibles y ~10% de esta diversidad es aportada por la familia de las Grx (Atkinson and Babbitt, 2009a, 2009b; Pedone et al., 2010).

Todos los genomas codifican para proteínas con plegamiento Trx, desde apenas unas pocas en algunas bacterias hasta más de 100 en *A. thaliana*, manteniendo una relación aproximadamente lineal entre su abundancia y el tamaño del genoma (Fomenko and Gladyshev, 2012; Wolf et al., 1999). Al comenzar este trabajo se habían identificado y caracterizado varias proteínas con este plegamiento en *T. brucei*, principalmente las peroxidasas y oxidoreductasas dependiente de tripanotión comentadas en la introducción (TXN, Trx, TXNPx y Px), pero también la quiescina sulfidril oxidasa (QSOX, (Alon et al., 2012; Kodali and Thorpe, 2010)) y dos isomerasas de disulfuros (PDI, (Rubotham et al., 2005)). Con respecto la familia Grx, se había reportado la existencia de tres Grx monotiólicas (1-C-Grx1, 2 y 3 (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008)) y dos Grx ditiólicas (2-C-Grx1 y 2, (Ceylan et al., 2010)). Sin embargo en una extensa revisión sobre glutarredoxinas publicada recientemente por Ströher y Millar (Ströher and Millar, 2012) se reportó que *T. brucei* posee *siete* secuencias relacionadas a Grx, es decir, dos más de las consideradas por nosotros originalmente. Como veremos a continuación, estas secuencias adicionales corresponden a proteínas de la familia de las GST caracterizadas por poseer un dominio con plegamiento Trx fusionado a un dominio helicoidal (Oakley, 2011), las cuales se consideraban ausentes del genoma de estos organismos (Vickers and Fairlamb, 2004).

A raíz de este resultado y teniendo en cuenta que las bases de datos de genomas están sometidas a frecuentes procesos de actualización y curado, decidimos realizar una nueva búsqueda sistemática con

---

<sup>36</sup> La nomenclatura para la clasificación de proteínas es variable y depende del contexto o de los autores. En este trabajo se cita frecuentemente trabajos de Babbitt y colaboradores (Atkinson and Babbitt, 2009a, 2009b; Gerlt and Babbitt, 2000) que utilizan el término superfamilia para definir al grupo conformado por todas las proteínas relacionadas por homología (ver próxima nota). En esta clasificación, las proteínas con plegamiento Trx se clasifican en 20 superfamilias, siendo las Grx una de ellas. Una clasificación similar se aplica en UniProtKB/Swiss-Prot (Apweiler et al., 2004). SCOP, por su parte, define a la superfamilia "Thioredoxin-like" (ID 52833) como integrada por 23 familias, una de las cuales es "thioltransferases/glutaredoxins" (ID 52834). Finalmente, PFAM utiliza el término *clan* para el grupo formado por dos o más familias de proteínas del mismo origen evolutivo (Finn et al., 2006) y define el clan de proteínas "Thioredoxin-like" (ID CL0172) como el conjunto de 45 familias de proteínas relacionadas evolutivamente y que comparten el plegamiento Trx, siendo las glutarredoxinas una de ellas (ID PF00462). Si bien existen diferencias entre cada clasificación, el término familia se usa generalmente para definir un grupo de proteínas ortólogas (ver próxima nota) y es así como lo aplicamos en este trabajo.

<sup>37</sup> Según (Gerlt and Babbitt, 2000) se entiende por proteínas homólogas a aquellas que derivan de un ancestro común y, como tal, se considera que poseen estructuras similares. Se consideran proteínas ortólogas aquellas proteínas homólogas de diferentes especies que poseen la misma función. Dos secuencias de un mismo organismo se consideran parálogas si derivan de un mismo ancestro por duplicación, pudiendo o no cumplir la misma función en la especie actual. Si dos proteínas cumplen la misma función y no están relacionadas estructuralmente se definen como análogas independientemente que estas pertenezcan o no a la misma especie.

el fin de relevar posibles secuencias relacionadas a Grx presentes en el genoma de *T. brucei* que no se hubiesen detectado en los primeros trabajos (Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). En primer lugar se seleccionó la secuencia a ser empleada como sonda de la búsqueda de acuerdo al siguiente criterio: ser una secuencia representativa de las Grx más distribuidas en eucariotas (clase II), de longitud estándar (~100 aminoácidos) y con el sitio activo más frecuente en eucariotas (CGFS, (Ströher and Millar, 2012)). El dominio Grx de 1-C-Grx2 (Filser et al., 2008)(residuos 30-131) reunía estas características. Con esta secuencia y aprovechando las mejoras implementadas por el NCBI en los algoritmos de rastreo de secuencias homólogas usando secuencias de aminoácidos (Delta-BLAST (Boratyn et al., 2012, 2013)) llevamos a cabo una búsqueda dentro de las secuencias no redundantes de proteínas de *T. brucei* usando el programa Delta-BLAST. Con esta estrategia recuperamos un total de *nueve* secuencias de proteínas relacionadas a las Grx con niveles de confiabilidad por encima del límite estipulado por defecto, incluyendo las cinco previamente identificadas por nuestro grupo y las dos proteínas de la familia GST identificadas en (Ströher and Millar, 2012)<sup>38</sup>. Como se discutirá de aquí en adelante, todas estas secuencias fueron analizadas para corroborar su identidad, clasificación y relación con distintos miembros de la familia con plegamiento Trx de este organismo y otros con escasa o muy baja relación filogenética.

Debido a la gran diversidad de secuencias que presentan las proteínas con plegamiento Trx y a su compleja organización de dominios (Atkinson and Babbitt, 2009b) la identificación de nuevos miembros de una cierta familia no es trivial y sigue siendo un área de investigación activa inclusive en organismos bien caracterizados (ver por ej. (Liu et al., 2013a; Røhr et al., 2013)). En ese sentido, hay dos requisitos mínimos exigibles para que una secuencia pueda ser considerada como del tipo Grx o relacionada: *i*) poseer al menos un dominio con plegamiento Trx, lo cual es fácilmente reconocible mediante programas como PROSITE (Sigrist et al., 2012) o SMART (Letunic et al., 2012) y *ii*) contener al menos una de las cisteína del motivo CxxC. En función de lo presentado en la Introducción el segundo criterio parece razonable ya que, si bien solo el 44% de las proteínas con plegamiento Trx poseen el sitio activo completo (Atkinson and Babbitt, 2009b), todas las Grx poseen al menos uno de los dos residuos conservados (Figura 1.14). Solo cinco familias de proteínas con plegamiento Trx no poseen ninguna de las cisteína del motivo CxxC (calsequestrina, DUF1687, ERp29, HyaE y SH3BGR) y, en base a lo que sabemos actualmente, ninguna de ellas se clasifica como Grx ni poseen actividades redox dependientes de tioles<sup>39</sup>. Finalmente, si ambos criterios se cumplen, su relación de identidad con otras proteínas de plegamiento Trx es lo que nos permitirá definir con certeza su clasificación dentro de la familia Grx.

Antes de continuar, es importante destacar que, a la fecha, no existen trabajos publicados que hayan abordado la identificación y análisis detallado de secuencias relacionadas al plegamiento Trx en tripanosomátidos. Esto nos obligó a generar y caracterizar, al menos de manera preliminar, dicha base de

---

<sup>38</sup> Es interesante destacar que una búsqueda con PSI-BLAST solo identifica las tres 1-C-Grx1 por encima del nivel de confiabilidad (no mostrado).

<sup>39</sup> Por referencias específicas ver: calsequestrina (Wang et al., 1998), DUF1687 (Jung et al., 2005), ERp29 (Liepinsh et al., 2001), HyaE (Dubini and Sargent, 2003) y SH3BGR (Nardini et al., 2004).

datos. Sin embargo, la identificación de todos los dominios de proteína con plegamiento Trx presentes en el genoma de *T. brucei* es un trabajo que requiere una implementación técnica que escapa a esta Tesis ya que, considerando que el genoma de este organismo codifica para ~9000 proteínas (Berriman et al., 2005; Mohan et al., 2008), el número esperado de proteínas con plegamiento Trx oscila entre 45 y 100, según diferentes estimaciones (Fomenko and Gladyshev, 2012; Wolf et al., 1999). Afortunadamente, Gladyshev y colaboradores desarrollaron varios procedimientos bioinformáticos que permiten identificar masivamente “oxidoreductasas dependientes de tioles” (Fomenko and Gladyshev, 2002, 2012; Fomenko et al., 2007, 2008; Marino and Gladyshev, 2009, 2010), en base a las siguientes consideraciones : *i*) todas las oxidoreductasas dependientes de tioles poseen al menos un sitio activo con secuencia CxxC/S (Fomenko and Gladyshev, 2002); *ii*) las cisteínas son residuos que presentan una fuerte conservación tanto a nivel de secuencia como en su posición en la estructura proteica y, en el caso particular de las oxidoreductasas dependientes de tioles, la estructura secundaria en torno al sitio activo CxxC/S está particularmente conservada (Marino and Gladyshev, 2010, 2011), permitiendo el filtrado de resultados espurios derivados de la alta frecuencia y conservación que tiene el motivo CxxC “no redox” en proteínas de unión a metales (Fomenko et al., 2008; Marino and Gladyshev, 2009); y *iii*) debido a que la selenocisteína (Sec) es un residuo exclusivamente catalítico (Mariotti et al., 2012), cualquier Cys conservada que alineé con un residuo de Sec en alguna proteína homóloga es considerada como perteneciente a un sitio activo redox (Fomenko et al., 2007). Este conjunto de criterios permitió a los autores realizar búsquedas a nivel genómico en 740 especies de bacterias, 82 de arqueas y 56 eucariotas, generando listas curadas y no redundantes de proteínas que cumplieran con todas estas características. Al conjunto de proteína identificadas para cada organismo los autores lo denominaron “tioredoxoma” (Fomenko and Gladyshev, 2012). Si consideramos que ~50% de las oxidoreductasas dependientes de tioles poseen uno o más dominios con plegamiento Trx (Atkinson and Babbitt, 2009b) y que todas las Grx poseen plegamiento Trx y residuos conservados en sitios activos “tipo redox”, es de esperar que todas las Grx de *T. brucei* integren el “tioredoxoma” reportado por estos autores. Más aún, como veremos a continuación, la ausencia de algunas de las Grx identificadas por BLAST en esta lista puede aportar información sobre su conservación.

El “tioredoxoma” de *T. brucei* incluye 42 secuencias<sup>40</sup>, la mayoría anotadas adecuadamente. En concordancia con lo planteado, las siete secuencias de Grx mencionadas más arriba integran esta lista, pero no las dos restantes identificadas en este trabajo, probablemente debido a que se trata de proteínas no conservadas a lo largo de la escala evolutiva<sup>41</sup> (ver más adelante). Para analizar la relación entre las Grx y otras proteínas con plegamiento Trx presentes en *T. brucei* fue necesario discriminar cuales secuencias de esta lista correspondían a proteínas que compartan total o parcialmente dicho arreglo estructural. Para ello cada una de estas secuencias fue sometida a análisis de predicción de dominios y

---

<sup>40</sup> <http://gladyshevlab.org/THIOREDOXOME/EUK/51.html>

<sup>41</sup> Al no tratarse de secuencias conservadas es poco probable que existan secuencias homologas con Sec en posiciones de Cys conservadas, lo cual determina que estas secuencias sean filtradas durante el proceso de curado automático de la lista de candidatos (Fomenko and Gladyshev, 2012; Fomenko et al., 2007).

estructura secundaria con los programas PROSITE, SMART y PSI-PRED (McGuffin et al., 2000), lo cual arrojó como resultado que solo 29 de ellas cumplían dicho requisito (no mostrado). En consecuencia, la integración de la información obtenida a partir de estos dos procedimientos nos permitió generar un atlas *parcial* de 30 proteínas con sitios activos asociados a actividad oxidoreductasa y plegamiento Trx. Somos conscientes de que es probable que algunas proteínas con plegamiento Trx existentes en el genoma de *T. brucei* no hayan sido identificadas en este estudio y que existen procedimientos especializados para realizar la búsqueda que, en este caso, se realizó de manera manual. Sin embargo, confiamos en que los resultados obtenidos son representativos y, como se verá en la próxima sección, nos permitieron obtener conclusiones relevantes a los efectos de esta Tesis.

En la Figura 2.1 se muestra la relación de identidad de secuencia (dendrograma) de los dominios con plegamiento Trx obtenidos para *T. brucei* por el procedimiento mencionado anteriormente, así como el alineamiento de la región central del dominio Trx. El alineamiento se realizó con Clustal Omega (Sievers et al., 2011) usando los parámetros incluidos por defecto, disponible a través del servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), el cual utiliza un algoritmo propio para el cálculo de distancias para la generación del dendrograma (Blackshields et al., 2010), representado gráficamente con el programa iTOL ((Letunic and Bork, 2011), <http://itol.embl.de/index.shtml>). Es importante destacar que el alineamiento se realizó con las regiones de la secuencia predicha como dominio con plegamiento Trx y no con la secuencia completa de cada proteína. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito en trabajos previos y permite reducir el “ruido” que puede otorgar el alineamiento de secuencias extra-dominio que son, en algunos casos, sustancialmente más largas que el dominio a analizar (Atkinson and Babbitt, 2009a, 2009b; Limor-Waisberg et al., 2013; Liu et al., 2013a, 2013b). A la hora de comparar secuencias, en este trabajo nos basamos en los conceptos de *identidad* y *similitud* según (Rost, 1999)<sup>42</sup> donde se define la *identidad* entre dos secuencias como el porcentaje de conservación de residuos *idénticos* en las posiciones del alineamiento y la *similitud* como el porcentaje de conservación de residuos con propiedades fisicoquímicas equivalentes en las posiciones del alineamiento. Si bien la identidad es un hecho, la similitud depende de la escala de comparación usada, que en nuestro caso deriva de la matriz de similitud reportada en (Gribskov et al., 1987). Si bien un alto nivel de identidad y similitud entre dos secuencias no necesariamente asegura relación estructural, la literatura indica que en ~95% de los pares donde la *identidad de secuencias* es mayor al 30% y la *similitud de secuencia* es mayor al 50%, es muy probable que haya *similitud estructural* (Kosloff and Kolodny, 2008; Rost, 1999).

El largo promedio de los dominios con plegamiento Trx identificados en *T. brucei* por esta metodología es de  $129 \pm 23$  aminoácidos, por encima del valor promedio para el dominio de plegamiento Trx presente en Grx (~100 aminoácidos). Esto se explica porque los dominios Trx presentes en Trx, TXN y PDI poseen elementos de estructura secundaria adicionales respecto del plegamiento Trx mínimo presente en Grx, que son normalmente una hélice  $\alpha$  y una hebra  $\beta$  en posición aminoterminal (Collet and Messens,

---

<sup>42</sup> [http://www.rostlab.org/papers/1999\\_twilight/paper.html#change\\_ide](http://www.rostlab.org/papers/1999_twilight/paper.html#change_ide).

2010; Deponte, 2013). Con la excepción de algunas PDI y la 1-C-Grx3 (ver más adelante), todas las secuencias identificadas poseen un único dominio con plegamiento Trx, si bien cerca del 50% de ellas contienen elementos estructurales adicionales ubicados, preferencialmente, carboxiloterminales respecto del dominio con plegamiento Trx (no mostrado). En la Figura 2.1 se puede ver que las diferentes secuencias con plegamiento Trx presentes en *T. brucei* se agrupan en conjuntos identificados con una cierta función biológica y, con algunas excepciones, todas las secuencias han sido adecuadamente anotadas y sobre varias de ellas se posee información experimental, que será resumida muy brevemente en la próxima sección. Sin embargo, la información estructural disponible sobre las mismas es escasa y está restringida a unos pocos representantes de 5 de las 12 familias de proteínas que componen este atlas –probablemente parcial– de proteínas con plegamiento Trx en *T. brucei* (Figura 2.2). Más aún, sobre las restantes familias y particularmente sobre las glutarredoxinas –que son el foco de este trabajo– la información estructural disponible proviene mayoritariamente de eucariotas superiores o bacterias (ver Figura 5.1 más adelante), limitando nuestra capacidad de comprensión sobre aspectos evolutivos de la estructura en esta familia dentro del heterogéneo grupo de los protozoarios.

## 2.2. Las “tiorredoxinas” y proteínas relacionadas

Las primeras 13 secuencias presentadas en la Figura 2.1 poseen alguna o varias de las características distintivas de tiorredoxinas clásicas, como ser el residuo de triptófano inmediatamente anterior al sitio activo y la presencia de una prolina conservada cinco residuos en dirección carboxiloterminales, además de un residuo de prolina estrictamente conservado en el *cis*-Pro *loop*, generalmente en un motivo “PT” (Collet and Messens, 2010) (ver Introducción). Dentro de ellas, el grupo más grande lo constituyen las PDI, las cuales usualmente contienen dos o más dominios con plegamiento Trx. Sólo el 2.8 % del total de proteínas de la superfamilia Trx posee dos o más dominios con plegamiento Trx en el mismo polipéptido y se trata principalmente de las PDI (Atkinson and Babbitt, 2009b). Solo dos PDI han sido caracterizadas en *T. brucei* y fueron anotadas como PDI1 (secuencia 3 en Figura 2.1) y PDI2 (secuencias 2 y 8), ambas localizadas en la vía secretoria y ninguna de ellas esencial para la forma infectiva del parásito (Rubotham et al., 2005; Schwartz et al., 2013). PDI1 es un caso particular ya que se trata de una PDI monodominio con actividad oxidoreductasa, equivalente a una Trx, solo que conserva varios motivos de secuencia propios de las PDI (Rubotham et al., 2005). Las restantes PDI no habían sido identificadas previamente y en este trabajo las denominamos PDI3, 4 y 5 (ver leyenda de la Figura 2.1). A excepción de las secuencias 7 y 8, las restantes PDI poseen un motivo de sitio activo canónico PWCGHC y el segundo residuo de prolina conservado cinco lugares río abajo del sitio activo y dentro de la hélice que posee al mismo en su extremo aminoterminales (no mostrado). La secuencia 7 es ortóloga a la proteína Q4DV70 de *T. cruzi*, para la cual no se conoce su función biológica más si su estructura (PDB ID 3H79) (dos Santos et al., 2009). A diferencia de lo que sucede en Q4DV70, cuyo sitio activo es SRHS y no podría participar en reacciones

redox, la proteína de *T. brucei* posee un sitio activo SRHC y es ortóloga a otras anotadas como “posibles PDI” (no mostrado). La secuencia del dominio Trx de la flavoproteína QSOX (secuencia 9 en Figura 2.1) está estrechamente relacionado a las PDI (Limor-Waisberg et al., 2013), lo cual recapitula su rol en la formación de disulfuros a expensas de oxígeno en la vía secretoria. Mientras que en otros eucariotas esta proteína posee más de un dominio con plegamiento Trx (ej. Erp29), en *T. brucei* se trata de una proteína no esencial con un único dominio Trx (Figura 2.2) (Alon et al., 2012; Alsford et al., 2011; Kodali and Thorpe, 2010). La única información que disponemos sobre la secuencia que aparece en la posición 14 (TriTryp ID Tb10.389.1880) es que se trata de una proteína de sitio activo CIPC con una remota identidad a proteína tipo PDI (no mostrado), conservada entre tripanosomátidos y de localización mitocondrial (Panigrahi et al., 2009; <http://tritrypdb.org/tritrypdb>).

La Trx presente en *T. brucei* (secuencia 11, sitio activo WCGPC) posee la particularidad de ser reducida por T(SH)<sub>2</sub> (Schmidt and Krauth-Siegel, 2003) pero no es indispensable para el organismo (Schmidt et al., 2002). Como se ve en la Figura 2.1, la prolina ubicada a continuación del sitio activo no está presente ni en la proteína de *T. brucei* ni en proteínas ortólogas de otros kinetoplastidos (no mostrado) a pesar de lo cual el “kink” en la hélice  $\alpha_2$  se conserva (Friemann et al., 2003), en coincidencia con estudios previos en mutantes de Trx (Chakrabarti et al., 1999; Rudresh et al., 2002)<sup>43</sup>. Estrechamente emparentada a la Trx se encuentra el dominio aminoterminal de la glutarredoxina monotiólica 3 (1-C-Grx3, secuencia 10 (Comini et al., 2008)) sobre el cual volveremos más adelante. Las TXN (sitio activo WCPPC) están relacionadas a las Trx y poseen las marcas de secuencia propias de esta familia. Como se indicó en la Introducción, el genoma de *T. brucei* posee 3 genes que codifican para triparredoxinas: TXN1 (secuencia 12 en Figura 2.1) es la oxidoreductasa citosólica por excelencia y esencial para la forma infectiva del parásito (Comini et al., 2007). Su estructura se muestra en la Figura 2.2 (Alphey et al., 2003). La TXN2 (secuencia 13), es una isoforma de función redox no definida que posee una extensión carboxilo terminal que, al menos en *Leishmania infantum*, oficia de ancla en la membrana mitocondrial externa (Castro et al., 2010). El gen restante (Tb927.3.3780) presenta una mutación silenciosa en la posición 435 y produce exactamente la misma proteína que TXN1, por lo cual no se considera como un producto aparte. Es interesante destacar que ambas TXN poseen el residuo de isoleucina inmediatamente anterior a la *cis*-Pro (Figura B1), propuesto como esencial para la modulación de las propiedades redox en la Trx de *Escherichia coli* (Ren et al., 2009), mientras que el mismo está ausente en la Trx y el dominio Trx de 1-C-Grx3 (ver más adelante).

---

<sup>43</sup> La prolina ubicada en posición +6 luego del sitio activo e indicada en la secuencia 11 de la Figura 2.1, si bien puede ser puntualmente responsable del “kink” en la hélice  $\alpha_2$  en la estructura de *TbTrx*, no está conservada siquiera en proteínas ortólogas de tripanosomátidos (no mostrado).

### 2.3. Peroxidasas dependientes de tripanotión y proteínas de unión a ADN con plegamiento Trx

Entre las secuencias 15 y 22 se concentran un conjunto de proteínas con sitios activos muy distantes del motivo CxxC/S, incluyendo las peroxidasas dependientes de tripanotión TXNPx y Px, así como dos proteínas identificadas como "ATP-binding protein". Tanto las peroxidasas del tipo glutatión peroxidasa (Px, secuencias 15-18) como las peroxirredoxinas (TXNPx, secuencias 21 y 22) se diferencian del resto de las secuencias en que no poseen un sitio activo completo ni conservan la *cis*-Pro, la cual es generalmente sustituida por residuos básicos esenciales para la catálisis (Figura 2.1) (Copley et al., 2004; Dekker et al., 2011). Se trata de proteínas bien caracterizadas que no serán tratadas en este trabajo (por referencias ver (Alphey et al., 2000, 2008; Budde et al., 2003; Diechtierow and Krauth-Siegel, 2011; Melchers et al., 2008; Tetaud et al., 2001)). Solamente destacaremos que las Px de tripanosomátidos poseen un mecanismo catalítico diferente del propuesto para las proteínas de otros organismos dependiente de residuos de lisina conservados (Melchers et al., 2008; Toppo et al., 2009), indicados en la Figura 2.1. La secuencia 15 codifica para una Px aún no caracterizada (Tb927.11.15920) conservada en tripanosomas pero no en las diferentes especies de *Leishmania* (no mostrado). Las secuencias 19 y 20 poseen un 28% de identidad entre ellas y representan proteínas aún no caracterizadas con similitud para fosducinas, una familia de proteínas que posee un dominio N-terminal con plegamiento Trx y sitio activo incompleto asociada a la regulación de la señalización mediada por proteína G y conservada en todos los eucariotas (Dekker et al., 2011). Tanto en mamíferos como en varios eucariotas "inferiores" como *Plasmodium berghei* (Putonti et al., 2013) o *Dictyostelium discoideum* (Blaauw et al., 2003) esta familia está integrada por tres miembros. *T. brucei* no es la excepción y el tercer miembro (NCBI ID XP\_828568) presenta menor identidad de secuencia y fue identificado luego de realizado los análisis mediante una búsqueda específica por lo cual no se incluye en la Figura 2.1.

### 2.4. El heterogéneo grupo de las glutarredoxinas

El objetivo de este trabajo fue la elucidación de las características bioquímicas, estructurales y biológicas distintivas de las Grx de tripanosomas y su relación funcional con el metabolismo del hierro y el sistema tripanotión. En términos prácticos, restringimos nuestro trabajo fundamentalmente a la glutarredoxina monotiólica 1 (*Tb1-C-Grx1*) (Manta et al., 2013; Sardi et al., 2013), si bien durante el desarrollo de la Tesis tomamos contacto con los otros cuatro miembros de la familia que se habían identificado en los trabajos originales (Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). Como se introdujo en el capítulo anterior, las Grx son proteínas diversas y polifuncionales y, si bien algunos elementos de su secuencia y su plegamiento nos dan una sensación de "familiaridad", las Grx son el miembro más enigmático dentro de las proteínas redox con plegamiento Trx (Alves et al., 2009; Couturier et al., 2009; Donner, 2012; Vilella et al., 2004). En la actualidad el término "glutarredoxina" se utiliza de manera genérica para diverso grupos de proteínas, algunas caracterizadas por poseer una actividad catalítica *in vitro* y otras solo por

poseer cierta homología de secuencia con proteínas anotadas como Grx. A su vez, la diferenciación entre Grx y Trx no es trivial ya que estas últimas también poseen una gran variedad de sitios activos y arreglos estructurales, especial -pero no exclusivamente- en los organismos fotosintéticos (Chibani et al., 2009; Garg et al., 2010; Lemaire, 2004; Meyer et al., 2006). Esto determina importantes problemas en la anotación de secuencias derivadas de proyectos de genómica, incorporando ruido a la clasificación de estas familias. Ni siquiera a nivel biológico es fácil separar Trx de Grx ya que la especificidad por sustrato no puede ser usada como criterio definitorio (Draculic et al., 2000; Meyer et al., 1999; Prinz et al., 1997), ni tampoco la especificidad por reacciones dependientes de GSH, ya que las Grx que catalizan estas reacciones son -probablemente- unos de los grupos menos abundantes (Deponete, 2013).

En este contexto, los resultados mostrados en la Figura 2.1 nos enfrentaron a una situación compleja. Identificamos cuatro nuevas secuencias con plegamiento Trx (secuencias 23-26) que se agrupan en la zona del dendrograma donde se ubican las Grx. La secuencia de los sitios activos (putativos) no las relaciona a las Trx o PDI presentes en este organismo y el único residuo de prolina que conservan es la *cis*-Pro, de distribución universal en las proteínas con plegamiento Trx. Sumado a ello, los dominios con plegamiento Trx presentes en estas proteínas son ~20 residuos más cortos que los presentes en las tiorredoxinas propiamente dichas o PDI. Los dominios Grx de las glutarredoxinas monotiólicas ya conocidas (secuencias 29-31) forman un agrupamiento compacto donde sobresale la estrecha relación entre el dominio Grx de 1-C-Grx2 y 1-C-Grx3. Las dos glutarredoxinas ditiólicas, por su parte, forman un grupo próximo a las monotiólicas, si bien 2-C-Grx2 posee características que la diferencian de otras Grx ditiólicas (Ceylan et al., 2010). Las secuencias 23 y 24, previamente identificadas en (Ströher and Millar, 2012) como "glutarredoxinas" presentan una importante homología con proteínas de la familia GST/mPGES-2 (ver más adelante), ubicada entre los eucariotas y con función asociada a la síntesis de prostanoides, por lo cual las denominamos provisoriamente GST1 y GST2. Por último, las secuencias 25 y 26 no presentan homólogos evidentes fuera de los kinetoplastidos y no habían sido previamente identificadas por lo cual las denominamos KSRP1 y KSRP2 por "Kinetoplast Specific Redoxin-like Protein", como se explicará a continuación. En consecuencia, a partir de este trabajo consideramos que la "familia Grx" en *T. brucei* -y seguramente en otros tripanosomátidos- estaría integrada por al menos *nueve* miembros, algunos más "clásicos" que otros. Si bien actualmente solo se posee información biológica sobre unas pocas de estas proteínas, hay una importante cantidad de evidencias proteómica y transcriptómica indicando que todas ellas se expresan y, más aún, en algunos casos la proteína parece ser importante para la viabilidad de la forma infectiva del parásito o su diferenciación. Esta información, así como las referencias adecuadas, se resumen en la Figura 2.3, a la cual volveremos a lo largo de este trabajo.

En la Figura 2.4 se muestra la distribución de dominios así como el alineamiento completo de estas nueve secuencias y su comparación con las secuencias de Trx y TXN de *T. brucei*. Esta figura permite distinguir ciertas características que definen a este conjunto de proteínas "tipo Grx" presente en *T. brucei*. La primera observación evidente es que se trata de un grupo muy diverso en tamaño, composición,

secuencia de sitio activo y organización de dominios. Si bien el número de secuencias es bajo, representa bien la realidad de esta familia que se organiza en 92 arquitecturas distintas, siendo la disposición de "dominio simple" como la que poseen 1-C-Grx2 o 2-C-Grx1 una de las menos frecuentes. La región identificada como dominio Grx tiene una longitud relativamente uniforme de ~100 aminoácidos, si bien una de las secuencias (KSRP2) presenta solo una fracción del mismo (ver a continuación). La conservación de secuencia dentro del dominio Grx es relativamente baja (Figura 2.5) pero es sustancialmente inferior entre las secuencias extra-dominio (no mostrado), indicando que los elementos estructurales asociados en cada caso son muy diversos y no relacionados entre sí. A pesar de compartir clasificación, no todas las secuencias tienen el sitio activo clásico de Grx con ambas cisteínas (ej. las 1-C-Grx y las KSRP). Este resultado coincide con el análisis de secuencia de todos los dominios Grx presentes en la clasificación PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00462>) (Figura 1.14) en donde, si bien el motivo considerado "canónico" para el sitio activo de Grx es CP/GxC, aproximadamente la mitad de las secuencias no poseen una de las cisteínas, siendo prácticamente igual de frecuente la ausencia de la primera (sustituida generalmente por Y o F) como de la segunda (sustituida casi universalmente por serina).

Otro aspecto destacable de esta familia de proteínas es que seis de las nueve secuencias poseen al menos un residuo de cisteína "extra sitio activo" dentro del dominio Grx, siendo la 2-C-Grx2, GST2 y KSRP2 las excepciones (Figura 2.4). Si bien la posición de este residuo de cisteína no está conservada entre ellas, sí lo está a nivel evolutivo en secuencias ortólogas (no mostrado). Finalmente, dentro de las secuencias que representan a proteínas monodominio, sobresalen la de 2-C-Grx1 y 2 que, junto con KSRP1, presentan una inserción conservada en una ubicación que -en función de modelos estructurales no mostrados- corresponde al *loop* inmediatamente anterior a la hélice $\alpha$ 3, una de las pocas regiones donde las estructuras de Trx permiten inserciones largas (Figura 1.15). Dentro de las proteínas de mayor largo, solamente la 1-C-Grx3 (Filser et al., 2008) posee un sitio activo "redox" identificable fuera del dominio Grx (WCEPC), el cual corresponde al dominio Trx de la fusión aminoterminal. Esta característica, conservada en tripanosomátidos (ver Figura 2.8, más adelante), constituyen una señal distintiva de estas proteínas ya que los ortólogos presentes en otros organismos poseen un sitio activo WAEPC (Haunhorst et al., 2010; Pujol-Carrion et al., 2006). En la Figura 2.4 se puede ver que cuatro de las nueve secuencias poseen péptidos de potencial localización mitocondrial (MTS, de "mitochondrial targeting sequence") y una de ellas (GST1) una posible región transmembrana, en coincidencia con su homología a proteínas tipo mPGES-2 (Yamada et al., 2005). Como se explica en el Capítulo 8 (correspondiente a la sección Materiales y Métodos), la predicción de MTS en proteínas de tripanosomátidos es difícil y, si bien ha sido abordada por varios autores (Zhang et al., 2010), no está aún resuelta a nivel computacional. En consecuencia, la localización subcelular de cada proteína no puede ser considerada como segura hasta no ser determinada experimentalmente, lo cual ha sido realizado sólo para *Tb*1-C-Grx1 (Comini et al., 2008), *Tb*1-C-Grx2 (este trabajo, ver Capítulo 6), *Tc*1-C-Grx1 y *Tc*1-C-Grx2 (Fleitas, no publicado) y las Grx ditiólicas (Ceylan et al., 2010). Esto se puede ejemplificar con el caso de la UMSBP, una proteína implicada

en la replicación del ADN mitocondrial comentada en la Introducción (Figura 1.13), de localización estrictamente mitocondrial en la cual no se identifica una señal de importación (Abu-Elneel et al., 2001).

## 2.5. Conservación filogenética de glutarredoxinas de tripanosomátidos

Para tener una visión más general de las secuencias tipo Grx de tripanosomátidos y su relación con otras Grx bien caracterizadas realizamos una búsqueda de secuencias homólogas en toda la rama de eucariotas presentada en la Figura 1.1, incluyendo además tres organismos procariontes relevantes para este trabajo que son el bacilo gram-positivo *Bacillus anthracis*, la actinobacteria *Mycobacterium tuberculosis* y el bacilo gram-negativo *E. coli*, por motivos que explicaremos a continuación. Aplicando la herramienta PSI-BLAST (Boratyn et al., 2013) se interrogaron las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) o GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) de los organismos listados en la Figura 2.6 con cada una de las secuencias de Grx de la Figura 2.4. En algunos casos fue necesario recurrir a información no publicada accesible a través de los autores (ver detalles en leyenda). Antes de continuar quisiéramos destacar que, si bien esta aproximación es habitual en la literatura no especializada (por ej. ver (Limor-Waisberg et al., 2013; Putonti et al., 2013)), somos conscientes de que no es la más adecuada para identificar homólogos de proteínas entre organismos lejanamente emparentados o en familias con muy baja identidad de secuencia y que lo correcto sería aplicar otras técnicas más sensibles que escapaban al alcance y magnitud que se concibió inicialmente para esta parte del trabajo (Fomenko et al., 2007; Madera and Gough, 2002; Meng and Babbitt, 2011; Tang and Altman, 2011; Wang et al., 2004). En consecuencia, los resultados fueron analizados caso a caso mediante alineamientos considerando los criterios configurados por defecto como válidos ("e-value") y criterios *ad hoc* que requirieron inspección manual como ser: *i*) largo de la proteína codificada; *ii*) localización subcelular predicha, cuando correspondiera; *iii*) secuencia del sitio activo y *iv*) sintenia, cuando fuera esperable (por ej. dentro de los tripanosomátidos). En este marco, los resultados presentados en la Figura 2.6 fueron analizados meticulosamente caso a caso para obtener el mayor grado de confianza posible en las relaciones evolutivas a partir de nuestros datos.

El análisis de los resultados obtenidos reveló aspectos muy interesantes sobre las Grx en general, entre los que sobresalen algunos puntos que se comentan a continuación. Las plantas (representadas por *A. thaliana* y *Populus trichocarpa*) contienen casi todas las variantes de Grx identificadas en tripanosomátidos, con la probable excepción de las KSRP (Figura 2.7, más adelante), si bien la gran diversidad de genes para Grx y Trx que poseen estos organismos dificulta la asignación específica de ortólogos para cada Grx (Chibani et al., 2009; Garg et al., 2010; Lemaire, 2004; Meyer et al., 2006). Interesantemente, no hay ninguna secuencia homóloga a las Grx de *T. brucei* en los procariontes *B. anthracis* y *M. tuberculosis*. Estos organismos, a diferencia de *E. coli*, poseen un metabolismo redox basado en glucotioles (BSH y MSH respectivamente, Figura 1.10) y no en GSH. En un principio se

consideró que la función “glutarredoxina” en estos organismos era subrogada por proteínas de la familia de las nucleorredoxinas (NrdH), las cuales poseen plegamiento Trx y sitio activo WCPCP (Funato and Miki, 2007; Gustafsson et al., 2012). Sin embargo, las NrdH están relacionadas a las tiorredoxinas propiamente dichas y como tales son reducidas por la tiorredoxina reductasa y no directamente por tioles de bajo peso molecular (Van Laer et al., 2013; Rabinovitch et al., 2010; Stehr et al., 2001). Recientemente se propuso que en bacilos la función Grx podría recaer en proteínas de sitio activo CxC como la YphP (Chi et al., 2011; Derewenda et al., 2009) mientras que en micobacterias las encargadas serían las micorredoxinas, de sitio activo WCGYC (Van Laer et al., 2012). Ninguna de estas dos familias de proteínas son ortólogas a las Grx (no mostrado), confirmando la ausencia de proteínas homólogas a las Grx de *T. brucei* en estos procariotas y, más aun, poniendo de manifiesto por primera vez la ausencia de Grx propiamente dichas en estos organismos. La bacteria gram-negativa *E. coli*, por su parte, si posee Grx “clásicas” de sitio activo CPYC (Grx1 y 3, (Fernandes and Holmgren, 2004)) quizás ortólogas a *Tb2-C-Grx1* y una Grx monotiólica (Grx4, (Fernandes et al., 2005)) relacionada a *Tb1-C-Grx2*.

Con la excepción de los protozoarios parásitos amitocondriados *E. histolytica* y *T. vaginalis*<sup>44</sup> (Figura 1.1), todos los eucariotas poseen secuencias de Grx monotiólicas que podemos considerar ortólogas a 1-C-Grx2 y a 2-C-Grx1<sup>45</sup>. La excepción en este grupo lo constituyen *Giardia spp.* que posee una única Grx monotiólica de localización mitocondrial con una larga extensión aminoterminal (Rada et al., 2009) que consideramos probablemente relacionada a *Tb1-C-Grx2*, pero ninguna Grx ditiólica. *P. falciparum*, por su parte, posee una Grx “clásica” y 3 monotiólicas (Deponete et al., 2005; Rahlfs et al., 2001), si bien una de ellas parece fusionada a un dominio helicoidal tipo GST (no mostrado). El caso de los organismos del género *Leishmania* es interesante ya que las 1-C-Grx2 que poseen presentan un sitio activo muy poco común (CRFT) y no son sinténicas con *Tb1-C-Grx2* (ver Figura 3.6 en el próximo capítulo). Todos los eucariotas poseen, además, una o más secuencias homólogas a 1-C-Grx3, si bien en plantas generalmente se trata de proteínas de 3 o más dominios Grx y no dos como es en tripanosomas y eucariotas no metazoarios (Haunhorst et al., 2010; Hoffmann et al., 2011). El o los dominios Grx presentes en estas proteínas están estrechamente emparentado al dominio Grx presente en la Grx monotiólica de sitio CGF(S/T) presente en el mismo organismo. Las características más notable de las 1-C-Grx3 presente en *T. brucei* y otros kinetoplastidos son: *i*) el sitio activo del dominio Trx está completo (WCEPC, Figura 2.8) lo cual no se conserva en ninguno de los restantes organismos presentados en la Figura 2.6 y *ii*) algunos residuos claves en la unión de GSH están ausentes en el motivo Grx, al igual que lo están en 1-C-Grx2 (ver Figura 3.6 en el próximo capítulo). Si bien no se comentará en este trabajo, durante el curso de esta Tesis se acumularon resultados que indican que *Tb1-C-Grx3* es capaz de coordinar centros ferrosulfurados a expensas de GSH o tioles específicos del parásito y que, adicionalmente, presenta

---

<sup>44</sup> Esto ya había sido notado por Rada y colaboradores (Rada et al., 2009), si bien es llamativo ya que el organismo emparentado de vida libre *Acanthamoeba castellanii* posee siete genes que codifican para glutaredoxinas (no mostrado).

<sup>45</sup> Si bien es un tema muy poco estudiado, Sagemark y colaboradores sugieren que las Grx ditiólicas “clásicas” presentes en hongos (ej. *ScGrx1* y 2) no son ortólogas a las Grx ditiólicas de clase I de mamíferos como la Grx1 y 2 (Sagemark et al., 2007).

actividad redox que se puede atribuir al dominio Trx ( (Manta, Bonilla, Comini, no publicado). Sumado a ello, el grupo del Dr. Massimo Bellanda generó un modelo estructural preliminar basado en resonancia magnética nuclear y dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) que constituye la primera estructura completa de una Grx multidominio (no publicado).

Generalmente se ha planteado que los tripanosomátidos carecen de secuencias para GST, si bien dicha "actividad" se detectó en proteínas no relacionadas como ser factores de elongación en *T. brucei* (Vickers and Fairlamb, 2004; Vickers et al., 2004), proteínas de resistencia a drogas en *Leishmania spp.* (TDR1, (Denton et al., 2004; Fyfe et al., 2012)) o proteínas de secreción en *T. cruzi* (Tc52, (Garzón et al., 2003)). Sin embargo, las secuencias nombradas como GST1 y GST2 en este trabajo poseen homólogos distribuidos prácticamente en todos los eucariotas (Figura 2.6) y están claramente relacionadas a la prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> sintasa de mamíferos (mPGES-2, (Oakley, 2011; Takusagawa, 2013; Yamada et al., 2005)), emparentadas tanto con GST solubles como con las MAPEG, también conocidas como "GST de membrana" (Bresell et al., 2005; Deponete, 2013; Jakobsson et al., 1999). En mamíferos, estas proteínas participan en la vía de síntesis de prostanoïdes catalizando la isomerización de PGH<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> en una reacción que depende de GSH como cofactor "no redox" y de un motivo "CxxC" tipo Grx (Takusagawa, 2013). Se trata de una proteína asociada a membrana a través de su región aminoterminal, la cual está parcialmente conservada en GST1 (no mostrado). Es interesante destacar que un estudio reciente encontró a GST1 dentro de la matriz del flagelo, un compartimento al cual acceden solo algunas proteínas del parásito y de manera estrechamente regulada (Oberholzer et al., 2011). En resumen, es concluyente que *T. brucei* codifica para proteínas de la familia de las GST similares a mPGES2, si bien no podemos asegurar que se trate de proteínas ortólogas a las presentes en *T. brucei* ya que la identidad de secuencia dentro de la familia de las GST no es suficiente para la identificación del grupo (Atkinson and Babbitt, 2009a; Oakley, 2011). Por ejemplo, la Grx2 de *E. coli* posee un importante nivel de identidad con proteínas de la familia GST (Xia et al., 2001) y aparece en la Figura 2.6 como relacionada a GST1, siendo el único caso en procariotas.

Las otras secuencias nuevas fueron denominadas KSRP porque no encontramos ortólogos *con alto nivel de confianza* fuera del grupo de los kinetoplástidos, con la excepción de algunas secuencias de muy baja identidad (<13%) en eucariotas "superiores" (ver a continuación). Los dominios con plegamiento Trx presentes en KSRP1 y KSRP2 están relacionados al dominio "SH3-binding glutamic acid-rich protein" (PFAM: SH3BGR) que tiene similitud con la Grx1 de *E. coli* (Mazzocco et al., 2001, 2002; Nardini et al., 2004). Sin embargo, los dominios SH3BGR no poseen ninguna de las Cys del sitio activo<sup>46</sup> mientras que la segunda cisteína está presente y conservada en las KSRP de tripanosomátidos (Figura 2.7), lo que nos llevó a clasificar estas proteínas como posibles miembros de la familia de las Grx. Al realizar una búsqueda no restringida en NCBI con los dominio Grx presentes en estas proteínas se recuperan cientos de secuencias con bajo nivel de identidad, la mayoría anotadas como glutaredoxinas, incluyendo algunas caracterizadas como la GrxS14 de *A. thaliana* (ver Figura 3.5 en próximo capítulo) o Grx7 en *S.*

<sup>46</sup> <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF04908#tabview=tab4>

*cerevisiae* (Mesecke et al., 2008a, 2008b). En coincidencia, el modelo estructural de KSRP1 muestra que el dominio identificado como Grx posee una estructura (predicha) equivalente a otras Grx, con el residuo de cisteína conservado en posición equivalente al segundo residuo de cisteína del motivo CxxC en Grx (Figura 2.7). La referencia a los "kinetoplástidos" en el nombre se eligió porque tanto KSRP1 como KSRP2 poseen ortólogos claramente identificable en *Bodo saltans*, pero no en *E. gracillis*, *Diplonema papillatum*, ni en la ameba de vida libre *Naegleria gruberi* (Figura 2.6), el organismo más lejano a los tripanosomas dentro del grupo monofilético conocido como JEH (proveniente de "Jakobids, Euglenozoa and Heterolobosea") que incluye a todos estos organismos (Fritz-Laylin et al., 2010)<sup>47</sup>. En coincidencia, la posición de las secuencias de KSRP1 y KSRP2 en los árboles de la Figura 2.7 muestra una escasa relación de estas secuencias con las demás proteínas identificadas como relacionadas por homología.

En conclusión, como se puede ver en la Figura 2.6, en este trabajo proponemos que 1-C-Grx1 es una Grx conservada entre kinetoplástidos y algunos organismos fotosintéticos, mientras que 1-C-Grx2 es probablemente ortóloga de las Grx de clase II bien conocidas como ScGrx5 o AtGrxS14 (ver próximo capítulo). Esto tiene importantes consecuencias para el resto del trabajo y resalta la necesidad de profundizar en el análisis bioquímico, biológico y estructural de esta proteína que presenta propiedades únicas en términos de secuencia y conservación.

---

<sup>47</sup> *N. gruberi* pertenece al grupo Heterolobosea, el más lejano posible dentro del grupo monofilético Discricistata que contiene a esta especie y los tripanosomas, indicando que cualquier secuencia compartida entre ellos deriva, muy probablemente, del último ancestro común de la rama (Fritz-Laylin et al., 2010).

## **Capítulo 3**

# **Propiedades y conservación de las 1-C-Grx1 en tripanosomas**

### 3.1. Distribución de dominios en la secuencia de 1-C-Grx1 de tripanosomas

La secuencia depositada para el gen de 1-C-Grx1 de *T. brucei brucei* consta de 642 pares de bases y codificaría para un producto de 213 amino ácidos con un peso molecular teórico de 23.9 kDa (Gene ID 3659872, (Berriman et al., 2005)). Sin embargo, mediante análisis de ADN copia, Filser y colaboradores (Filser et al., 2008) demostraron que la transcripción de *Tb1-C-Grx1* se inicia en el tercer codón ATG (triplete número 13) de esta secuencia, lo cual da lugar a un polipéptido de 184 aminoácidos (Acc. Num. CAF02300) con una evidente señal de importación mitocondrial en el extremo aminotermial (residuos 1-42; (Filser et al., 2008)). La compartimentalización de *Tb1-C-Grx1* fue confirmada experimentalmente para ambas formas del parásito en trabajos previos (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). El procesamiento postraduccional del péptido de localización mitocondrial (MTS) determinaba que el peso molecular detectado para la forma nativa de la *Tb1-C-Grx1* fuera de ~16 kDa, coincidente con el estimado para la especie madura (residuos 42-184), pero sustancialmente más grande que el esperado para una Grx clásica de (10-12 kDa). Si bien los trabajos anteriores notaron esta diferencia (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008), los mismos nunca indagaron acerca de las características distintivas de los distintos elementos presentes en las secuencias de 1-C-Grx1 ni su vinculación filogenética con otras 1-C-Grxs.

Con este fin, y explotando el uso de herramientas bioinformáticas, procedimos a caracterizar cada uno de los segmentos que componen la secuencia aminoacídica de 1-C-Grx1 de tripanosomátidos, con especial énfasis en la proteína de *T. brucei*. Un primer análisis reconoce en *Tb1-C-Grx1* tres regiones bien diferenciadas, ya presentadas en el capítulo anterior (Figura 2.4): *i*) un péptido de localización mitocondrial (residuos 1-41), *ii*) el dominio Grx (residuos 77-184) y *iii*) una región aminoterminal contenida entre el MTS y el dominio Grx, no conservada en otras Grx y que denominamos NTE (por “N-terminal extensión”, residuos 42-76). Luego realizamos una búsqueda por homología de secuencias usando Delta-BLAST y la secuencia de la proteína *Tb1-C-Grx1* madura (NTE + dominio Grx) como sonda. Se obtienen cientos de secuencias relacionadas a *Tb1-C-Grx1* a través de esta búsqueda, si bien las únicas que presentan buen índice de alineamiento (“e-value”) son proteínas que pertenecen a tripanosomátidos (ver a continuación) y secuencias de Grx de organismos fotosintéticos del subgrupo GrxS14-S17, sobre las que volveremos al final de este capítulo. Si restringimos la búsqueda a organismos de la familia *Tripanosomatidae* se recuperan solo 36 secuencias con niveles de similitud por encima del límite dispuesto por defecto (e-value  $\leq$  0,005) las cuales fueron analizadas individualmente con predictores de localización subcelular y algoritmos de análisis de dominios, como se describe en el Capítulo 8. Solo 9 secuencias<sup>48</sup> (25%) corresponden a ortólogos de *Tb1-C-Grx1*, ya que las restantes

---

<sup>48</sup> Dada la identidad de secuencia del MTS de *T. congolense* 1-C-Grx1 (CCD12136, Figura 3.1) con *T. b. brucei* 1-C-Grx1 consideramos la segunda metionina como el sitio de inicio de la traducción. Por su parte, debido a la baja identidad y la escasa información de transcriptómica disponible para *Leishmania spp.* (Rastrojo et al., 2013) no editamos estas secuencias. En la cepa CL Brener de *T. cruzi*, por su parte, hay dos secuencias que codifican para proteínas 97% idénticas con solo cuatro variantes a nivel de proteína madura (XP\_818148 y XP\_807837, sustituciones L34P, M36L, V94A, E185G respectivamente) por lo cual consideramos solo una de ellas para nuestros estudios. Por último, la secuencia de 1-C-Grx1 de la cepa Tulahen 2 de *T. cruzi* (Fleitas, Manta et al, no publicado) no fue incluida ya que aún no se encuentra depositada en GenBank.

corresponden a proteínas relacionadas a *Tb1-C-Grx2* o *Tb1-C-Grx3* (no mostrado). Si bien el número de secuencias es bajo para realizar un análisis con validez estadística, en las mismas están representadas todas las especies de tripanosomátidos para los cuales existe información total o parcial de sus genomas (ver Figura 1.1). En la Figura 3.1 se presenta el alineamiento de las mismas así como su comparación con glutarredoxinas monotiólicas homólogas de otros organismos eucariotas y procariontes, cuya relación evolutiva con tripanosomátidos se describe en la Figura 2.6 del capítulo anterior. Estos resultados nos permiten obtener algunas conclusiones *cualitativas* sobre aspectos conservados de las secuencias que son muy relevantes comprender mejor los análisis bioquímicos y estructurales mostrados en los próximos capítulos.

Considerando las proteínas ortólogas a *Tb1-C-Grx1* (secuencias 1-10) se puede observar que todas presentan la organización en 3 regiones (MTS, NTE y dominio Grx) descrita anteriormente (Figura 2.4). Tanto la secuencia que precede al dominio Grx como ciertos residuos y elementos estructurales de este último -discutidos más adelante en esta sección- constituyen sellos distintivos de las 1-C-Grxs de tripanosomátidos (Manta et al., 2013b). Con la excepción obvia de la secuencia de *E. coli* (secuencia 22 en Figura 3.1), todas las Grx de la figura presentan un MTS y una cierta extensión aminoterminal previo al comienzo del dominio Grx, si bien únicamente las secuencias de 1-C-Grx provenientes de euglenidos (tripanosomátidos, *B. saltans* y *E. gracilis*) y de organismos del reino vegetal (*P. trichocarpa* y *A. thaliana*) poseen una región NTE con algunas características similares a la presente en *Tb1-C-Grx1*. Dentro de las secuencias provenientes de organismos eucariotas un caso excepcional es la Grx de *N. gruberi* (secuencia 14 Figura 3.1) la cual carece de señal de localización mitocondrial o región NTE.

### **3.2. Características de la secuencia de localización mitocondrial**

Las secuencias de localización mitocondrial son la clave de acceso de proteínas codificadas en el genoma nuclear hacia un organelo de origen bacteriano y las características de esta señal están relacionadas a la maquinaria encargada de su reconocimiento, importación y procesamiento (Mach et al., 2013). Las secuencias MTS de las proteínas mitocondriales de organismos del filo *Euglenozoa* han sido recientemente analizadas desde el punto de vista evolutivo y presentan algunas características destacables. Si bien son muy variables en largo (5-118 aminoácidos), en el extremo aminoterminal generalmente hay un motivo conservado (M/L)RR seguido de una corta región con aminoácidos hidrofóbicos (Krnáčová et al., 2012; Mach et al., 2013). Recientemente, Cavalier-Smith (Cavalier-Smith, 2012) propuso que la alta conservación del extremo inicial del MTS en tripanosomas y su patrón de residuos hidrofóbicos está relacionado a un mecanismo primitivo de importación de proteínas a la mitocondria presente en la rama "excavata", de divergencia temprana, y distinto del que poseen los "neoeucariotas" (clados "Amorphea" y "Diaphoretickes", Figura 1.1). Con algunas excepciones como ser la proteína Tim17 (Singha et al., 2008), la mayoría de las proteínas involucradas en la maquinaria eucariota de importación de proteínas a la mitocondria no está presente en tripanosomas, siendo la

ausencia de Tom40 lo más llamativo (Pusnik et al., 2009). En coincidencia con ello, recientemente se demostró que la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria de tripanosomas depende de una proteína llamada ATOM (por “archaic translocase of the outer mitochondrial membrane”), evolutivamente relacionada a la permeasa bacteriana Omp85 (Pusnik et al., 2011)<sup>49</sup> y que representa una reminiscencia del último ancestro común de los eucariotas, reforzando la idea que los tripanosomas constituyen la rama más primitiva y divergente de los eucariotas (Cavalier-Smith, 2012).

En la Figura 3.1 se puede ver que las secuencias del MTS de las 1-C-Grx1 de tripanosomátidos son de largo relativamente conservado (38-42 residuos) y que todas poseen los elementos de secuencia comentados más arriba propios de los euglénidos (Krnáčová et al., 2012; Mach et al., 2013). Si bien el número de secuencias no permite realizar conclusiones con validez de predicción, se puede ver que los primeros residuos en el MTS difieren en función del grupo, siendo los residuos M(R/Q) la secuencia inicial presente en tripanosomas africanos, MK en tripanosoma americano y ML en *Leishmania spp.* En este último caso, dado que existe un segundo residuo de metionina conservado en una posición cercana dentro del MTS podría pensarse en la existencia de un sitio alternativo de inicio de la transcripción pero, por el momento, la información de transcriptómica disponible para estos organismos es muy escasa (Rastrojo et al., 2013). En la Figura 3.2 se puede observar el logo de secuencia de los MTS de las 1-C-Grx1 de tripanosomátidos, en donde es evidente que algunos residuos hidrofóbicos y básicos son muy conservados y que los MTS de estas proteínas no presentan residuos ácidos. Estas características concuerdan con las derivadas de un reciente análisis de cientos de MTS de *T. brucei* (Mach et al., 2013). Tal como era previsible, esta conservación de posiciones se pierde si consideramos los MTS del resto de las secuencias no tripanosomatídeas (Figura 3.2).

### **3.3. Región intrínsecamente desordenada en el extremo aminoterminal de Tb1-C-Grx1**

Tb1-C-Grx1 posee una extensión aminoterminal que se conserva en la proteína madura (Comini et al., 2008), pero su posible rol no había sido abordado hasta este trabajo (Manta et al., 2013c). Es interesante destacar que esto parece ser habitual en tripanosomas, donde se encuentran varias proteínas conservadas que difieren de las presentes en otros eucariotas por poseer una extensión aminoterminal (Nilsson et al., 2010)<sup>50</sup>. Como se puede ver en la Figura 3.1, todas las proteínas ortólogas a Tb1-C-Grx1

---

<sup>49</sup> Como se comentó en la Introducción, la evolución de los eucariotas es un tema en intenso debate y donde los protozoarios y, particularmente los tripanosomas, están jugando un rol central (Adl et al., 2012). La maquinaria de importación mitocondrial de proteínas es un pieza clave para ubicar la raíz evolutiva de los eucariotas (Cavalier-Smith, 2012) y, en consecuencia, algunos autores sugieren que ATOM es una versión distante pero evolutivamente relacionada a Tom40 y VDAC (“voltaje-dependiente anion channel”), el canal de importación de proteínas localizado en la membrana mitocondrial externa de la inmensa mayoría de los eucariotas (Zarsky et al., 2012), mientras que otros sustentan el origen bacteriano de ATOM (Harsman et al., 2012), reforzando la idea de que los tripanosomas divergieron de los demás eucariotas antes de la evolución del sistema Tom/Tim.

<sup>50</sup> Los casos caracterizados *in vitro*, además de la propia Tb1-C-Grx1 (Manta et al., 2013c), son el de la ciclofilina A (Pellé et al., 2002), S-adenosilmetionina decarboxilasa (Velez et al., 2013), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Igoillo-

presentan una región NTE con características similares en largo y secuencia, siendo las secuencias presentes en tripanosomas africanos más cortas que las presentes en *Leishmania spp.* y *T. cruzi*. A su vez, como se comentó anteriormente, es posible identificar -al menos parcialmente- tramos del NTE de *Tb1-C-Grx1* en las secuencias correspondientes de *B. saltans* y *E. gracilis*, en particular el tramo central en torno a las dos prolinas conservadas así como en secuencias homólogas de plantas (Figura 3.1). Si analizamos mediante un logo estas secuencias (Figura 3.3.A) es evidente que hay posiciones muy conservadas, más allá que este resultado esté sesgado por el peso relativo de la mayor cantidad de secuencias de tripanosomátidos.

La secuencia del NTE en tripanosomátidos es tan conservada que, al realizar una búsqueda irrestricta con la misma solo se recuperan por encima del valor de corte las mismas secuencias de tripanosomas que aparecen en la Figura 3.1 (no mostrado). Incluso si se reordenan aleatoriamente los 37 aminoácidos que conforman este péptido y se repite la búsqueda no se recupera ninguna secuencia con identidad por encima de ese valor (no mostrado). Sin embargo, si se toman dos fragmentos del NTE por separado (antes y después de la P<sub>59</sub>, por ejemplo) y se repite la búsqueda con ambas mitades se recuperan las mismas secuencias ya comentadas más algunas secuencias de plantas lejanamente relacionadas que están anotadas como glutarredoxinas (GrxS15, ver más adelante). Por otro lado, el logo de la Figura 3.3.A permite distinguir dos regiones bien diferenciadas que, a *grosso modo*, se ubican a cada lado del motivo conservado THP<sub>59</sub>DFQP<sub>63</sub>R (numeración correspondiente a *Tb1-C-Grx1*). La primera mitad es de largo variable (15-25 residuos) y baja conservación entre las diferentes especies de tripanosomátidos, mientras que la segunda mitad es de largo más homogéneo (18-20 residuos) y más conservada. Por otro lado, al analizar su propensión a formar estructuras secundarias o regiones desordenadas (usando el NTE de *Tb1-C-Grx1* como ejemplo) detectamos que la primera parte del NTE no presenta tendencia a formar una estructura secundaria regular, mientras que la segunda mitad sí, resultados confirmados mediante el uso de varios algoritmos de predicción basados en diferentes estrategias (ver Capítulo 8) y resumidos en la Figura 3.3.B.

Estos resultados sugieren que la región aminoterminal se encuentra desplegada en condiciones nativas. Las proteínas intrínsecamente desplegadas (IDP) o regiones intrínsecamente desplegadas (IDR) se conocen desde hace décadas (Uversky, 2013), si bien han cobrado relevancia en los últimos años a raíz del descubrimiento de que varias enfermedades humanas son causadas por la agregación o el plegamiento incorrecto de proteínas IDP (para una revisión, ver (Tompa, 2011)). Si bien la mayoría de las proteínas globulares presentan una región de baja complejidad estructural, ya sean *loops* flexibles o extremos móviles (Mohan et al., 2008; Pancsa and Tompa, 2012), las IDR propiamente dichas se diferencian por propiedades de secuencia y conformacionales que son, en general, predecibles por métodos bioinformáticos (Tompa). La región NTE de *1-C-Grx1* posee una importante densidad de residuos ácidos que contribuyen a conferirle un punto isoeléctrico (pI) muy bajo (~3,5) y una carga neta

---

Esteve and Cazzulo, 2006; Ortíz et al., 2011), adenilato quinasa (Pullen et al., 2004), quinasa crk3 (Grant et al., 1998), la subunidad de polimerasa RPA2 (Daniels et al., 2012) y la peptidil-prolil cis/trans isomerasa (Erben et al., 2010).

(calculada) de -7 a pH fisiológico, así como una muy baja hidrofobicidad, lo que son todas propiedades típicas de las regiones intrínsecamente desplegadas (Uversky, 2013). Las IDR tienden a ser flexibles y poseer una gran diversidad conformacional, lo cual explica porqué ninguno de los programas utilizados para predecir una posible estructura tridimensional del NTE de *Tb1-C-Grx1* otorgó resultados confiables (Figura 3.3.C). Es interesante destacar que existen reportes que indican que los protozoarios parásitos y, en particular, los tripanosomátidos presentan una frecuencia relativa de IDR en sus proteomas mayor a la media en eucariotas (Mohan et al., 2008; Pancsa and Tompa, 2012; Schad et al., 2011). Esto va acompañado de una desviación en la composición aminoacídica promedio de sus proteínas, con algunas diferencias notables respecto de eucariotas metazoarios como ser la disminución y aumento, respectivamente, de la proporción de W y K en proteínas de protozoarios (Mohan et al., 2008). En conclusión, la región NTE es una característica exclusiva de la 1-C-Grx1 de tripanosomátidos, organismos estrechamente emparentados (Figura 3.1) y, probablemente, en glutaredoxinas *monotiólicas* de localización *mitocondrial* presentes en organismos *fotosintéticos* (ver a continuación). La región NTE presenta propiedades de secuencia propias de una IDR y, como veremos en el Capítulo 4, los resultados experimentales obtenidos apoyan la idea de que se trata de una región de la proteína que no adopta una estructura secundaria regular y que influyen en las propiedades globales de la proteína afectando aspectos como su comportamiento hidrodinámico o su capacidad para coordinar centros ferrosulfurados. No obstante, aún desconocemos las bases estructurales de esta conexión así como su función biológica (si la tiene), las cuales son exploradas en el Capítulo 5.

### **3.4. Características de la secuencia del dominio Grx de *Tb1-C-Grx1***

El dominio Grx es fácilmente identificable y está contenido entre los residuos 79 y 181 de *Tb1-C-Grx1*. Su longitud es la habitual para los dominios Grx (103 aminoácidos) y se clasifica como clase II según la clasificación presentada en la Figura 1.14, en base a (Ströher and Millar, 2012). Sin embargo, su asignación a clase I o II no es trivial ya que presenta algunos elementos de secuencia relacionados a las Grx de clase I (ver a continuación). Al analizar la región correspondiente a los dominios Grx en la Figura 3.1 es evidente la elevada identidad de secuencia entre todos ellos y, muy particularmente, entre los dominios Grx de las proteínas de tripanosomátidos, lo cual queda de manifiesto en el logo de la Figura 3.4. No sorprende, por lo tanto, que para el mismo juego de proteínas la identidad de secuencia dentro del dominio Grx ( $85 \pm 8\%$ ) sea mayor que a nivel del NTE ( $67 \pm 15\%$ ), lo cual puede asociarse a que las regiones IDR generalmente presentan una mayor tolerancia a las mutaciones (Chemes et al., 2012).

El segundo resultado evidente es que el sitio activo en estas proteínas posee la secuencia consenso CA(F/Y)S, lo cual la distingue de cualquier otra Grx caracterizada a la fecha (Figura 3.1). En *Tb1-C-Grx1* la segunda posición del sitio activo es ocupada por una alanina, mientras que en Grx de clase I esta posición posee mayoritariamente un residuo de prolina y en Grx de clase II un residuo de glicina (Figura 1.14). La presencia de A en el segundo lugar del sitio activo puede considerarse, por lo tanto, una señal

distintiva de esta familia de glutaredoxinas monotiólicas de tripanosomátidos. Más aún, todas las 1-C-Grx1 de tripanosomas poseen un residuo de metionina inmediatamente antes del sitio activo, patrón conservado únicamente en las Grx de clase III, exclusivas de dicotiledonios (Ströher and Millar, 2012; Ziemann et al., 2009). Como se puede ver en la Figura 3.1 y 3.4, los residuos considerados como relevantes para la unión del GSH en Grx monotiólicas de otros organismos (ej. Grx5 de levadura (Bellí et al., 2002) o Grx4 de *E.coli* (Fernandes et al., 2005; Fladvad et al., 2005)), están presentes en las 1-C-Grx1 de tripanosomátidos, lo cual podría indicar una conservación de función para estos residuos o un rol esencial en la consolidación de la estructura de las Grx (ver Capítulo 5). La inmensa mayoría de la Grx de clase II poseen un segundo residuo de cisteína conservado ubicado ~50 amino ácidos corriente abajo del correspondiente al sitio activo en un motivo GGC (Ströher and Millar, 2012), mientras que en las Grx de clase I la conservación es más difusa y depende de los organismos que se comparen (ver Figura 4.5 en próximo capítulo). Las proteínas de tripanosomátidos presentan nuevamente dificultades para su clasificación ya que la posición correspondiente a la segunda cisteína conservada en Grx de clase II es ocupada por un residuo hidrofóbico (Leu158) en *Tb1-C-Grx1* y por una serina en las Grx de plantas que presentan mayor identidad con *Tb1-C-Grx1* (GrxS15). A su vez, el motivo GGC típico de Grx de clase II solo se conserva en la 2-C-Grx1, el único representante prototípico de Grx de clase I presente en *T. brucei* (Figura 2.4). Sin embargo, *Tb1-C-Grx1* si posee un segundo residuo de cisteína de el cual aparece en el extremo carboxiloterminale del dominio Grx (C181), en una posición no conservada respecto a Grx de clase I o II (no mostrado) y solo conservada entre tripanosomas africanos (Figura 3.1). El rol de este residuo de cisteína externo al sitio activo en *Tb1-C-Grx1* es aún desconocido, si bien tiene un profundo efecto en la reactividad de esta proteína con oxidantes y en la proliferación de la forma infectiva de *T. brucei*, como veremos en los Capítulos 4 y 5, respectivamente.

Uno de los objetivos centrales de este trabajo fue la obtención de estructuras de las 1-C-Grxs de *T. brucei* y *T. cruzi*. Sobre este punto comenzamos a trabajar tempranamente y nuestra primera aproximación fue la cristalografía (ver Capítulo 5). Mientras se realizaban los primeros experimentos de cristalografía recurrimos a modelos computacionales de baja complejidad para la predicción de la estructura terciaria de *Tb1-C-Grx1*. En la actualidad existen decenas de servidores que permiten el cálculo *de novo* de estructuras de proteínas y varias propiedades de los mismos son evaluadas bianualmente por la comunidad científica especializada (CASP, "Critical Assessment of protein Structure Prediction")<sup>51</sup>. El servidor I-TASSER (Roy et al., 2010, 2012; Zhang, 2008) ha quedado posicionado en el primer lugar en la generación de modelos estructurales *de novo* en los últimos 5 análisis CASP, por lo cual optamos por su uso para la generación de modelos estructurales de *Tb1-C-Grx1* y *Tc1-C-Grx1*, así como en otras proteínas de interés que se comentarán a lo largo de este trabajo. El modelo estructural obtenido para *Tb1-C-Grx1* (Figura 3.4.B) muestra claramente una distribución de estructuras secundarias propia del plegamiento Trx, con el sitio activo ubicado previo a la hélice  $\alpha 2$ . No entraremos en mucho detalle sobre estos modelos ya que más adelante se presentará un modelo estructural de *Tb1-C-Grx1* en base a resultado de

---

<sup>51</sup> <http://predictioncenter.org/index.cgi>.

resonancia magnética nuclear (RMN) (Manta et al., 2013c). Sin embargo, hay tres resultados que merecen ser destacados: *i*) a diferencia de las predicciones basadas solo en secuencia, la segunda cisteína (Cys181) no está incluida en el dominio Grx sino en la extensión desordenada que sigue a la última hélice ( $\alpha 5$ ) y *ii*) si bien la predicción del dominio Grx indicaba que el mismo comienza en K79, en el modelo estructural los tres residuos previos a K79 son predichos con alto nivel de confianza como parte de la hélice  $\alpha 4$ , lo que nos lleva a considerar que el dominio Grx como tal comienza, como mínimo, en la M76 o A75, lo que fue considerado a la hora de construir una versión trunca de la proteína sin el NTE (ver próximo capítulo) y *iii*) las variaciones en el sitio activo respecto de Grx monotiólicas con sitio activo CGFS o CPYC ubican residuos en la superficie de la proteína con potencial para generar nuevas interacciones, ya sea hidrofóbicas (A105) o por puentes de hidrógeno (Y106) con GSH (ver Capítulo 5).

### 3.5. Conservación de propiedades entre *Tb1-C-Grx1* y glutaredoxinas de organismos fotosintéticos

Finalmente, en esta sección nos interesó explorar la relación entre *Tb1-C-Grx1* y las Grx de plantas ya que se ha propuesto que existe una conexión evolutiva entre los tripanosomátidos y el reino vegetal (Hannaert et al., 2003). Las plantas (*Embryophita*, Figura 1.1) poseen más de 30 genes para Grx (Couturier et al., 2009; Garg et al., 2010; Lemaire, 2004; Meyer et al., 2009; Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2004), si bien la gran mayoría pertenecen a la clase III (sitio activo CCXC/S), ausente en otros eucariotas (Ziemann et al., 2009) y solo 4 son Grx monotiólicas de clase II (GrxS14-S17 (Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2004)). En la Figura 3.5 se muestra el dendrograma de las Grx de *Arabidopsis thaliana* y la ubicación de *Tb1-C-Grx1* dentro del mismo, obtenida en base a alineamientos de secuencia y construcción de árboles de distancias (ver leyenda por detalles). Como era esperable, la proteína de *T. brucei* se agrupa junto a las Grx S14-S17 y en una posición particularmente cercana (en secuencia) a GrxS16 y S15. Si bien estas proteínas comparten el sitio activo CGFS, difieren en varios aspectos (Bandyopadhyay et al., 2008). Las GrxS14 y S15 son proteínas relativamente chicas (~170 aminoácidos) y con un único dominio Grx de clase II. GrxS14 se localiza en cloroplastos, es capaz de unir centros ferrosulfurados *in vitro* (Bandyopadhyay et al., 2008; Picciocchi et al., 2007; Wang et al., 2012) y de transferirlos rápida y estequiométricamente hacia proteínas que están río abajo en la maquinaria de biogénesis (Mapolelo et al., 2013). A su vez, la sobreexpresión de GrxS14 en la mitocondria de *S. cerevisiae* recupera el fenotipo respiratorio del mutante  $\Delta grx5$  de levadura<sup>52</sup>, indicando una función equivalente a ScGrx5 (Bandyopadhyay et al., 2008). Esto puede deberse, al menos en parte, a que ambas proteínas (AtGrxS14 y ScGrx5) presentan una importante identidad de secuencia (45%) y estructural (PDB ID 3IPZ y 3GX8, respectivamente) con una desviación cuadrática media de sus estructuras (rmsd) de 1.3 Å (ver Capítulo

<sup>52</sup> El mutante  $\Delta grx5$  es incapaz de crecer en el medio de cultivo usado para forzar su respiración aeróbica probablemente porque se torna auxótrofo para los aminoácidos lisina, leucina y ácido glutámico, los cuales requieren enzimas mitocondrial con centros ferrosulfurados para su biosíntesis (Rodríguez-Manzanique et al., 2002).

5). A su vez, GrxS14 posee una segunda cisteína en la posición conservada típica de las Grx clase II y que coincide con la presente en ScGrx5 (Ströher and Millar, 2012). GrxS15, por su parte, es mitocondrial, no posee el segundo residuo de cisteína conservado, no es capaz de unir centros ferrosulfurados *in vitro* y su capacidad para recuperar el fenotipo del mutante  $\Delta$  *grx5* es prácticamente nula (Bandyopadhyay et al., 2008)<sup>53</sup>. Las GrxS16 y S17, por su parte, son proteínas multidominio de clase II capaces de coordinar un centro ferrosulfurado *in vitro* (Rouhier, 2010)<sup>54</sup> y de recuperar el fenotipo respiratorio en el mutante de levadura comentado anteriormente (Bandyopadhyay et al., 2008). La GrxS16<sup>55</sup>, no conservada fuera de las plantas, es cloroplástica y posee un dominio aminoterminal con el motivo conservado GIY-YIG que porta actividad nucleasa (Liu et al., 2013), mientras que GrxS17 es ortóloga a ScGrx3 o HsGrx3 si bien posee tres dominios Grx de sitio activo CGFS a continuación del dominio Trx (ver Figura 2.8).

Como se puede ver en la Figura 3.5, *Tb1-C-Grx1* se agrupa junto a GrxS16 de *A. thaliana* ya que los dominios Grx de ambas proteínas poseen 39 y 58 % de identidad y similitud respectivamente, mientras que respecto de GrxS15 estos valores son 34 y 59%. La diferencia entre la secuencia de ambas proteínas es demasiado chica para discriminar efectivamente cual de ambas es ortóloga a *Tb1-C-Grx1*. Sin embargo, GrxS16 es una proteína multidominio de 293 aminoácidos y de localización cloroplástica, mientras que GrxS15 comparte con *Tb1-C-Grx1* ser una proteína monodominio, de localización mitocondrial y sin la segunda cisteína conservada en los dominios Grx de clase II, siendo el único caso dentro de las Grx monotiólicas de plantas. Sumado a esto, ambas proteínas mostraron ser relativamente ineficientes en la recuperación del fenotipo mutante  $\Delta$  *grx5* (Bandyopadhyay et al., 2008; Filser et al., 2008). Por último, como se notó anteriormente (Figura 3.1), ambas proteínas comparten una extensión aminoterminal entre el MTS y el dominio Grx de largo y composición relativamente conservada, el cual, a su vez, está conservado en las secuencias de las demás Grx de plantas disponibles en NCBI (no mostrado). Es interesante destacar que GrxS15 interacciona *in vivo* tanto con tiorredoxinas de ubicación mitocondrial en *Pisum sativum* (Balmer et al., 2004) y *Arabidopsis thaliana* (Yoshida et al., 2013) así como con metales divalentes (Herald et al., 2003), si bien en ningún caso está definido el rol biológico de esta interacción.

---

<sup>53</sup> Cheng y colaboradores (Cheng, 2008) presentaron resultados contradictorios respecto a la ubicación subcelular y función en la recuperación de fenotipo  $\Delta$  *grx5* en levadura de GrxS15 (Grx4 para los autores) sin embargo la literatura actual indica que los resultados presentados en (Bandyopadhyay et al., 2008) son los correctos.

<sup>54</sup> Si bien en (Rouhier, 2010) se indica que GrxS17 puede unir centros ferrosulfurados *in vitro*, no hay evidencia experimental publicada.

<sup>55</sup> *AtGrxS16* también aparece en la literatura como "CAX interacting protein 2" (CXIP2) mientras que *AtGrxS14* recibió originalmente el nombre de "CXIP1". En ambos casos se hace referencia a un posible rol en la regulación de canales de cationes llamados CAX (Cheng and Hirschi, 2003). La nomenclatura completa se indica en la leyenda de la Figura 3.5.

### 3.6. Relación entre *Tb1-C-Grx1* y *Tb1-C-Grx2*

*Tb1-C-Grx1* posee elementos de secuencia que la clasifican como de clase I (sitio activo, cisteínas extras, ausencia del motivo GGC) y otros que la ubican en la clase II (*loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2, motivo WPT en el *cis-Pro loop*). En este trabajo, al igual que en (Ströher and Millar, 2012) consideramos a *Tb1-C-Grx1* como una Grx de clase II, fundamentalmente por aspectos estructurales discutidos en el Capítulo 5 y no tanto por aspectos de secuencia. Las Grx de clase II posee como representantes prototípicos a la *HsGrx5* (Johansson et al., 2010) o *ScGrx5* (Bellí et al., 2002; Wang et al., 2009). Al analizar detalladamente las secuencias de las Grx presentes en tripanosoma (y los modelos estructurales) vemos que *Tb1-C-Grx2* –y no *Tb1-C-Grx1*– es la proteína candidata a ser ortóloga de estas secuencias bien caracterizadas. *Tb1-C-Grx2* fue identificada por Filser y colaboradores (Filser et al., 2008) y mostró ser una proteína muy poco abundante e incapaz de suplir la función de *Tb1-C-Grx1* (Comini et al., 2008). Si bien posee una secuencia de localización mitocondrial tempranamente identificada ((Filser et al., 2008), Figura 2.4), la demostración experimental de su localización subcelular en los dos estadios del parásito fue realizada recién en este trabajo (ver más adelante). Se trata de una proteína poco abordada ya que consideramos, quizás incorrectamente, que no cumple un rol en la mitocondria de la forma infectiva de *T. brucei*. Los principales resultados que nos llevaron a considerar esta hipótesis fue que solo 1-C-Grx1, y no 1-C-Grx2, mostró ser indispensable para la forma infectiva del parásito (Comini et al., 2008) –lo cual coincide con el rol esencial de Grx5 en diferentes organismos (Camaschella et al., 2007; Rodríguez-Manzaneque et al., 2002; Wingert et al., 2005)– y, además, que solo 1-C-Grx1 fue capaz de recuperar mínimamente el fenotipo respiratorio del mutante  $\Delta$ grx5 (Filser et al., 2008). Sin embargo, como discutiremos en el Capítulo 6, esto puede haber sido una sobreinterpretación ya que la biogénesis de centros ferrosulfurados en tripanosomas está poco explorada y, en un principio, son muy pocas las proteínas esenciales en este estadio del parásito que requieren este cofactor (ej. RIL1/ABCE1 (Estévez et al., 2004; Manta et al., 2013a)). A su vez, si bien 1-C-Grx2 no es esencial para BSF, si lo es para la diferenciación a la forma procíclica, donde se requiere una mitocondrial funcional y capaz de generar nuevos centros ferrosulfurados (Figura 2.3, (Alsford et al., 2011)).

Sin embargo, algunas características de 1-C-Grx2 son llamativas y podrían explicar su incapacidad para suplir a *ScGrx5*. Si bien el MTS propio es capaz de dirigir a 1-C-Grx2 hacia la matriz mitocondrial en *S. cerevisiae* (Filser et al., 2008), no suplanta a Grx5 en sus funciones, lo que puede deberse a que la proteína de *T. brucei* posee algunas mutaciones en residuos claves involucrados en la unión de GSH (ver Capítulo 5), en particular las posiciones correspondientes a K52 y R92 en *ScGrx5* que están sustituidas por T y C en *Tb1-C-Grx2* (Figura 3.6.A). Como se comentó en el capítulo anterior, estas sustituciones se conservan en el dominio Grx de *Tb1-C-Grx3*, estrechamente emparentado a esta proteína. Adicionalmente, ninguna de las 1-C-Grx3 y 1-C-Grx2 presentes en tripanosomátidos conserva el residuo de isoleucina inmediatamente previo a la *cis-Pro* (Figura 2.8 y 3.6), el cual sí está conservado en 1-C-Grx1 y proteínas ortólogas (Figura 3.1).

En este escenario y dado la similitud entre 1-C-Grx1 y 1-C-Grx2 (Figura 2.5), podemos considerar que ambas proteínas son *parálogas*. A pesar de la diferencia en el sitio activo, 1-C-Grx1 conserva los residuos claves identificados como importantes para la función en ScGrx5 (Bellí et al., 2002; Tamarit et al., 2003), los cuales no están presentes en 1-C-Grx2, por lo cual aún queda por resolver cual de las dos representa un ortólogo *funcional* de las Grx monotióllicas mitocondrial presentes en la mayoría de los eucariotas. Si bien estos análisis evolutivos escapan a los objetivos de este trabajo, poseen considerable interés para desarrollar en un futuro ya que durante mucho tiempo se consideró que la rama que dio origen a los tripanosomas posee un ancestro común con los organismos fotosintéticos y que solo algunos euglénidos actuales conservan los plástidos (ej. *Euglena gracilis*, Figura 1.1) (Hannaert et al., 2003; Manta et al., 2013a, 2013b). Sin embargo, esta idea fue perdiendo sustento al secuenciarse los genomas de tripanosomátidos e identificarse claramente que la incorporación de plástidos en euglénidos fue un evento de simbiosis secundaria entre un eucariota no fotosintético ancestro de los actuales euglénidos y un eucariota fotosintético relacionado a las algas verdes<sup>56</sup> (Leander, 2004; Simpson et al., 2006) y que la transferencia lateral de genes entre estos eucariotas ha moldeado el genoma de los euglénidos (Maruyama et al., 2011). Más aún, recientemente se identificó y secuenció un organismo parásito de ubicación intermedia entre kinetoplástidos de vida libre como *B. saltans* y tripanosomas parásitos, denominado *Paratrypanosoma confusum* (Flegontov et al., 2013). La comparación de las secuencias de Grx presentes en este organismo, *B. saltans* y tripanosomas sugiere que *Tb1-C-Grx1* es la Grx conservada en toda la rama de los kinetoplástidos mientras que 1-C-Grx2 es un evento de duplicación más reciente asociado a la rama que dio origen a tripanosomas y leishmanias, en donde a su vez ambos sitios activos divergieron (no mostrado).

### **3.7. Conclusiones sobre las propiedades de secuencia de la familia 1-C-Grx1 en tripanosomas y su relación con otras glutarredoxinas**

En consecuencia, el análisis *in silico* llevado a cabo en esta sección nos permitió reconocer elementos de secuencia en 1-C-Grx1 que resultaron extremadamente interesantes desde el punto de vista estructural y evolutivo, sobre los que volveremos al analizar la estructura. En particular se destacan la identificación del NTE así como la estrecha relación entre 1-C-Grx1 y GrxS15. Ambos hallazgos tuvieron un importante efecto en la interpretación de los resultados obtenidos durante este trabajo ya que toda la actividad experimental se realizó bajo la premisa, basada en evidencias experimentales de índole bioquímica y biológica (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008), que indicaban que 1-C-Grx1 de *T. brucei* era una proteína homodimérica capaz de unir centros ferrosulfurados *in vitro* e "*in vivo*" (expresión heteróloga en *E. coli*, ver Capítulo 4) (Comini et al., 2008; Manta et al., 2013c) y que por lo tanto debería cumplir un rol equivalente a ScGrx5. Como mostraremos y discutiremos en las próximas secciones, *Tb1-C-Grx1* presenta

---

<sup>56</sup> Las algas verdes están estrechamente relacionadas a las plantas terrestres y se clasifican en el mismo clado (Diaphoretickes), supergrupo (Archaeplastida) y comparten clasificación hasta la diversificación en Streptophyta, rama que incluye los Embryophita (plantas) y Chlorophyta, rama que incluye a las algas (Adl et al., 2012).

un comportamiento anómalo en cromatografías de exclusión molecular y cumple una función esencial pero aún desconocida en *T. brucei*, siendo que un rol directo de la misma en la biogénesis de centros ferrosulfurados, equivalente a *Sc* o *HsGrx5*, no pudo aún ser verificado.

## **Capítulo 4**

### **Caracterización bioquímica y biofísica de *Tb1-C-Grx1* y versiones mutantes**

## 4.1. Producción y purificación de las proteínas recombinantes

La versión recombinante de *Tb1-C-Grx1* con etiqueta de afinidad (Figura 4.1) ya había sido producida previamente con un alto rendimiento, purificada hasta pureza electroforética por cromatografía de afinidad a metales (IMAC) y parcialmente caracterizada a nivel bioquímico (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). En este trabajo se desarrollaron los vectores para expresar sin etiqueta de afinidad tanto la forma de largo completo (FL) como versiones truncas y/o mutantes de *Tb1-C-Grx1* (ver más adelante). Los detalles relativos a la generación de dichas construcciones no serán abordados en esta sección y se encuentran disponibles en la sección Materiales y Métodos (Capítulo 8) y en los artículos correspondientes (Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Filser et al., 2008; Manta et al., 2013a; Sardi et al., 2013). El clonado y subclonado de la 1-C-Grx1 de *T. cruzi* fue realizado por el autor en colaboración con la Lic. Luciana Fleitas. Esta proteína será referida solo a modo de comparación cuando amerite y no se muestran resultados al respecto ya que los mismos se presentaron previamente en (Fleitas, 2012).

En la mayoría de los experimentos trabajamos con una o más versiones de *Tb1-C-Grx1* expresada sin etiqueta de afinidad, la cual se produce como una proteína de fusión entre la tiorredoxina de *E. coli* (*EcTrx*) y una cierta versión de la 1-C-Grx1 conectados por una extensión en donde se localiza una secuencia de seis histidinas que posibilita la purificación de la proteína recombinante por IMAC y un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp<sup>57</sup>), que permite separar la 1-C-Grx1 de la proteína de fusión (Figura 4.1) (Ceylan et al., 2010; Manta et al., 2013a). Todas las versiones de *Tb1-C-Grx1* sin etiqueta de afinidad ("tag free") fueron producidas de manera recombinante en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* siguiendo un protocolo común detallado en el Capítulo 8. El rendimiento de los cultivos luego de la expresión estuvo en el orden los 8 g de pellet húmedo por litro de cultivo<sup>58</sup>, lo cual indica que la sobreexpresión de las proteínas de fusión no es tóxica para la bacteria. Los pellets celulares fueron lisados para la purificación de la proteína recombinante inmediatamente luego de cosechados o almacenados a -80°C hasta su uso, sin generarse perjuicios en la calidad o cantidad de producto obtenido al final de la purificación.

La estrategia de purificación de las proteínas de fusión recombinantes fue puesta a punto con la fusión de la forma silvestre de largo completo (*Tb1-C-Grx1* FL WT, Figura 4.1). El protocolo desarrollado se aplicó luego a todas las demás versiones de esta proteína (Manta et al., 2013a; Sardi et al., 2013) y de *Tc1-C-Grx1* (Fleitas, 2012), con pequeños ajustes cuando fuera necesario. Es importante destacar que, con la excepción de la etapa de diálisis (ver a continuación), todos los demás pasos de purificación fueron realizados a temperatura ambiente (TA). La lisis y clarificación de los pellets celulares se realizó por sonicado, centrifugación y filtración con membranas de 0.45 o 0.80 µm. La proteína de fusión recombinante representó la especie proteica más abundante de la fracción soluble del lisado bacteriano

---

<sup>57</sup> La TEVp se purificó de acuerdo al protocolo indicado en la sección Materiales y Métodos, obteniendo ~64 mg de proteína pura por litro de cultivo.

<sup>58</sup> Este valor es similar al obtenido para *TbTXN* expresada con el mismo sistema vector/célula y condiciones de cultivo (por ej. ~6 g de pellet húmedo para la fusión Trx-TXN).

(~20% del total de proteínas; fracción "LIS" en Figura 4.2.A y 4.2.E). Dado que las proteínas recombinantes poseen un parche de histidinas, el primer paso de purificación consistió en una IMAC sobre columna de níquel sefarosa (HisTrap® o empacada en el laboratorio). El lisado celular se sembró en la columna equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.8 con 300 mM NaCl (amortiguador A) mediante bomba peristáltica sin resiembra colectando la fracción no unida (fracción "NBF" en Figura 4.2.A) y, generalmente, lavando la columna en una primera instancia con 2-5 volúmenes de columna (CV) de amortiguador A y luego con igual volumen de amortiguador A con 20 mM de imidazol (fracción "W" en Figura 4.2.A). Para la elución de la proteína de fusión se utilizaron dos estrategias: *i*) gradiente lineal de imidazol (20 – 500 mM) en el amortiguador A (Figura 4.2.B) o *ii*) elución directa con imidazol 500 mM en amortiguador A. En cualquier caso, la proteína purificada en esta etapa (fracción "ELU1" en Figura 4.2) y fue sometida a proteólisis con TEVp para liberar a la glutarredoxina de interés de la *EcTrx*. Dado que la etapa posterior a la proteólisis es un segunda paso de IMAC para retener la proteasa y la proteína de fusión (*EcTrx*) -ambas con cola de histidinas- es necesario remover la alta concentración de imidazol presente en el eluido de la primera IMAC, para lo cual se adoptó un método de proteólisis y diálisis en simultáneo. Luego de ajustar el tiempo necesario para la proteólisis y la temperatura a la cual se realizaría (Figura 4.2.C) optamos por realizar la proteólisis durante ~16 hr ("overnight", ON) y 4°C. En estas condiciones, la eficiencia de proteólisis fue superior al 95% (Figura 4.2.C) y no se evidenciaron efectos adversos sobre la estabilidad de la Grx (no mostrado). Previo a la proteólisis, la fracción ELU1 se trató con DTT y EDTA a una concentración final de 5 mM y 2 mM, respectivamente, y luego se agregó la proteasa a una relación de ~1 mg cada 70 mg de proteína de fusión a cortar. El corte se realizó en diálisis contra amortiguador A en membranas de celulosa (MWCO ~ 10 kDa) o benzilcelulosa (MWCO ~ 3 kDa), según correspondiera. Se realizaron tres cambios de amortiguador resultando en un factor de dilución de ~500 veces.

La fracción proteolizada fue filtrada (filtro 0.45 µm) y nuevamente sembrada en la columna de IMAC. La fracción no unida a la resina en esta segunda IMAC contiene mayoritariamente a la glutarredoxina de interés (fracción "FT" en Figura 4.2.E) mientras que tanto la *EcTrx* como la TEVp, al poseer etiqueta de afinidad (Figura 4.1), permanecen retenidas en la columna y son eluidas posteriormente (fracción "ELU2" en Figura 4.2.E). Finalmente, para incrementar la pureza de la proteína recombinante se procedió a un último paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Para ello, la fracción no unida de la segunda IMAC se concentró y cargó en una columna de SEC preparativa previamente equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl (amortiguador B). Generalmente, antes del paso de SEC la proteína fue tratada con 5 mM DTT y quelantes de metales (2 mM EDTA, 0.1 mM DTPA) durante 30 min a TA con el objetivo de homogeneizar la muestra y remover posibles trazas de Ni<sup>2+</sup> contaminante. El pico de elución (Figura 4.2.D) contiene la proteína recombinante de interés con una pureza >95% (fracción "SEC" en Figura 4.2.E).

En resumen, la purificación de todas las versiones no etiquetadas de *Tb* y *Tc1-C-Grx1* se realizó siguiendo la secuencia de cuatro pasos: *i*) IMAC, *ii*) proteólisis en diálisis, *iii*) IMAC, *iv*) SEC, con rendimientos finales

de hasta 70 mg de proteína pura por litro de cultivo para *Tb1-C-Grx1* FL (WT, C104S y C181S), y valores ligeramente superiores para las versiones cortas ( $\Delta 76$ , ver a continuación). En el mismo orden estuvieron los rendimientos obtenidos para las distintas versiones de *Tc1-C-Grx1* (Fleitas, 2012). Como se indica en la sección Materiales y Métodos, para la purificación de la proteína usada en los experimentos de RMN se omitió el paso de SEC final. En este trabajo también se produjeron las versiones de *Tb1-C-Grx1* con etiqueta de afinidad (Figura 4.1) desarrolladas en (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008; Melchers et al., 2007), las cuales fueron empleadas para estudiar principalmente las formas holo generadas “in vivo” (ver más adelante). El procedimiento fue similar al recién descrito solo que se omitió el paso de proteólisis y la segunda IMAC, terminando la purificación con un paso de SEC. El rendimiento de la producción de las diferentes formas de His<sub>6</sub>-*Tb1-C-Grx1* fue inferior al obtenido para las formas sin etiqueta de afinidad (~25 mg/L de cultivo) siendo este fenómeno más marcado en el caso del mutante C181S, cuyo rendimiento fue siempre significativamente menor (~4 mg/L de cultivo).

En todos los casos, la concentración de proteína en las diferentes fracciones fue determinada por el método del ácido bicinónico o espectroscópicamente usando el coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) calculado o determinado (Capítulo 8) y el avance de la purificación analizado por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) usando niveles de entrecruzamiento de entre 12 y 17%, dependiendo del peso molecular (MW)<sup>59</sup> de las proteínas a resolver. Las proteínas purificadas fueron almacenadas generalmente a 2-10 mg/mL a 4°C en amortiguador B con 10% de glicerol y en condiciones de esterilidad hasta 1 mes o directamente a -80°C en iguales condiciones por varios meses. En general, estas condiciones de almacenamiento permiten una buena recuperación de la proteína, excepto por algunos lotes donde se evidencia un fenómeno de (auto)proteólisis<sup>60</sup>.

## 4.2. Generación del mutante trunco “ $\Delta 76$ ”

Como se comentó en el capítulo anterior una de las características más peculiares de *Tb1-C-Grx1* en comparación con otras Grx es la presencia de una extensión aminoterminal conservada en tripanosomátidos (región NTE). Previo al comienzo de este trabajo, Comini y colaboradores analizaron algunas de las propiedades bioquímicas de esta proteína y fue particularmente llamativo su comportamiento en columnas de SEC analíticas donde la proteína madura eluía con un volumen de retención equivalente a una proteína de ~30 kDa (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). En función de

---

<sup>59</sup> En este trabajo seguimos el estilo de usar “peso molecular” para datos obtenidos por técnicas hidrodinámicas y de “masa molecular” en espectrometría de masa, si bien el nombre correcto para la propiedad de la proteína medida en Da sería “masa molecular”.

<sup>60</sup> La proteólisis de la *Tb1-C-Grx1* FL almacenada se observó tanto en la forma producida a partir de la proteína de fusión como en la forma con etiqueta de afinidad y no se observó en las diferentes versiones truncas. Consideramos que se trata de autoproteólisis ya que no logramos detener el proceso con inhibidores de proteasas de ningún tipo. A su vez, si bien realizamos un importante número de estudios al respecto, no logramos determinar con precisión el sitio de corte, si bien los resultados de MS (no mostrado) indican que la región que se pierde inicialmente pertenece a la región carboxiloterminale de la proteína. Este comportamiento no se observó para *Tc1-C-Grx1* (no mostrado).

ello los autores propusieron que *Tb1-C-Grx1* es una proteína homodimérica en su forma apo, propiedad excepcional para Grx y descrita adicionalmente solo para la *ScGrx6* y *7* (Luo et al., 2010; Mesecke et al., 2008)<sup>61</sup>. Al comenzar este trabajo nos resultó evidente atribuirle la capacidad de dimerización de *Tb1-C-Grx1* al NTE, ausente, por ejemplo, en una proteína prototípicamente monomérica como la *1-C-Grx2* (Comini et al., 2008). En virtud de ello, decidimos construir una versión trunca de *Tb1-C-Grx1* en la cual se removieron los primeros 35 aminoácidos de la proteína madura (desde Q<sub>42</sub> hasta A<sub>76</sub>) a la cual llamamos “ $\Delta 76$ ”. La elección de donde generar el corte la tomamos en función del resultado otorgado fundamentalmente por el modelo estructural que indicaba el inicio del dominio globular Grx en M77 (ver Figura 3.4 en capítulo anterior). La versión trunca constituye solamente el dominio Grx de *Tb1-C-Grx1* que incluye la segunda cisteína, C181, y los tres aminoácidos carboxiloterminales extradominio (Figura 4.1). La misma versión trunca se construyó para *Tc1-C-Grx1* (Fleitas, 2012). En nuestra hipótesis de trabajo, esta proteína no debería presentar dimerización.

### 4.3. Caracterización *in vitro* de *Tb1-C-Grx1* FL y $\Delta 76$

Al carecer de actividad enzimática conocida (Filser et al., 2008), todas las versiones de *Tb1-C-Grx1* purificadas fueron sometidas a análisis por SDS-PAGE, espectrometría de masas (MS) y SEC analítica con el objetivo de determinar su pureza, estado oligomérico, comportamiento hidrodinámico y peso molecular exacto (Manta et al., 2011). También se evaluaron espectrofotométricamente para determinar su concentración precisa y el número de tioles libres medible en condiciones no desnaturizantes (no mostrado) por los métodos comentados en la sección correspondiente. En algunos casos se incluyeron medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) y dicroísmo circular (CD) como controles adicionales. En la Figura 4.3 se muestran resultados representativos de los controles de calidad realizados para la *Tb1-C-Grx1* FL WT y *Tb1-C-Grx1*  $\Delta 76$  WT. Es importante destacar que este tipo de caracterización (total o parcialmente) se realizó para todas las proteínas utilizadas en este trabajo luego de su purificación o inmediatamente antes de su uso, incluyendo los mutantes puntuales de cisteína y las formas con etiqueta de afinidad que comentaremos más adelante.

El resultado más evidente de la Figura 4.3 es que ambas formas de *Tb1-C-Grx1* se purifican como proteínas con características espectroscópicas e hidrodinámicas propias de proteínas solubles y plegadas. La pureza electroforética mostrada en la Figura 4.2.D se corresponde con los espectro de masas obtenidos para ambas versiones en MALDI-TOF (Figura 4.3.A) donde se ve que ambas proteínas poseen la masa molecular esperada según secuencia, sin contaminantes evidentes y con una pequeña porción de especies diméricas. La fragmentación trípica de la proteína FL $\Delta 76$  no presenta mayores diferencias en el perfil de péptidos identificados por MS (no mostrado), con la excepción de los

---

<sup>61</sup> Como se comentó en la Introducción, se ha reportado también que *PtGrxC4* (Noguera et al., 2005) y *EcGrx1* (Kelley et al., 1997) presentan equilibrio monómero-dímero pero las medidas fueron determinadas en condiciones de RMN con concentraciones proteicas superiores a 1 mM.

correspondientes a la región NTE (Figura 4.3.B), como era de esperar. Los espectros de CD en el ultravioleta lejano (Figura 4.3.C) corresponden a proteínas bien plegadas del tipo  $\alpha\beta$  y, si bien son parecidos, una comparación más detallada realizada mediante deconvolución indica que ambas formas muestra una proporción de elementos de estructura secundaria similar aunque no idéntica (Figura 4.3.B). Las proporciones obtenidas para la forma trunca son equivalentes, dentro del margen de error de nuestras medidas (~5%) a las esperadas para proteínas con plegamiento Trx (ej. Trx1 de *E. coli*, 0.38, 0.28, 0.15 y 0.19 para  $\alpha$ -hélices, hebras  $\beta$ , codos y regiones desordenadas, respectivamente, citado en (Reutimann et al., 1981)). El espectro de la forma madura, por su parte, es prácticamente idéntico al reportado previamente por Melchers y colaboradores para la forma con etiqueta de afinidad (Melchers et al., 2007). La deconvolución de estos espectros muestra un descenso en la proporción relativa de hélices  $\alpha$  (0.41 vs 0.45) y hebras  $\beta$  (0.15 vs 0.24) en la proteína Tb1-C-Grx1 FL en comparación con la forma  $\Delta 76$ . Esto se puede explicar por la presencia del NTE, que representa ~1/4 del total de la proteína y se mantiene parcialmente desplegado en solución (ver a continuación), determinando un incremento en la proporción de codos y regiones no estructuradas. Los espectros de CD en el ultravioleta cercano (Figura 4.3.D) presentan algunas diferencias en la estructura hiperfina en la región de 270-285 nm, lo que podría evidenciar un entorno diferencial para algunas de las tres tirosinas de la proteína (Y106, Y121 y Y135) (Pain, 2005), si bien los resultados no son de la calidad adecuada para asegurarlo, como se evidencia en el espectro diferencial de la Figura 4.3.D.

El espectro de fluorescencia de la forma  $\Delta 76$  presenta una diferencia importante en la ubicación del centro del masa respecto del espectro de la forma FL (~5 nm más hacia el rojo, Figura 4.3.E), así como en la intensidad total, ya que el área bajo la curva es 37% menor en  $\Delta 76$  respecto a FL, lo que sugeriría que en la forma FL el único Trp de la proteína (W142) podría encontrarse en un entorno menos polar como consecuencia de la región NTE. Como comentaremos más adelante (Capítulo 5) en la estructura que obtuvimos es posible ver que en la forma trunca W142 está completamente expuesto al solvente, en coincidencia con su máximo de emisión de fluorescencia mientras que en la forma FL este residuo parece estar parcialmente cubierto por la región NTE, lo que explicaría su corrimiento hacia el azul y aumento de intensidad. Esta diferencia en la posición del centro de masa e intensidad del espectro entre la forma FL y  $\Delta 76$  se conserva en el rango de pH 5-9 y es reproducible en la proteína ortóloga de *T. cruzi* (no mostrado).

El resultado más llamativo presentado en la Figura 4.3 es la evidente diferencia en el comportamiento hidrodinámico en SEC de la forma madura (FL) y trunca ( $\Delta 76$ ) de Tb1-C-Grx1 (Figura 4.3.F). Si bien ambas formas se diferencian exclusivamente en la presencia o no del NTE, los resultados de SEC muestran que la diferencia en el peso molecular aparente de ambas formas es sustancialmente mayor a los 3.8 kDa que aporta esta región. La forma FL migran en columnas de SEC como una proteína de  $28.6 \pm 2.2$  kDa (n=12), en coincidencia con un radio hidrodinámico ( $r_H$ ) determinado por DLS de  $2.4 \pm 0.3$  nm (n=3)<sup>62</sup>. Sin

---

<sup>62</sup> Estos resultados fueron obtenidos por DLS en batch usando soluciones de proteína en el orden de 0.1 – 1 mg/mL. Somos conscientes de que la técnica de DLS en "batch" no es la indicada para la determinación precisa de pesos

embargo, el peso molecular medido difiere significativamente del valor esperado según su secuencia (16.2 kDa, Figura 4.1) y es más próximo al que se esperaría para una especie dimérica ( $16.2 \times 2 = 32.4$  kDa), en coincidencia con lo reportado previamente (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008). La forma  $\Delta 76$ , por su parte, eluye con un volumen correspondiente a una proteína de  $16.1 \pm 0.2$  kDa ( $n=8$ ), también más grande de lo esperado (12.3 kDa), pero lejano al previsible para una especie dimérica ( $12.3 \times 2 = 24.6$  kDa). Esta diferencia entre el MW medido y esperado puede deberse a varios factores, entre los cuales la *no globularidad* de las proteínas es el más probable. Si bien la calibración de las columnas se realiza con proteínas globulares de peso molecular conocido, el volumen de retención en la columna es proporcional a su radio de Stokes y no a su peso (masa molecular), por lo cual las proteínas que presentan regiones desplegadas pueden observarse en SEC con MW aparentes hasta 30-50% mayores a los esperados por secuencia (Uversky, 2012). En conclusión, una posible interpretación para los resultados presentados en la Figura 4.3.F es considerar que la forma FL es una proteína dimérica, mientras que la forma trunca es monomérica, si bien presenta un comportamiento hidrodinámico relativamente desviado del esperado para una proteína globular. Interesantemente, el comportamiento anormal en SEC fue reportado para otras Grx, como ser *EcGrx4* (Yeung et al., 2011), *PtGrxC1* (Rouhier et al., 2007) y *AtGrxC5* (Couturier et al., 2011), llegando inclusive a reportarse diferencias entre el MW esperado y el medido mayores al 30%, si bien generalmente esto no se discute en los artículos correspondientes. Más aún, Comini y colaboradores reportaron un comportamiento anormal para las formas reducidas y sin etiqueta de afinidad de *Tb1-C-Grx2* y *Tb1-C-Grx3* (Comini et al., 2008). En el caso de la segunda, la no globularidad es entendible si consideramos que la proteína está formada por dos unidades compactas y previsiblemente globulares conectadas por un "linker" (Figura 2.8). Sin embargo, no es el caso de *1-C-Grx2* (Figuras 3.6) para la cual también sería de esperar que se comporte como una proteína globular. La explicación para estos resultados aún no ha sido abordada.

El comportamiento hidrodinámico observado para los mutantes puntuales de cisteína de las formas FL y  $\Delta 76$  sin etiqueta de afinidad fue el mismo al reportado para las formas WT (no mostrado). Las formas con etiqueta de afinidad, por su parte, eluyen de las columnas de SEC con un volumen de retención equivalente a proteínas de  $27.5 \pm 1.5$  kDa ( $n=9$ ) (Manta et al., 2013a), similar a las formas sin etiqueta de afinidad, a pesar de que su peso molecular teórico es mayor (17.2 kDa, Figura 4.1). Estos resultados, sumados a la estricta conservación de la extensión aminoterminal dentro de las proteínas ortólogas en tripanosomátidos y los análisis bioinformáticos indicando que la segunda región del NTE presenta propensión a formar estructuras tipo hélice $\alpha$ , dieron sustento a nuestra hipótesis que le asignaba a la región NTE la capacidad de favorecer la dimerización de *Tb1-C-Grx1*. A su vez, la obtención de resultados equivalentes al estudiar la forma FL $\Delta 76$  de *Tc1-C-Grx1* (Fleitas, 2012) reafirmaron la idea que la dimerización se da por un mecanismo previamente no descrito para Grx que tiene importantes implicancias en la unión de centros ferrosulfurados.

---

moleculares de proteínas pequeñas (Harding, 1994), lo que quedará en evidencia en el Capítulo 5 cuando se presentan resultados de dispersión estática de luz a múltiples ángulos.

#### 4.4. Caracterización *in vitro* de la región aminoterminal de *Tb1-C-Grx1*

Con el objetivo de validar las predicciones sobre conformación de la región NTE en solución y aportar al modelo de dimerización basado en esta región, la misma fue sintetizada en fase sólida y purificada por cromatografía de fase reversa, como se detalla en (Pavan, 2012). El péptido producido contiene los residuos comprendidos entre G49 y A76 (indicado con una línea roja en la Figura 3.3), con los extremos amino y carboxilo modificados por acetilación y amidación, respectivamente. En coincidencia con la presencia de varios residuos cargados ( $pI$  teórico = 3.97) el péptido es soluble tanto en agua como en amortiguadores volátiles o salinos, lo cual nos permitió realizar los experimentos de caracterización mostrados en la Figura 4.4. En una primera instancia, el péptido fue analizado por ESI-MS para determinar su pureza y estado de agregación en condiciones desnaturizantes, obteniéndose una masa isotópica de 3177.4 Da, solo 0.1 Da de diferencia con la masa teórica y una pureza cercana >95% al analizar el perfil de elución por cromatografía en fase reversa acoplada a MS<sup>n</sup> (Figura 4.4.A). El espectro de CD del péptido en amortiguador de pH 7.0 coincide con las predicciones *in silico* (Capítulo 3) y se puede deconvolucionar, aproximadamente, en partes iguales entre el aporte de un componente plegado con estructura secundaria y un componente desplegado (“random coil”, Figura 4.4.B). La proporción relativa de hélices  $\alpha$  vs otras estructuras secundarias es difícil de obtener en ese tipo de espectro, fundamentalmente debido a que las bases de datos de referencia se construyen con espectros de proteínas con conformaciones globulares conocidas y baja proporción de elementos “desplegados” (Sreerama and Woody, 2000). El espectro de CD del péptido no se ve alterado en el rango de pH 5-8 o frente al agregado de metales divalentes como CaCl<sub>2</sub> o MgSO<sub>4</sub> en concentraciones de 1.5 mM. Solo el agregado de trifluoroetanol (TFE) a una alta concentración (50% (v/v)) produce cambios mayores en el espectro del péptido que son indicativos de la adquisición de una conformación helicoidal (Santos et al., 2007). Estos resultados sugieren que la región NTE de *Tb1-C-Grx1* tiene muy poca propensión a formar estructuras secundarias regulares y que se halla mayoritariamente desplegada en solución.

Sobre la hipótesis que la dimerización de *Tb1-C-Grx1* es mediada por la región NTE, lo siguiente que realizamos fue intentar determinar el estado oligomérico del péptido por MS en condiciones nativas. Para lo primero realizamos experimento de MS por MALDI-TOF del péptido directamente en amortiguador B, bajo la hipótesis de que existía una interacción péptido-péptido en solución lo suficientemente fuerte para mantener al mismo en estado dimérico durante la volatilización. Sin embargo, esto no fue así y, si bien pudimos determinar con precisión el perfil de MALDI-TOF del péptido y la fuerte unión de 2 iones sodio al mismo, su estado oligomérico correspondió al del monómero (Figura 4.4.C-D). En segundo lugar analizamos el perfil cromatográfico del péptido aislado en condiciones nativas mediante columna de SEC para péptidos (Superdex Peptide 10/300 GL) la cual fue equilibrada en amortiguador B y calibrada con estándares de peso molecular conocido. Dada la ausencia de residuos aromáticos en el péptido estos cromatogramas fueron registrados a 215 nm siguiendo la absorción del enlace peptídico. Como se puede ver en la Figura 4.4.E, para todos los estándares incluidos (11.8 – 0.30 kDa) el volumen de retención en la columna se relacionó linealmente con el logaritmo de su peso

molecular mientras que el péptido fue retenido en la columna como una especie de ~9200 Da ( $n=2$ ), tres veces el valor esperado en función de su masa teórica y muy cercano al volumen de exclusión ( $V_0$ ) de la columna. Más aún, al realizar el mismo estudio en una columna Superdex 75 5/15 (rango óptimo de resolución 6 – 70 kDa) el valor de peso molecular calculado para el péptido fue de ~14 kDa ( $n=2$ ), aproximadamente 5 veces superior al esperado. Estos resultados confirman la idea de que la región NTE está parcialmente desplegada en solución lo que determina que no sea posible estimar su estado de agregación por SEC, al menos no en base a una calibración mediante proteínas globulares (Uversky, 2012). Sin embargo, este conjunto de resultados aún no nos permite discriminar si el incremento en el peso molecular aparente del péptido en solución responde únicamente a su naturaleza no estructurada, a la formación de un homo-dímero o a una combinación de ambos fenómenos.

Aprovechando el muy bajo volumen de cama de la columna Superdex 75 5/15 (~3 mL) realizamos experimentos de coelución entre el péptido sintético y mezclas con las versiones FL y  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* con el objetivo de analizar la posible interacción del péptido con el dominio globular de la proteína. Los cromatogramas fueron seguidos a 215 nm, donde absorben tanto el péptido como la proteína con un coeficiente de absorptividad molar relacionado linealmente al número de aminoácidos que los componen, y a 280 nm, donde solo absorben la(s) proteína(s). Como se puede ver en la Figura 4.4.F, el perfil cromatográfico de ambas versiones de la proteína fue insensible a la presencia del péptido, sugiriendo que no hay una interacción estable entre el dominio globular y la región NTE. Intrigantemente, la incubación de la proteína FL con el péptido no determinó un cambio en el perfil hidrodinámico de la misma. Dado que nunca evidenciamos un equilibrio entre formas diméricas y monoméricas en los experimentos de SEC de la forma FL (inclusive a concentraciones menores a  $5\mu\text{M}$ , no mostrado) suponemos que estos resultados se explican porque la interacción péptido-péptido que mantiene unida esta forma dimérica es lo suficientemente fuerte para no ser desplazada por el agregado de péptido extra. Por último, una vez obtenida la asignación de los picos en el espectro 2D de  $^{15}\text{N}$ -HSQC de la forma  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* (ver Capítulo 5) se realizó la titulación de la proteína isotópicamente marcada con el péptido hasta una concentración de 10 veces exceso molar de este último en amortiguador 50 mM fosfato de sodio pH 7.0 con 150 mM NaCl y no se evidenció corrimiento significativo en la posición de ninguno de los picos del espectro (Figura 4.4.G) indicando que, al menos en estas condiciones experimental, la región NTE no interacciona con el dominio Grx de *Tb1-C-Grx1*.

#### **4.5. Comportamiento de *Tb1-C-Grx1* en solución: ¿dimerización mediada por la región NTE?**

Considerando a la proteína como una región desplegada más una porción globular, como el modelo presentado en la Figura 3.4, es posible suponer dos mecanismos de dimerización mediados por la región NTE, a saber: *i*) la región NTE puede interactuar consigo misma sin involucrar a la región globular (mecanismo que llamamos *cis*), o *ii*) la región NTE de una subunidad puede interactuar con el dominio

globular de la otra (mecanismo que denominamos *trans*) por ejemplo, en una interacción tipo “cabeza-cola” como la que se da en las 2-Cys-Prx (Hall et al., 2009). En nuestro caso nos inclinamos por el mecanismo en *cis* por los siguientes motivos:

- i) Los análisis bioinformáticos del NTE predicen con alto nivel de confianza que la zona aminoterminal carece de estructura regular mientras que a la porción carboxilterminal se le asigna una conformación helicoidal (Figura 3.3). Los resultados de CD y SEC obtenidos para el péptido sintético de la región central del NTE sustentan las predicciones *in silico* (Figura 4.4).
- ii) La alternancia de residuos que presenta la mitad carboxilterminal de la región NTE (Figura 3.3) es compatible con un modelo de dimerización mediada por un arreglo de tipo “coiled-coil” (no mostrado).
- iii) Si la dimerización estuviera mediada por la interacción del NTE con la región globular, sería de esperar que al resolver en SEC una mezcla equimolar de la forma FL  $\Delta 76$  se observen especies de peso molecular intermedio o, al menos, una variedad mayor de pesos moleculares (adición no lineal). Sin embargo, como se ve en la Figura 4.3.F, ambas formas se comportan como unidades independientes, conservando los volúmenes de retención de las especies aisladas. Este resultado se confirmó en reiterados experimentos tanto con la proteína de *T. brucei* como con la de *T. cruzi*. A su vez, el agregado del péptido sintético a las formas FL o  $\Delta 76$  no alteró sus perfiles de elución (Figura 4.4.F).
- iv) Tampoco se observó corrimiento en los picos del  $^{15}\text{N}$ -HSQC de  $\Delta 76$  por efecto de la adición de hasta 10 veces de exceso molar del péptido (Figura 4.4.G).
- v) El mapeo tríplico de ambas proteínas es idéntico a nivel de la región globular lo cual indicaría una conformación muy parecida para ambas versiones (no mostrado).
- vi) Los únicos dos residuos de cisteína presentes en la proteína están en la región globular (C104 y C181) y son medibles por métodos colorimétricos tanto en la forma FL como  $\Delta 76$  indicando que ninguno de los dos queda ocluido por la formación del dímero (no mostrado). A su vez, la determinación del pKa de ambos residuos para las formas FL y  $\Delta 76$  dio resultados equivalentes, si bien hay una ligera diferencia de reactividad (ver más adelante).

Estos resultados nos indujeron a aceptar la propuesta original presentada en (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008) donde se sugería que *Tb1-C-Grx1* es una proteína dimérica. Adicionalmente, en base a los resultados aquí presentados propusimos que la región NTE media la dimerización a través de una interacción homóloga consigo misma, en un mecanismo previamente no caracterizado para otras Grx. Como veremos más adelante, este modelo nos permitió inclusive explicar resultados a nivel celular, que favorecieron su aceptación. Sin embargo, antes de continuar debemos reconocer que fue una idea incorrecta, como se demostrará luego y que, en perspectiva, pasamos por alto varias evidencias que apoyaban fuertemente otras posibles interpretaciones. Por ejemplo, si la interacción entre subunidades se da a través de una región flexible *externa* al dominio globular, sería de esperar que el dímero se comporte como una unidad de peso molecular *aparente mayor* a la suma de los monómeros (>32 kD), y

no *menor*, como obtuvimos (26 kDa). Sumado a ello, el peso molecular obtenido para la proteína con etiqueta de afinidad es *menor* al obtenido para la forma sin etiqueta, lo cual no contradictorio ya que la primera posee ~1 kDa más por lo cual debería ser, como mínimo, de peso molecular aparente 2 kDa mayor y no menor. A su vez, el tipo de interacción que propusimos para la generación del dímero tiene poco sustento en la literatura. Los homodímeros son ~36% de las estructuras conocidas y, generalmente, la asociación involucra interacciones en superficies conservadas que involucra a una parte importante del área de la proteína (Jones and Thornton, 1996). Si bien hay casos de dimerización a través de extensiones terminales desplegadas en proteína con plegamiento Trx se trata de casos excepcionales (ej. FdxB de *Pseudomonas putida*, (Iwasaki et al., 2011)).

Por último, tampoco reconocimos la posibilidad de que la región NTE, con fuerte propensión a encontrarse intrínsecamente desplegada, fuera capaz de explicar *por sí sola* el comportamiento hidrodinámico anormal de la forma *monomérica* de Tb1-C-Grx1. Durante el desarrollo de esta tesis, los resultados fueron sistemáticamente analizados considerando a Tb1C-Grx1 como una especie dimérica. Sin embargo, mediante la determinación precisa del estado de agregación de la proteína en solución por NMR (Capítulo 5) resultó evidente que Tb1-C-Grx1 es una proteína monomérica tanto en su forma FL como  $\Delta 76$ . Visto en perspectiva, los resultados de MS, SEC y DLS pueden fácilmente ser explicados considerando esta hipótesis sin necesidad de recurrir a la dimerización. En consecuencia, a partir de este punto todos los resultados presentados fueron reanalizados considerando a la proteína como una especie monomérica. Esto nos lleva, incluso, a la necesidad de rever algunas conclusiones ya publicadas por nuestro grupo sobre esta proteína (Comini et al., 2008, 2012; Manta et al., 2013a; Sardi et al., 2013). Finalmente, dado que durante el transcurso de este trabajo se resolvió la estructura del dominio Grx de Tb1-C-Grx1, en las próximas secciones recurriremos a la estructura experimental cuando fuera necesario y no a los modelos *in silico* mostrados en el capítulo anterior. Esto se realiza para que las conclusiones presentadas tengan correlato con la estructura "real" que será introducida en el próximo capítulo.

## **4.6. Oxidación de Tb1CGrx1 y cambios conformacionales asociados**

### **4.6.1. Cisteínas externas al sitio activo en glutarredoxinas**

La Tb1-C-Grx1 es una Grx difícil de clasificar, como se comentó en el capítulo anterior. Si consideramos que pertenece a las Grx de clase I, se trata de un ejemplar extraño ya que no posee actividad redox en ninguno de los ensayos estudiados (Filser et al., 2008) y, si bien posee una cisteína adicional a la del sitio activo (C181), la misma no está conservada en posición respecto a otras Grx de clase I con cisteínas adicionales como ser la Grx2 de humanos (*HsGrx2*) o del pez cebra (*DrGrx2*), donde las cisteínas 28 y 113, ubicadas en la cara opuesta al sitio activo, forman un disulfuro con rol estructural (Berndt et al., 2007; Bräutigam et al., 2013; Johansson et al., 2007; Li et al., 2010; Rouhier et al., 2007) (Figura 4.5). Más aún, la segunda cisteína presente en Tb1-C-Grx1 no está conservada siquiera en otras especies de

tripanosomátidos, con la excepción de los tripanosomas africanos (Figura 3.1). *Tb1-C-Grx1* tampoco es fácilmente catalogable dentro de las Grx de clase II, como sugieren Ströher y Millar (Ströher and Millar, 2012), ya que las Grx de este grupo poseen sitios activos de secuencia relativamente conservada (CGFS) y una segunda cisteína en un motivo GGC conservado y asociado a la unión de GSH (Bellí et al., 2002; Deponte, 2013). Como se puede ver en las estructuras de *EcGrx4* y *ScGrx5* presentadas en la Figura 4.5, esta segunda cisteína se ubica en una posición relativamente cercana al sitio activo (15.1 y 13.8 Å, respectivamente) y, para el caso de *ScGrx5*, se ha reportado que puede formar un disulfuro *intramolecular* reducible por GSH con la cisteína del motivo CGFS cuando es oxidada por glutatión disulfuro (GSSG) (Tamarit et al., 2003). A pesar de la similitud entre ambas proteínas, el tratamiento de *EcGrx4* con GSSG determinó la formación de un disulfuro intramolecular entre las cisteínas externas al sitio activo C43 y C84 mientras que el tiol del mismo (C30) resultó glutatiónilado (Fernandes et al., 2005; Fladvad et al., 2005). A su vez, hay diferencias en la especificidad de reducción en ambas proteínas ya que el disulfuro intramolecular de *EcGrx4* es reducido por acción directa de la TrxR a expensas de NADPH y no por tioles de bajo peso molecular (Fernandes et al., 2005).

#### 4.6.2. Evidencia inicial sobre la formación de especies oxidadas de *Tb1-C-Grx1 FL* y $\Delta 76$

En un exhaustivo estudio sobre la oxidación de *Tb1-C-Grx1* por GSSG, Gsp disulfuro o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Melchers y colaboradores demostraron que la proteína puede formar un enlace disulfuro *intramolecular* entre los dos residuos de cisteína presentes en su secuencia y que este nuevo enlace se produce sin cambios sustanciales en la estructura secundaria evidenciables por CD (Melchers et al., 2007). Si bien en la mayoría de las condiciones testeadas el principal producto de la oxidación de *Tb1-C-Grx1* es la proteína monoalquilada en el residuo de cisteína externo al sitio activo (C181), el almacenamiento de la misma o el tratamiento con un gran exceso molar de oxidante determina la formación del disulfuro intramolecular, un resultado por demás sorprendente si consideramos que ambos residuos de cisteína están separados a una distancia de 26 Å y en elementos de estructura secundaria no cercanos en el espacio (Figura 4.5). A su vez, a diferencia de lo reportado para *ScGrx5* (Tamarit et al., 2003), la reacción de *Tb1-C-Grx1* con GSSG se da inicialmente sobre C181 y no sobre la cisteína del sitio activo (Melchers et al., 2007), en un comportamiento "anormal" reportado previamente solo para algunas Grx ditiólicas (*HsGrx2* (Hashemy et al., 2007) y *AtGrxC5* (Couturier et al., 2011))<sup>63</sup>. Otra diferencia respecto a los casos comentados de *ScGrx5* y *EcGrx4* es que la forma "oxidada" de *Tb1-C-Grx1* (probablemente una mezcla de especies, como veremos a continuación) puede ser reducida por oxidoreductasas ditiólicas como TXN, Grx1 de *E.coli* o Trx1 humana, así como también por tioles de bajo peso molecular como el  $T(SH)_2$  o GSH, pero no por TrxR (Filser et al., 2008). Además del detallado estudio por espectrometría de masas de la oxidación de *Tb1-C-Grx1* realizado por Melchers y colaboradores (Melchers et al., 2007), un trabajo previo de nuestro grupo reparó en que la oxidación de esta proteína por GSSG y  $H_2O_2$  tenía un

<sup>63</sup> Es interesante destacar que la oxidación de 1-C-Grx2 y 1-C-Grx3 con GSSG en condiciones controladas también genera la tiolación de residuos externos al sitio activo y no del motivo CGFS (no mostrado).

efecto en su estado oligomérico determinando la formación de especies oxidadas de alto peso molecular (Comini et al., 2008), si bien los autores propusieron que la formación de estas especies se daba sin la formación de enlaces disulfuros *intermoleculares*. En vista de que estos resultados dejaron varias preguntas sin resolver, en este trabajo retomamos brevemente este tema con el objetivo de intentar elucidar un posible mecanismo para la formación de las diferentes especies oxidadas, buscando una posible función redox aún no caracterizada para esta proteína. A su vez, también buscamos poder generar formas *homogéneamente* oxidadas a disulfuro que fueran adecuadas para estudios biofísicos y estructurales.

El primer resultado relevante lo obtuvimos en los controles de rutina de las proteínas almacenadas. Al resolver en SDS-PAGE las formas  $\Delta 76$  de *T. brucei* y *T. cruzi* 1-C-Grx1 se observa que estas proteínas forman agregados dependientes de tioles durante su almacenamiento (Figura 4.6). En el caso de *Tc1-C-Grx1 $\Delta 76$* , que posee un único residuo de cisteína (C105, equivalente a C104 en *Tb1-C-Grx1*) el almacenamiento produce la formación de especies diméricas reducibles por  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME). En estas mismas condiciones, la proteína ditiólica *Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$*  también forma dímeros covalentes pero también especies multiméricas de mayor nivel de agregación concatenadas a través de enlaces disulfuro reducibles por  $\beta$ ME. Las formas FL de ambas proteínas, por su parte, presentaron un comportamiento similar aunque la oxidación de las mismas en idénticas condiciones de almacenamiento es más lenta que las formas truncas (no mostrado). Por lo tanto, en este trabajo decidimos analizar en mayor detalle las formas oxidadas de *Tb1-C-Grx1*, intentando elucidar el mecanismo por el cual esta proteína puede formar tanto disulfuros intramoleculares como multímeros. Para obtener resultados más reproducibles optamos por reducir primero la *Tb1-C-Grx1* y correrla en SEC Superdex 75 10/300 para obtener una muestra de partida reducida y oligoméricamente homogénea (no mostrado). El pico de la SEC correspondiente a la proteína reducida fue colectado e inmediatamente se analizó su contenido de tioles y proteína por las técnicas comentadas en la sección Materiales y Métodos. En función este dato se realizó la oxidación controlada con un exceso de dos veces (en relación molar) de oxidante respecto a tioles, durante 30 min en amortiguador B (pH 7.4) a TA. Cumplido este tiempo las muestras fueron resueltas en SEC y las fracciones analizadas juntas o separadas por SDS-PAGE y técnicas espectroscópicas.

#### **4.6.3. Oxidación *in vitro* de *Tb1-C-Grx1* por glutatión disulfuro**

Como se puede ver en la Figura 4.7, la oxidación controlada con GSSG determina la aparición de especies de alto peso molecular pero la especie mayoritaria continua migrando en la columna de SEC con el peso molecular equivalente a la especie reducida (Figura 4.7.A). Las especies de alto peso molecular son deficientes en tioles (Figura 4.7.B), lo que coincide con su comportamiento en SDS-PAGE (Figura 4.7.C) en donde se ve que forman multímeros concatenados por enlaces disulfuro. Al analizar por SDS-PAGE en condiciones no reductoras las especies proteicas presentes en el pico de  $\sim 30$  kDa se resuelven dos

bandas, una de las cuales migra más que la otra (Figura 4.7.C). A su vez, la doble banda desaparece al correr las muestras en SDS-PAGE en presencia de reductor, confirmando que en el pico de ~30 kDa coexisten *Tb1-C-Grx1* reducida y *Tb1-C-Grx1* con un disulfuro intramolecular, en coincidencia con lo reportado previamente (Comini et al., 2008; Melchers et al., 2007). Para intentar obtener una mejor definición del posible cambio conformacional asociado a la formación de la especie con disulfuro intramolecular, el pico de la SEC (fracciones 4-6) fue colectado y analizado por CD en el ultravioleta lejano (Figura 4.7.D). La comparación del espectro de CD de estas fracciones respecto de la forma reducida muestra importantes diferencias, si bien los resultados no son de la calidad adecuada para evaluar los cambios porcentuales en estructuras secundarias. Además, como se demostró más arriba, en las condiciones experimentales usadas el pico de ~30 kDa contiene una mezcla de formas reducidas y oxidadas, lo que opaca parcialmente la posible diferencia en los espectros de CD de ambas formas. Sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado en (Melchers et al., 2007) quienes obtuvieron espectros de CD prácticamente idénticos para las formas reducida y oxidada de la proteína. Esto puede explicarse porque los espectros reportados por Melchers y colaboradores corresponden a una muestra de *Tb1-C-Grx1* oxidada con un exceso de 40 veces en concentración molar de GSSG durante 24 hs, lo cual da lugar mayoritariamente a una mezcla de multímeros covalentes y especies con disulfuro intramolecular (no mostrado). Estos multímeros no son identificados por los autores ya que la aproximación experimental que usan (ESI-MS) no les permite explorar rangos de pesos moleculares mayores a 40 kDa (Melchers et al., 2007). En conclusión, el producto de la oxidación con GSSG dependerá de: *i*) el exceso molar de oxidante respecto de proteína y *ii*) el tiempo de incubación/almacenamiento de las especies oxidadas. En presencia de un gran exceso molar de GSSG o tratando la proteína por un largo período de tiempo (mayor a los 30 min usados en nuestros experimentos), el resultado será mayoritariamente una mezcla de formas oxidadas incluyendo especies multiméricas, tioladas y con disulfuro intramolecular. Las formas tioladas o multiméricas se forman sin cambios en la proporción de elementos de estructura secundaria evidenciables por CD (Melchers et al., 2007). Durante el almacenamiento de esta mezcla de formas oxidadas se da el incremento de la proporción de la especie con un disulfuro intramolecular, lo que sugiere que este estado de oxidación es un punto final más estable que las formas tioladas o multiméricas (no mostrado).

La oxidación con excesos menores de GSSG, como los usados en los experimentos de la Figura 4.7, determina mayoritariamente la formación de especies con disulfuros intramoleculares, probablemente gatilladas por la tiolación de C181. En función de lo reportado, esta modificación postraduccional determina el cambio conformacional (evidenciable por CD) que acerca ambas cisteínas. Este mecanismo exige dos explicaciones: *i*) ¿por qué reacciona prioritariamente C181 con GSSG y no C104?, y *ii*) ¿cómo se transmite la información desde el extremo carboxiloterminale hacia el resto de la proteína? El primer punto será abordado en la próxima sección pero, brevemente, el pKa de C181 es significativamente menor al que poseen los residuos de cisteína libres y, además, a pH>7 el residuo de C104 parece no ser reactivo con alquilantes de tioles. Respecto a lo segundo, si bien C181 se localiza en el extremo carboxiloterminale de *Tb1-C-Grx1*, al igual que lo reportado para la C177 de *DrGrx2* (Figure 4.5) (Bräutigam

et al., 2013) y C229 del primer dominio Grx de *HsGrx3* (PDB ID 3ZYW, no publicado), el entorno en el que se ubican C181 es completamente distinto a los otros casos. Mientras que las cisteínas carboxiloterminales en las proteínas de vertebrados se ubican en *loops* flexibles y móviles, C181 está ubicada en una región muy poco flexible de la proteína y fuertemente asociada al *core* de la misma a través de interacciones hidrofóbicas (ver Capítulo 5). Estos resultados sugieren que la tiolación de C181 necesariamente producirá un cambio conformacional importante, al menos en las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$ , si bien aún queda por definir cuál es la sucesión de eventos que se suceden durante este proceso. A su vez, a partir de estos resultados también podemos proponer que C104 no es el blanco prioritario de GSSG y que su alquilación se da en condiciones de un gran exceso de oxidante y favorece la formación de especies multiméricas.

#### **4.6.4. Oxidación *in vitro* de *Tb1-C-Grx1* por peróxido de hidrógeno**

El tratamiento con  $H_2O_2$  también produce la oxidación de la proteína y el consumo de tioles pero, a diferencia de lo que sucede con GSSG, aún en condiciones de oxidación moderada como las usadas en los experimentos de la Figura 4.8 el producto más abundante de la oxidación son especies de alto peso molecular y la especie con un disulfuro intramolecular es prácticamente indetectable. Comini y colaboradores (Comini et al., 2008) demostraron que la oxidación de *Tb1-C-Grx1* con un exceso de 10 veces (en concentración molar) de  $H_2O_2$  determina la sobreoxidación de C104 a ácido cisteínsulfónico (Cys-SO<sub>2</sub>H), el cual no es reversible por reductores de tioles. Por su parte, Filser y colaboradores demostraron que esta proteína no puede descomponer catalíticamente  $H_2O_2$  a expensas de GSH (Filser et al., 2008), lo que sugiere que ante un exceso de este oxidante C104 queda “bloqueada” por sobreoxidación, mientras que C181 queda libre para ser alquilado por reactivos de tioles (Comini et al., 2008). Estos resultados sugieren que el producto prioritario de la reacción con  $H_2O_2$  a *bajas relaciones molares oxidante:proteína* es la formación de multímeros y que este proceso se desencadena por la oxidación de C104. Con el objetivo de determinar la composición de estas especies multiméricas las formas oxidadas de *Tb1-C-Grx1* fueron resueltas en dos columnas de SEC de diferente rango en donde fue posible evidenciar especies oxidadas de hasta ~400 kDa (Figura 4.8.A y 4.8.D). En coincidencia con la formación de multímeros dependientes de tioles, las fracciones de alto peso molecular poseen menos cisteínas por mol que la proteína reducida (Figura 4.8.B) y, como se puede ver en los gels de la Figura 4.8.C y 4.8.E, estas fracciones están compuestas por multímeros de *Tb1-C-Grx1*. Al comparar los pesos moleculares de las fracciones separadas por SEC vemos que no coinciden con la distribución de especies resueltas por SDS-PAGE (Figura 4.8.C y 4.8.E), lo cual apunta en la línea que las especies concatenadas formadas son fuertemente no globulares. Sin embargo, se trata de formas solubles y en las cuales la conformación global de la proteína no parece estar mayormente alterada, como se demuestra al analizar su espectro de fluorescencia (ver a continuación) y el espectro de CD (no mostrado). Más aún, el almacenamiento de las formas oxidadas en ausencia de oxidante determina que las mismas sigan polimerizando aún después de removido el estímulo, lo cual apunta a un cambio conformacional lento posterior a la reacción con  $H_2O_2$  (Figura 4.8.C). Esto coincide con los experimentos de fluorescencia

mostrados en la Figura 4.8.F en donde es evidente que el consumo de tioles en *Tb1-C-Grx1* producto de la oxidación con  $H_2O_2$  se da en tiempos relativamente cortos, mientras que los únicos cambios evidenciables por fluorescencia ocurren solo luego de una incubación ON de la proteína con el oxidante. La oxidación con peróxido de hidrógeno puede darse *a priori* en cualquiera de los dos residuos de cisteína. En las condiciones experimentales usadas aquí la reactividad de C104 con agentes alquilantes de tioles es prácticamente nula (ver próxima sección), lo cual no significa que lo mismo suceda respecto a su reactividad con oxidantes derivados del oxígeno (Ferrer-Sueta et al., 2011). Integrando estos resultados podemos proponer que la reacción de  $H_2O_2$  se da en una primera instancia sobre C104, oxidando la cisteína a ácido cisteínsulfénico (Cys-SOH). El destino de este producto dependerá del exceso de oxidante: a bajas concentraciones de  $H_2O_2$  la oxidación de C104 desencadena un cambio conformacional que da origen a la polimerización de la proteína, mientras que frente a un gran exceso de oxidante se da la sobreoxidación de C104 a Cys-SO<sub>2</sub>H. La primera reacción es la oxidación de la cisteína del sitio activo por  $H_2O_2$  para la cual, si bien desconocemos su constante de reacción podemos especular que estará en el rango de  $3-180 M^{-1}s^{-1}$  determinado por Björnberg y colaboradores para la Grx1 silvestre y el mutante CPYS de *S. cerevisiae*, respectivamente (Björnberg et al., 2006)<sup>64</sup>, lo cual a su vez es aproximadamente lo esperado para la reacción de  $H_2O_2$  con un tiol “no catalítico” (Ferrer-Sueta et al., 2011). El segundo paso (sea este la polimerización o la sobreoxidación) es, seguramente, de cinética más lenta ya que las proporciones de las especies resultantes se modifican durante el almacenamiento (horas-días).

#### 4.6.5. Integración de los resultados de oxidación en un modelo con base estructural

En conclusión, nuestros resultados confirman los publicados previamente y sugieren que *Tb1-C-Grx1* responde diferencialmente a distintos oxidantes. En la Figura 4.9 se resumen los mismos y se presenta una hipótesis de los posibles eventos conformacionales que dan origen al disulfuro intramolecular y a multímeros mediados por tioles, basado en la topología de la estructura de *Tb1-C-Grx1* (Figura 5.3, ver más adelante). La reactividad preferencial de C181 frente a GSSG tiene su sustento en la próxima sección y en los resultados de unión de GSH que se presentarán en el Capítulo 5.

En trabajos previos de nuestro grupo (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008) se reportó cierta especificidad por los reductores en las diferentes especies oxidadas, si bien sobre esto aún se requiere más investigación. Completando con los resultados presentado aquí, podemos afirmar que: *i)* las especies formadas por oxidación de *Tb1-C-Grx1* con GSSG son reducibles por  $\beta$ ME y oxidoreductasas de disulfuros como TXN o Trx, *ii)* estas formas oxidadas también sobre reducibles por tioles de bajo peso molecular como GSH o T(SH)<sub>2</sub> pero menos eficientemente y *iii)* *Tb1-C-Grx1* tiolada en C181 no es

---

<sup>64</sup> Corresponde destacar que Collison y colaboradores (Collinson and Grant, 2003) determinaron que ScGrx1 y 2 pueden descomponer  $H_2O_2$  catalíticamente a expensas de GSH con eficiencias catalíticas del orden de  $10^4 M^{-1}s^{-1}$ , si bien estos resultados no han sido reproducidos por otros autores y contradicen los aquí presentados.

reducibles por GSH. Considerando la alta concentración intramitocondrial propuesta para esta proteína (~200  $\mu\text{M}$  (Comini et al., 2008)) es improbable que la concentración de GSSG que enfrente sea muy superior, lo cual nos deja en un escenario más parecido a los experimentos reportados en este trabajo que en (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008; Melchers et al., 2007). En conclusión, las especies oxidadas más probables, de darse, serán formas con disulfuro intramolecular o tioladas, las cuales podrían ser reducidas por oxidoreductasas de sitio activo CxxC. Sin embargo, desconocemos si la formación de un disulfuro intramolecular puede sustentar una cierta actividad redox, como se sugirió para ScGrx5 (Tamarit et al., 2003), ya que no hay evidencias directas de la presencia de TXN, Trx (Panigrahi et al., 2009) o -inclusive- T(SH)<sub>2</sub> (Manta et al., 2013b) en la matriz mitocondrial, donde se localiza 1-C-Grx1. Esto es diferente de lo que sucede en plantas, donde fue demostrado que GrxS15 interacciona *in vivo* con diferentes versiones mitocondriales de Trx (Balmer et al., 2004; Yoshida et al., 2013). Interesantemente, en el Capítulo 2 identificamos una proteína con plegamiento Trx y sitio activo CPIC aún no caracterizada (secuencia 14 en Figura 2.1) de localización mitocondrial que podría officiar de reductasa, si bien esto no se ha abordado experimentalmente.

Es notorio que el principal resultado de la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la formación de multímeros mediada por tioles. Este comportamiento fue reportado solamente para ScGrx6 y 7 donde la formación de multímeros mediados por disulfuros está favorecida ya que las proteínas son homodiméricas (Mesecke et al., 2008). En el caso de Tb1-C-Grx1, la polimerización requeriría una "gimnasia conformacional" previamente no reportada para ninguna Grx. Una posible explicación es el fenómeno conocido como intercambio de dominios ("domain swapping") en el cual dos o más proteínas forman agregados supramoleculares intercambiando elementos estructurales idénticos (Gronenborn, 2009). Esto ha sido reportado para tres proteínas con plegamiento Trx que son el mutante W28A de la tiorredoxina de *Staphylococcus Aureus* (PDB ID 3DIE, (García-Pino et al., 2009)) y la NrdH-redoxin de *Corynebacterium ammoniagenes* (PDB ID 1R7H, (Stehr and Lindqvist, 2004)). Este último caso es interesante ya que la formación de dímeros se da por el intercambio de los subdominios  $\beta\beta\alpha$  y  $\beta\alpha\beta$  propios del plegamiento Trx (Figura 1.15). El tercer caso es la proteína híbrida Prx-Grx de *Haemophilus influenzae*, la cual dimeriza a través de un inusual "domain swapping" de elementos del dominio Grx (PDB ID 1NM3, (Kim et al., 2003)). Sin embargo, por el momento no tenemos resultados experimentales que nos permitan afirmar que algo similar podría estar pasando en Tb1-C-Grx1.

Finalmente, no logramos aún el objetivo de generar formas *homogéneamente* oxidadas o tioladas y es probable que el trabajo con mutantes de cisteína no rinda frutos ya que parece evidente que ambas cisteínas están, de alguna manera, comunicadas a través de la estructura de la proteína. Un ejemplo de ello es que si bien el mutante C104S reacciona con GSSG y resulta tiolado en C181, el mutante C181S no reacciona con GSSG (no mostrado).

## 4.7. Determinación del pKa de las cisteínas de *Tb1-C-Grx1*

### 4.7.1. pKa de cisteínas del sitio activo en glutarredoxinas

En la sección anterior mostramos que *Tb1-C-Grx1* es capaz de reaccionar con oxidantes a expensas de sus cisteínas y, en combinación con lo reportado en (Melchers et al., 2007; Comini et al. 2008), podemos afirmar que esta reacción determina la formación de especies con disulfuros intra- o intermoleculares. Como se comentó en la Introducción, a pesar de los pocos datos biológicos disponibles, hay una aceptación general en la literatura de que la reacción “fisiológica” de las Grx es la reducción de disulfuros mixtos entre tioles (proteicos o no) y GSH (reacción de “deglutinationilación”, Figura 1.17). En esta reacción se da inicialmente un intercambio tiol:disulfuro entre la enzima reducida y el disulfuro, resultando glutationilada la Grx, y luego una segunda molécula de GSH participa en otra reacción de intercambio tiol:disulfuro liberando la enzima reducida y GSSG (Deponte, 2013; Gallogly et al., 2009). Más allá de que solo un reducido grupo de Grx cataliza este tipo de reacciones, el ensayo de reducción del disulfuro mixto entre GSH e hidroxietildisulfuro sigue siendo la prueba estándar para medir “actividad Grx”. Si bien hay varios aspectos de este mecanismo que aún son controversiales un punto en el que todas las explicaciones coinciden es el siguiente: el primer paso involucra el ataque nucleofílico de la cisteína del sitio activo de la Grx sobre el disulfuro (reacción 4 en Figura A16) (Björnberg et al., 2006; Gallogly et al., 2008, 2009; Iversen et al., 2010; Mieyal et al., 1991). En la literatura se acepta como un hecho que, al igual que en otras proteínas con plegamiento Trx, la cisteína aminoterminal del motivo CxxC/S es “activada” por un entorno proteico que favorece su desprotonación en condiciones fisiológicas. En consecuencia, toda la literatura sobre Grx señala que las Grx poseen un sitio activo con una cisteína de pKa “ácido” (Deponte, 2013; Gallogly et al., 2009). Para nuestra sorpresa, a pesar de ser una afirmación que aparece en centenares de artículos y revisiones, la información experimental disponible sobre pKa de Grx es escasa y está mayoritariamente concentrada en Grx ditiólicas de levadura y bacterias (Figura 4.10).

Sin embargo, es un hecho que para los casos reportados la cisteína del sitio activo presenta un pKa considerablemente más bajo que el que poseen los residuos de cisteína libre (7.3-8.5 (Sardi et al., 2013)), con un valor promedio de  $4.3 \pm 0.8$  (Figura 4.10), similar al reportado para isomerasas de disulfuros y menor que el encontrado generalmente en Prx y Trx (Ferrer-Sueta et al., 2011; Hugo et al., 2009; Manta et al., 2009; Sardi et al., 2013; Trujillo et al., 2007)<sup>65</sup>. Si bien muchas Grx poseen residuos de cisteína externos al sitio activo, generalmente estos no presentan pKa particularmente ácidos (ej. la C177 de *ScGrx5*, mostrada en el Figura 4.5, posee un pKa de 8.2 (Tamarit et al., 2003)), con la única excepción de C87 de la Grx de clase I *PtGrxS12* (pKa = 5.6 (Couturier et al., 2009)). Sin embargo, como planteamos en el capítulo anterior, la reacción de *Tb1-C-Grx1* con GSSG se da *inicialmente* sobre la C181 y no sobre la cisteína del

---

<sup>65</sup> Nuestro grupo y otros han trabajado largamente la reactividad de cisteínas proteicas en proteínas con plegamiento Trx y en la actualidad sabemos que el bajo pKa, por sí solo, no determina un aumento *generalizado* en la eficiencia catalítica de la reacción ni confiere especificidad (Ferrer-Sueta et al., 2011). A su vez, en el proceso de validación del método presentado en (Sardi et al., 2013) y en la preparación de trabajos no publicados sobre Prx (colaboración con Dr. L. E. S. Netto) y Trx (colaboración con Dr. J. Santos) realizamos la (re)determinación del pKa de tioles críticos en ~30 proteínas distintas, así como un número similar de tioles de bajo peso molecular.

sitio activo. Para tratar de comprender mejor este fenómeno así como las propiedades fisicoquímicas que caracterizan a los residuos involucrados en la unión de un centro ferrosulfurado (ver más adelante) nos propusimos determinar el pKa de los tioles de ambos residuos de cisteína de *Tb1-C-Grx1*.

#### **4.7.2. Nuevo método para la determinación del pKa de cisteínas basado en la sonda monobromobimano**

El pKa de una cisteína puede ser analizado por métodos espectroscópicos (ej. absorción a 240 nm, señal en resonancia Ramman o corrimiento químico en NMR), por la inhibición irreversible mediada por agentes alquilantes o mediante la reactividad diferencial entre las formas tiol y tiolato con una cierta sonda (moléculas marcadas con  $^{13}\text{C}$ , fluoróforos, etc.). En todos los casos, la variable es observada en función del pH y analizada por curvas de titulación con 1, 2 o más puntos de inflexión. Durante este trabajo se desarrolló junto al Dr. Ferrer-Sueta un nuevo procedimiento para la determinación del pKa de tioles basado en la reactividad diferencial del par tiol/tiolato con el monobromobimano (mBBr, Figura 4.11) (Sardi et al., 2013), el cual se resume brevemente a continuación. El mBBr es una molécula bromada no fluorescente que reacciona con tioles desplazando el átomo de bromo y formando un compuesto covalente con un máximo de absorción en torno a 385-400 nm que emite en la región visible con un máximo de emisión en el entorno de 470-490 nm. Entre las ventajas que posee la técnica, se destaca que el producto fluorescente presenta una mínima variación en su espectro de emisión en función del pH o la polaridad del entorno y que absorbe en la región donde emite el W proteico (330-360 nm), permitiendo experimentos de transmisión de energía en resonancia (FRET) (Figura 4.11). A su vez, como el mBBr no es fluorescente por sí mismo, no es necesario separar el producto de la reacción o sustraer componentes espectrales provenientes del mBBr que no reaccionó. Finalmente, al tratarse de un método en el cual se mide la velocidad de alquilación de la proteína en función del tiempo, los resultados de fluorescencia obtenidos pueden ser convertidos a constantes de segundo orden con los controles adecuados. En este trabajo aplicamos esta técnica para determinar el pKa de ambas cisteínas de *Tb1-C-Grx1*. Para ello, trabajamos con las versiones WT, C104S y C181S de la proteína madura (FL) sin etiqueta de afinidad y con la versión  $\Delta 76$  WT. A su vez, también se determinó el pKa de la forma FL y  $\Delta 76$  de *Tc1-C-Grx1*, con resultados equivalentes a los que se comentarán a continuación (Fleitas, 2012) (no mostrado).

#### **4.7.3. El pKa de los residuos de cisteína de *Tb1-C-Grx1* sugiere que ambas regiones de la proteína están relacionadas**

En la Figura 4.12.A se muestran los resultados obtenidos para formas WT, C104S y C181S de *Tb1-C-Grx1* FL. Evidentemente, el perfil de reactividad en función del pH presenta un comportamiento más complejo que el esperado para una ionización simple, con un mínimo de reactividad cercano a pH 6.5. Ante lo inusual del resultado, el experimento fue repetido con la forma FL WT por regiones de pH (zona ácida, pH

2-7, n=3; zona básica, pH 7-10, n=2), con los mutantes C104S, C181S y C104/181S (n=1) e inclusive con la forma  $\Delta 76$  WT de *Tb1-C-Grx1* (n=3) y *Tc1-C-Grx1* (n=1). A su vez, los experimentos fueron realizados midiendo simultáneamente la emisión causada por la excitación directa del fluoróforo ( $\lambda_{exc}=396$  nm/ $\lambda_{em}=472$  nm) o por transferencia de energía desde el triptófano ( $\lambda_{exc}=280$  nm/ $\lambda_{em}=472$ ) aprovechando el FRET entre el único residuo de W de *Tb1-C-Grx1* (W142) y el bimano unido a la molécula. En todos los casos, los resultados fueron equivalentes a los mostrados en la Figura 4.12.A.

La ausencia de C181 elimina el componente de reactividad por encima de pH 6 dejando solo el trazo con forma de campana en la región de pH 4-6 correspondiente a la C104 y muy similar al observado en la proteína WT. La ausencia de C104S, por su parte, elimina la reactividad en la región de pH <6.5, lo que confirma que la cisteína 181 es la única que reacciona con mBBr en la zona neutra-alcalina, lo que aporta una explicación convincente a los resultados presentados en la sección anterior y reportados por Melchers y colaboradores (Melchers et al., 2007) ya que se trata de experimentos realizados a pH  $\geq 7.4$ . Sin embargo, como se sugirió anteriormente, ambos tioles no son completamente independientes ya que la presencia de C104 tiene un efecto en el pKa de C181, determinando que descienda  $\sim 1.5$  unidades respecto del pKa medido en el mutante C104S (Figura 4.12.A). Si bien desconocemos cual es el camino estructural que media este *efecto a distancia* de C104 sobre C181 (ver Capítulo 5), el acoplamiento es evidente y tiene como resultado que C181 sea una cisteína más ácida de lo esperado, si bien su reactividad con mBBr es equivalente a la que poseen tioles de bajo peso molecular o cisteínas proteicas expuestas al solvente ( $k_2 = 20-30$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Sardi et al., 2013) (Figura 4.12.B)<sup>66</sup>.

La pendiente positiva entre pH 3 y 4.5 en la curva de reactividad de *Tb1-C-Grx1* FL WT y C181S es previsible y coincide con un evento de ionización de una cisteína de pKa ácido como las propuestas para varias Grx (Figura 4.10). Sin embargo, la pendiente negativa en el tramo posterior (pH 4.5-6) implica la pérdida de reactividad de C104, un fenómeno poco habitual aunque ya reportado para otras proteínas con plegamiento Trx (Witt et al., 2008). Este comportamiento sugiere que existe otro residuo ionizable en el rango de pH 3-6 que afecta dramáticamente la reactividad de C104, aunque no podemos discernir si se trata de un residuo en contacto directo con el tiol/tiolato de C104 o a través de un efecto conformacional de más largo alcance. Más aún, para ser más precisos, sin resultados experimentales adicionales no podemos afirmar con certeza cuál lado de la campana corresponde a la ionización de C104. Debido a lo singular de este resultado fuimos cuidadosos de descartar que el comportamiento observado para C104 no fuera artefactual. Para controlar esto realizamos la alquilación de *Tb1-C-Grx1* con mBBr y caracterizamos su espectro a diferentes pH. En base a los resultados de constante de segundo orden comentados en el párrafo anterior (Figura 4.12.B) calculamos que la incubación de *Tb1-C-Grx1* reducida con un exceso de 10 veces (relación molar) de mBBr a pH 8.0 durante 5 minutos resultaría en la proteína completamente alquilada en C181. Como se puede ver en la Figura 4.12.C, el procedimiento de alquilación selectiva resultó relativamente exitoso y la muestra monoalquilada fue mayoritaria ( $\sim 60\%$ ),

---

<sup>66</sup> Los valores de  $k_2$  obtenidos para la reacción de las formas FL y  $\Delta 76$  de *Tc1-C-Grx1* en iguales condiciones fueron de  $\sim 35$  y  $24$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (n=1) respectivamente, muy similares a los medidos en la proteína de *T. brucei* (no mostrado).

pudiéndose determinar por MALDI-TOF que la alquilación se da en el residuo C181 (Figura 4.12.D-E). Con esta muestra se realizaron los controles de efecto del pH en el espectro de emisión de la proteína marcada, ya sea por excitación directa del fluoróforo (Figura 4.12.F) o por FRET (Figura 4.12.G). Como se puede ver en la Figura 4.12.H, si bien hay pequeños efectos en la posición del centro de masa y del RFU máximo en los espectros de la proteína marcada a diferentes pH (no mostrado), los mismos no recapitulan el perfil de reactividad mostrado en la parte A de la Figura 4.12. A su vez, tanto el espectro de absorción de la proteína *marcada* entre 240 y 600 nm como el espectro de emisión de la proteína *no marcada* en iguales condiciones ( $\lambda_{exc}=280$  nm,  $\lambda_{em}$  entre 300 y 400 nm) no presenta transiciones evidentes que recapitulen el perfil de reactividad (no mostrado) indicando que el resultado mostrado en Figura 4.12.A representa auténticamente la reactividad diferencial de ambas cisteínas frente al mBBR. Sin embargo, al analizar el efecto del pH en el espectro de emisión del bimanó unido vía FRET ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) (Figura 4.12.I) pudimos observar que si bien no se detecta un efecto en la intensidad de emisión del aceptor (bimanó unido a la proteína), la intensidad de emisión del donante (W) muestra una transición con un punto de inflexión a pH 5.6. Dado que en esta proteína la marca está, mayoritariamente, en el residuo C181, esta transición puede explicarse de dos maneras: *i*) en el rango de pH 5-6 se produce un cambio conformacional que *aleja* los residuos de W142 y C181, disminuyendo la eficiencia de FRET y aumentando la emisión “no quencheada” del donante o *ii*) en ese mismo rango de pH se da un cambio conformacional que “desquenchea” parte de la emisión del donante sin involucrar cambios en la eficiencia de FRET. Si bien desconocemos cual es la respuesta correcta, este cambio conformacional sucede, coincidentemente, en el mismo punto donde se da la caída de la reactividad de C104 en la proteína WT (pH 5.6) lo cual sugiere que el acoplamiento entre la inactivación de C104 y la activación de C181 está mediada por los cambios conformacionales que sucede en un estrecho rango de pH<sup>67</sup>. Evidentemente, los residuos candidatos a funcionar de gatillos en este rango de pH son ácidos glutámicos o ácidos aspárticos, si bien es particularmente difícil de especular cual sería el residuo clave ya que proteína es extremadamente rica en estos residuos (Figura 4.12.J, 7.3 % de E y 9.1% de D, comprado a una media para proteínas globulares de 6.2% y 5.3% respectivamente).

Respecto al cambio inducido por el pH, podemos afirmar que el mismo no depende de residuos presentes en la región NTE ya que ambas versiones de la proteína A76Lp<sup>67</sup> poseen el mismo comportamiento (no mostrado). Al considerar los resultados de oxidación y pKa en conjunto surge como evidente que ambas cisteínas están intrínsecamente asociadas a la plasticidad conformacional de esta proteína, si bien aún desconocemos el mecanismo mediante el cual se comunican ambas regiones. En el próximo capítulo intentaremos aportar una base estructural a estos resultados.

---

<sup>67</sup> Es importante aclarar que este aumento en la intensidad de emisión del donante no afecta los resultados presentados en Figura 4.12.A ya que los mismos fueron realizados por excitación directa del fluoróforo.

## 4.8. Coordinación de centros ferrosulfurados

### 4.8.1. Preguntas abiertas en la coordinación de centros ferrosulfurados por Grx de tripanosomas

Al comienzo de este trabajo sabíamos que varias Grx mono y ditiólicas eran capaces de coordinar centros ferrosulfurados *in vitro* y que, en algunos casos, había evidencia de que esta función también era relevante *in vivo* (ver Introducción). La primera evidencia de que las Grx recombinantes son capaces de recibir centros ferrosulfurados a partir de la maquinaria de biogénesis presente en *E. coli* (Figura 1.9, Introducción) es que en varios casos la sobreexpresión de las mismas determina que el lisado celular sea de color marrón-rojizo y con propiedades espectroscópicas conservadas, como ser uno o dos máximos de absorción en la región de 310-440 nm, donde típicamente absorben los centros ferrosulfurados (Bandyopadhyay et al., 2008; Bräutigam et al., 2011, 2013; Comini et al., 2008; Couturier et al., 2011; Lillig et al., 2005; Mapolelo et al., 2013; Mesecke et al., 2008; Picciocchi et al., 2007; Rada et al., 2009; Rouhier et al., 2007; Tripathi et al., 2008). En estos trabajos puede verse que la expresión recombinante es capaz de sustentar la producción de holo-Grx en grandes cantidades, indicando que la sobrecarga de Grx en forma holo no es tóxica para la bacteria, lo que permitió la producción y purificación de varias Grx en forma holo en cantidades suficiente para sustentar estudios estructurales. En consecuencia, todas las Grx con centros ferrosulfurados que han sido analizadas por NMR o cristalografía hasta el momento fueron obtenidas como holo-proteínas a partir de la expresión recombinante en *E. coli* y purificadas directamente, determinando que el tiol presente como ligando en los centros ferrosulfurados sea invariablemente GSH (Bräutigam et al., 2013; Couturier et al., 2011; Feng et al., 2006; Johansson et al., 2007, 2010; Rouhier et al., 2007; Wang et al., 2011, 2012).

Luego de demostrar que *Tb1-C-Grx1* era parcialmente capaz de recuperar el fenotipo respiratorio del mutante  $\Delta grx5$  de *S. cerevisiae* (Filser et al., 2008), Comini y colaboradores abordaron la unión de centros ferrosulfurados a *Tb1-C-Grx1* y demostraron que la proteína recombinante era capaz de coordinar centros ferrosulfurados “*in vivo*” (entendido, en este contexto, como dentro de la bacteria hospedera de la expresión recombinante) y en experimentos de reconstitución *in vitro* (ver a continuación) (Comini et al., 2008). Mediante el uso de técnicas espectroscópicas los autores demostraron que el centro ferrosulfurado obtenido en la reconstitución a expensas de GSH era del tipo [2Fe-2S], lábil a oxidantes y estabilizable por GSH. Más aún, al analizar el perfil de exclusión molecular (SEC) de la forma “holo” (con el FeS unido) demostraron que la misma poseía un peso de ~34 kDa. Como se comentó en este capítulo, la forma “apo” (sin FeS) de esta proteína migran en columnas de SEC con un peso de ~30 kDa, y la similitud entre los valores obtenidos para la forma apo y holo llevó a los autores a considerar que tanto la forma apo como holo de *Tb1-C-Grx1FL* eran especies diméricas. Si bien en el trabajo original este punto no es analizado en detalle, no escapó a los autores que esta observación sugería un nuevo mecanismo de coordinación de centros ferrosulfurados en donde 1-C-Grx1 coordina el clúster sin producirse cambios en el estado oligomérico. Sumado a esto, poseíamos evidencias no publicadas que indicaban que tanto 1-C-Grx1 como las restantes Grx monotiólicas de *T. brucei* (ver al final) eran capaces de usar

Gsp en lugar de GSH para la coordinación del centro ferrosulfurado. Todos estos resultados apuntaban a que 1-C-Grx1 poseían notables particularidades en la unión de estos cofactores, tanto desde el punto de vista conformacional como en cuanto a posibles ligandos de bajo peso molecular. Más aún, el posible rol de la C181, conservada solo en tripanosomas africanos (Figura 3.1), era un factor adicional de diversidad que merecía ser estudiado. En consecuencia, considerando las observación previas de nuestros grupos y los aspectos que aún no habían sido resueltos, las preguntas que abordamos en esta sección del trabajo fueron: *i)* ¿cuál o cuáles de las cisteínas presentes en *Tb1-C-Grx1* son esenciales para la coordinación de centros ferrosulfurados?, *ii)* ¿cuál es el estado oligomérico de la forma holo-*Tb1-C-Grx1*?, *iii)* ¿es posible ensamblar centros ferrosulfurados en *Tb1-C-Grx1* a expensas de Gsp o T(SH)<sub>2</sub>? y *iv)* ¿cuál es la estequiometría de los centros ferrosulfurados ensamblados con tioles específicos del parásito?. Los resultados presentados en esta sección fueron publicados en (Manta et al., 2013a), si bien el análisis que se realiza al final incorpora elementos que no fueron tenidos en cuenta a la hora de escribir el artículo, así como resultados no publicados obtenidos para otras Grx de *T. brucei*.

#### **4.8.2. La cisteína del sitio activo es esencial para la coordinación de centros ferrosulfurados**

Con la excepción de *DrGrx2* (Figura 4.5) (Bräutigam et al., 2013) todas las Grx capaces de coordinar centros ferrosulfurados utilizan como ligandos la cisteína aminoterminal del sitio activo y una molécula de GSH unida no covalentemente, necesitando dimerizar en torno al clúster para ocupar las cuatro posiciones de coordinación del cofactor. Dado que *Tb1-C-Grx1* posee dos cisteínas lo primero que hicimos fue analizar si solo C104 (la cisteína del “sitio activo”) o ambas cisteínas eran necesarias para la coordinación del clúster “in vivo”. Para ello generamos los mutantes C104S y C181S en la proteína con etiqueta de afinidad y los expresamos en *E. coli*. Como se puede ver en la Figura 4.13.A, el lisado celular donde se expresó *Tb1-C-Grx1* FL C104S no presenta la coloración marrón-rojiza observable en el lisado de las células sobreexpresantes de la versión C181S o WT (no mostrado). Análogamente, las columnas de IMAC no se tiñen de color marrón al purificar la versión C104S de la proteína recombinante como si sucede en las columnas durante la purificación de las formas WT y C181S (Figura 4.13.B). A su vez, el eluido de la IMAC de la forma C104S no presenta la coloración que se observa en la forma WT (Figura 4.13.C) ni el espectro UV-visible característico (Figura 4.13.D). La diferencia observada entre las formas WT y C181S respecto de C104S es muy marcada y apoya la suposición de que solo la cisteína del sitio activo participa en la coordinación de centros ferrosulfurados. Para descartar que la ausencia de coloración en el lisado de la forma C104 no sea consecuencia de diferentes niveles de expresión de la proteína recombinante decidimos analizar los eluidos de la IMAC por SDS-PAGE y, como se puede ver en la Figura 4.13.E, tanto en el eluido de la forma WT como de la C104S la proteína recombinante representa el ~90% del total de proteína<sup>68</sup>. Por último, evaluamos que las mutaciones no tuvieran un efecto en la

<sup>68</sup> Más aún, por motivos aun no analizados, la proporción de proteína recombinante obtenida para la versión C181S fue sustancialmente menor en todos los casos

oligomerización de las formas sobreexpresadas, para lo cual las proteínas recombinantes purificadas, fueron tratadas con quelantes de metales y DTT para luego ser analizadas por SEC, donde no se evidencia diferencias en el volumen de retención (Figura 4.13.F). Tampoco se observaron diferencias en el espectro de CD entre la forma WT y C104S en su forma apo y reducidas (no mostrado). Estos resultados, en conjunto, indican que *Tb1-C-Grx1* necesita de la cisteína 104 para recibir el centro ferrosulfurado de parte de la maquinaria de *E. coli*. La necesidad de C104 para la coordinación de clúster fue confirmada también *in vitro* mediante experimentos de reconstitución con las proteínas purificadas, tanto en versiones con o sin etiqueta de afinidad (no mostrado). Es relevante destacar que tanto la forma FL como  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* y de *Tc1-C-Grx1* (Fleitas, 2012) parecen igualmente capaces de unir el clúster en los experimentos de reconstitución pero la holoforma de la proteína trunca es sustancialmente menos estable que en las proteínas FL y no fue posible analizar su comportamiento por técnicas espectroscópicas o hidrodinámicas (ver más adelante), por lo cual no fue incorporada en los estudios subsiguientes.

Un aspecto a destacar es que, a diferencia de las formas con etiqueta de afinidad (Comini et al., 2008), la sobreexpresión de la proteína de fusión conteniendo la *Tb1-C-Grx1* (Figura 4.1) -utilizada para los restantes experimentos de esta tesis- no determina la coloración del lisado celular, indicando que las mismas no son sustrato de la maquinaria de biogénesis de centros ferrosulfurados presente en *E. coli*. Es importante destacar que no se trata de un impedimento producto de la presencia del dominio Trx en posición aminoterminal ya que: *i*) la sobreexpresión de *Tb2-C-Grx1* en este mismo sistema (fusionada a *EcTrx*) produce una holo-proteína dimérica (Ceylan et al., 2010), la cual puede ser proteolizadas perfectamente recuperando inclusive una parte de la proteína aun en estado holo luego de la proteólisis (no mostrado), *ii*) se han expresado y purificado como holo-proteínas varias Grx monotiólicas que poseen dominios Trx en posición aminoterminal (ej. *ScGrx3* (Li et al., 2009) y *HsGrx3* (Haunhorst et al., 2010)) y *iii*) la sobreexpresión de *Tb1-C-Grx3*, que podemos considerarla una fusión natural entre un dominio Trx y *Tb1-C-Grx2*, permite la purificación de una holo-proteína dimérica en grandes cantidades (no mostrado). Sin embargo, en nuestro caso no fue posible purificar holo-proteínas para la forma FL ni tampoco para la forma  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* al ser expresadas como proteínas de fusión (no mostrado) y los mismos resultados se obtuvieron para la 1-C-Grx1 de *T. cruzi* (Fleitas, 2012), reforzando la idea de que hay aspectos conformacionales de la fusión entre *EcTrx* y 1-C-Grx1 que impiden que la proteína que sea reconocida por la maquinaria de biogénesis de centros ferrosulfurados presente en *E. coli* la cual, por su parte, es capaz de reconocer proteínas de los más diversos orígenes evolutivos (Picciocchi et al., 2007). En consecuencia, para analizar la holo-proteína producida "in vivo" (es decir, en la bacteria) recurrimos a la sobreexpresión de las versiones con etiqueta de afinidad desarrolladas en (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008; Manta et al., 2013a), como se mostró más arriba, mientras que para los experimentos *in vitro* usamos generalmente la forma purificada a partir de la proteólisis de la fusión (ver a continuación).

### 4.8.3. La coordinación del centro ferrosulfurado determina un cambio conformacional

El siguiente aspecto que abordamos fue el estado oligomérico de la forma holo ya que prácticamente todas las Grx son monoméricas y dimerizan en torno al clúster. Más arriba se comentó que Comini y colaboradores determinaron un peso moléculas muy similar para las forma apo y holo de *Tb1-C-Grx1* (Comini et al., 2008). Sin embargo, en el citado trabajo los autores usaron una columna de exclusión molecular de rango de resolución poco adecuado para los pesos moleculares esperadas (Superdex 200 10/300 GL), por lo cual en este trabajo decidimos reanalizar el estado oligomérico de esta proteína en forma holo tanto purificada directamente desde *E. coli* como luego de la reconstitución *in vitro*. Es importante destacar que los resultados que presentaremos a continuación fueron obtenidos en un momento que considerábamos que *Tb1-C-Grx1* era una proteína dimérica en su forma apo, lo cual hoy sabemos que no es así, por lo cual fueron re-interpretados considerando que la forma apo de *Tb1-C-Grx1FL* es una proteína monomérica con un comportamiento hidrodinámico anormal en SEC.

Al someter el eluido de la IMAC de las formas WT, C181 y C104S con etiqueta de afinidad a un paso cromatográfico en SEC podemos ver que para las formas WT y C181S se observan dos picos y que solo el pico de mayor peso molecular aparente posee absorbancia a 420 nm, donde generalmente absorben solo las especies con centros ferrosulfurados (Figura 4.14.A). Esto indica que una fracción de la proteína WT y C181S eluye de la columna en forma holo y con un peso molecular mayor a la forma apo. Para confirmar que la especie de mayor peso es consecuencia de la presencia del clúster, la holo-*Tb1-C-Grx1WT* purificada fue aislada y sembrada en una columna de SEC analítica previo tratamiento con EDTA o con amortiguador durante 30 min. Como se puede ver en la Figura 4.14.B, el quelante determina la desaparición de la forma de mayor peso molecular, confirmando que la misma depende de la presencia de un compuesto con hierro. Al analizar detalladamente los pesos moleculares de las especies holo identificadas por SEC vemos que las mismas se distribuyen entre 44 y 52 kDa ( $n=3$  para cada WT y  $n=2$  para C104S y C181S). Estos valores sugieren que la forma holo posee un radio hidrodinámico mayor que la forma apo, si bien no es concluyente que se trata de especies diméricas (ver más adelante).

### 4.8.4. *Tb1-C-Grx1* es capaz de ensamblar centros ferrosulfurados a expensas de tripanotión

Durante la realización de este trabajo participamos en el estudio de la coordinación de centros ferrosulfurados por la *Tb2-C-Grx1* de (Ceylan et al., 2010), donde demostramos que esta Grx de clase I es capaz de coordinar centros ferrosulfurados tanto "in vivo" como en ensayos de reconstitución *in vitro*. El aporte más relevante del trabajo fue demostrar que los tioles específicos de los tripanosomátidos, es decir, Gsp y T(SH)<sub>2</sub>, son capaces de suplantar al GSH en los ensayos de reconstitución *in vitro* y determinar a formación de holo-proteínas. La principal ventaja del ensayo de reconstitución es poder variar el tiol de bajo peso molecular que le ofrecemos a la proteína como ligando del clúster, situación que no podemos

controlar en la sobreexpresión en *E. coli* (ensayo "in vivo"). Es importante destacar dos aspectos técnicos de estos ensayos que, en nuestra opinión, determinan que nuestros resultados sean confiables: *i)* luego del ensayo de reconstitución la holo-proteína fue separada de los componentes de bajo peso molecular por gel filtración antes de realizar cualquier determinación espectroscópica, eliminando productos inespecíficos que también poseen propiedades espectral en la región del visible y pueden alterar sustancialmente el análisis del espectro de la holo-proteína (no mostrado) y *ii)* se trabajó con la proteína sin etiqueta de afinidad, para evitar posibles interferencia derivadas de la cola de histidinas. Además, en cada uno de los experimentos de reconstitución *in vitro* se realizaron los controles indicados en la sección Materiales y Métodos. Mediante esta aproximación pudimos demostrar que tanto la forma FL como  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* son capaces de ensamblar centros ferrosulfurados a expensas de GSH o Gsp (Figura 4.15.A) y que este último determina un rendimiento mayor, lo que puede deberse a quees mejor ligando para ensamblar el clúster sobre *Tb1-C-Grx1* o que el clúster formado es más estable. Más aún, al comparar los tres tioles de bajo peso molecular en un experimento idéntico y en paralelo podemos ver que el  $T(SH)_2$  es aún mejor sustrato para en ensamblado de FeS en *Tb1-C-Grx1* FL que los otros dos tioles (Figura 4.15.B). Análogamente a los reportado más arriba para las formas holo purificadas directamente de *E. coli* y contrario a lo que sucede con la mayoría de la demás Grx las formas holo producidas en los experimentos de reconstitución muestras también dos picos de peso molecular muy parecido al analizarlos por (Figura 4.14.C). El pico mayoritario corresponde a la proteína en su forma apo y eluye con un volumen de retención equivalente a  $\sim 30$  kDa, mientras que el pico minoritario posee absorbancia a 420 nm y eluye con un peso equivalente a una proteína de  $\sim 40$  kDa (Figura 4.15.C). Nuevamente, la forma apo y holo difieren en su peso molecular calculado, si bien los valores obtenidos para las formas holo ensambladas "in vivo" o durante la reconstitución no son equivalente, lo que sugieren que no son la misma especie.

#### **4.8.5. Estequiometría del cluster formado con tripanotión**

Más allá del estado de agregación de la forma holo, que discutiremos en detalle en la conclusión de esta sección, podemos suponer que *Tb1-C-Grx1* ensambla centros ferrosulfurados usando GSH o Gsp de manera análoga a otras Grx, ya que se trata de monotióles por lo cual -necesariamente- se precisan dos monómeros de *Tb1-C-Grx1* y dos monotióles para ofrecer las cuatro posiciones de coordinación necesarias. Sin embargo, la coordinación de centros ferrosulfurados usando  $T(SH)_2$  nos plantea la interrogante de cuál es la estequiometría de dichos centros ferrosulfurados, ya que una sola molécula del tiol puede ofrecer dos posiciones de coordinación (Comini et al., 2013). Para poder determinar esto es necesario purificar la holo-proteína. Generalmente, las Grx dimerizan en torno al clúster y, siempre y cuando la forma holo sea estable, es relativamente sencillo aislarla de la forma apo por técnicas sencillas como SEC u otras aproximaciones cromatográficas (Mapolelo et al., 2013; Zhang et al., 2013). Sin embargo, como se puede ver en las Figuras 4.14 y 4.15, la forma holo de *Tb1-C-Grx1* no posee un comportamiento hidrodinámico suficientemente diferente de la forma apo como para permitir su

separación por SEC y, adicionalmente, no es lo suficientemente estable para aplicar otras técnicas de separación. Esta característica de la holo-proteína nos impidió la purificación de la misma y la caracterización de la forma apo aislada, si bien lo intentamos en reiteradas oportunidades, en dos columnas de SEC distintas y variando propiedades del experimento como temperatura o flujo (no mostrado).

Para intentar resolver la estequiometría del centro ferrosulfurado formado en la reconstitución con  $T(SH)_2$  como ligando recurrimos, entonces, a la 2-C-Grx1. En un trabajo previo de nuestro grupo demostramos que la unión del clúster en esta proteína es extremadamente eficiente, determinando la dimerización de la misma (Ceylan et al., 2010) y permitiéndonos obtener la holo-proteína sin contaminantes de la forma apo (Manta et al., 2013a). Para determinar la concentración de  $T(SH)_2$  por mol de proteína pusimos a punto un método *in vitro* basado en la precipitación de la holo-proteína con ácido tricloroacético, neutralización y posterior determinación de la concentración de tioles por métodos colorimétricos. De esta manera pudimos determinar que la forma holo de 2-C-Grx1 obtenida *in vitro* por ensayos de reconstitución usando  $T(SH)_2$  como ligando tiene  $1.1 \pm 0.2$  moléculas de tripanotión por dímero ( $n=3$  no publicado), lo que sugiere una nueva estequiometría para la coordinación de FeS por Grx de tripanosomas, como se sugirió en (Comini et al., 2013). Más aún, en este trabajo pudimos determinar que el  $T(SH)_2$  puede sustentar el ensamblado *in vitro* de centros ferrosulfurados por el sistema de reconstitución quimio-enzimática *aún en ausencia de Grx* y que este compuesto tiene características espectroscópicas equivalentes a la forma holo de 2-C-Grx1 y 1-C-Grx1 (Manta et al., 2013a). Si bien aún desconocemos la naturaleza química y estequiometría de este compuesto de bajo peso molecular, resultados preliminares obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. M.K. Johnson<sup>69</sup> indican que está formado efectivamente por sulfuro, hierro y tripanotión y que posee propiedades espectrales propias de un tipo particular de centro ferrosulfurado. Más aun, mientras que la 2-C-Grx1 reducida (pero no oxidada) es capaz de unir estequiométricamente este compuesto, la Tb1-C-Grx1 no, indicando importantes diferencias en términos de estabilidad y reactividad entre las dos Grx de parásitos consideradas en esta sección (Manta et al., 2013a). Los resultados de reconstitución *in vitro* de FeS usando Gsp y  $T(SH)_2$  han sido realizados también con Tb1-C-Grx3 y Tb1-C-Grx2 con resultados similares, indicando que el uso de estos ligandos podría ser una propiedad conservada en Grx monotiólicas de *T. brucei* capaces de ensamblar centros ferrosulfurados.

---

<sup>69</sup> Los resultados obtenidos en la producción y purificación del holo-compuesto con  $T(SH)_2$  fueron publicados en (Manta et al., 2013d). Este compuesto es estable por horas en soluciones acuosas de pH alcalino aún en presencia de amortiguador fosfato y concentraciones de oxígeno en el orden de  $\sim 100 \mu M$ . Un clúster de bajo peso molecular fue recientemente propuesto para el GSH (Qi et al., 2012, 2013) lo que nos llevó a buscar caracterizar mejor este compuesto formado entre sulfuro hierro y tripanotión. Para ellos, establecimos una colaboración con el grupo del Dr. M.K. Johnson (University of Georgia, EUA). Los resultados preliminares indican que este compuesto tiene los 3 componentes antes mencionados, confirmando su carácter de "clúster" y que, probablemente, es una mezcla de formas tipo lineales  $[3Fe-4S]^+$  y  $[2Fe-2S]^{2+}$  (no mostrado).

#### 4.8.6. Conclusiones parciales y preguntas pendientes sobre la coordinación de centros ferrosulfurados en Grx de tripanosomas

En función de los resultados obtenidos por Filser y colaboradores (Filser et al., 2008), es muy probable que *Tb1-C-Grx1* sea capaz de coordinar centros ferrosulfurados *in vivo* a expensas de GSH, si bien queda aún por explicar porqué es sustancialmente menos efectiva en subrogar a *ScGrx5* que otras Grx monotiolicas. Una hipótesis es que, como las Grx monotiolicas que participan en la biogénesis mitocondrial de centros ferrosulfurados lo hacen como parte de complejos binarios o ternarios con otras proteínas (Uzarska et al., 2013) (ver capítulo final), la región NTE presente en *Tb1-C-Grx1* esté alterando su función en un sistema heterólogo, si bien esto requiere una demostración que aún no hemos hecho. Adicionalmente, en función de la poca información disponible sobre biogénesis de centros ferrosulfurados en tripanosomátidos (Manta et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010) aún no podemos estar seguros de que *Tb1-C-Grx1 in vivo* cumple un rol equivalente a *ScGrx5* ni podemos explicar porqué *1-C-Grx2* no puede suplantarla. Estos puntos serán retomados en el capítulo 6.

Nuestros resultados muestran que tanto la forma WT como C181S de *Tb1-C-Grx1* se purifican de *E. coli* como holo-proteínas. Al analizar el eluido de la IMAC vemos que se obtiene tanto la forma apo como holo y que la primera es muy mayoritaria. Dado que un procedimiento de expresión análogo puede sustentar la expresión de grandes cantidades de holo-proteína para varias Grx distintas, incluyendo proteínas de parásitos como la 2-C-Grx1 (Ceylan et al., 2010) o las formas con o sin etiqueta de afinidad de *Tb1-C-Grx3* (no mostrado), suponemos que la abundancia de forma apo es consecuencia de: *i*) la descomposición de la forma holo durante la purificación y/o *ii*) la dificultad de maquinaria bacteriana para ensamblar un FeS en *Tb1-C-Grx1*. Es importante destacar que nunca fue posible recuperar una proporción de forma holo >15% para *Tb1-C-Grx1* si bien todos los amortiguadores fueron profusamente degaseados con argón y, en algunos casos, suplementados con GSH 10 mM, lo que ha sido indicado como un factor estabilizante durante la purificación de varias holo-Grx (Couturier et al., 2011; Lillig et al., 2005; Rouhier et al., 2007) y, a su vez, fue probado que estabiliza el clúster ensamblado *in vitro* en *Tb1-C-Grx1* (Comini et al., 2008). Esto sugiere que el centro ferrosulfurado ensamblado en *Tb1-C-Grx1* es más lábil que el presente en otras proteínas, lo cual puede deberse a un rol de la región NTE en el proceso de ensamblado o en la estabilización del FeS, pero por el momento no poseemos información para probarlo.

El sistema de reconstitución *in vitro* basado en la desulfurasa de cisteína como dador de sulfuro fue desarrollado en 2007 (Berndt et al., 2007) con el objetivo de suplantar sistemas puramente químicos usados desde los '70 para la reconstitución de centros ferrosulfurados en ferredoxinas y otras proteínas con centros ferrosulfurados (Suhara et al., 1974). Desde entonces ha sido utilizado con éxito en decenas de casos (por ej. (Boutigny et al., 2013; Bräutigam et al., 2011; Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Haunhorst et al., 2010; Manta et al., 2013a; Mapolelo et al., 2013; Picciocchi et al., 2007; Ye et al., 2010; Yeung et al., 2011)) y se popularizó básicamente por dos motivos: el primero es su practicidad y versatilidad para usar en ensayos con cualquier proteína, inclusive aquellas que no se purifican como

holo-proteínas, como puede ser nuestro caso y el segundo es que, a raíz de algunos trabajos claves en el área (Bandyopadhyay et al., 2008; Johansson et al., 2007; Picciocchi et al., 2007; Rouhier et al., 2007), las Grx monotiólicas como la *AtGrxS14*, *ScGrx5* o equivalente fueron consideradas como proteínas de andamiaje (“scaffold”) para la biogénesis de centros ferrosulfurados, lo que hacía perfectamente lógico que las misma pudieran recibir y estabilizar un clúster naciente generado en un sistema *in vitro*. Sin embargo, ambas observaciones fueron refutadas en el correr del último año y el nuevo panorama nos ayuda a explicar mejor los resultados obtenidos en esta tesis. Primeramente, Zhang y colaboradores demostraron que los ensayos de reconstitución *in vitro* como los usados en esta tesis -y en los trabajos mencionados- determinan la formación de al menos tres especies de clústers diferentes sobre la Grx, siendo el clúster lineal de estequiometría  $[3\text{Fe-4S}]^+$  la forma más abundante, mientras que los clúster  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  y  $[4\text{Fe-4S}]^+$  son minoritarios (Zhang et al., 2013). En segundo lugar, como se discutirá en el capítulo final, las Grx monotiólicas con función en la biogénesis de centros ferrosulfurados no son proteínas “scaffold” sino que funcionan en complejo con chaperonas específicas, recibiendo un clúster  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  de la proteína “scaffold” tipo U (IscU o equivalente) y transfiriéndolo rápida y específicamente a proteínas que se encuentran río abajo (Mapolelo et al., 2013; Uzarska et al., 2013). Todas las versiones ensayadas de *Tb1-C-Grx1* son capaces de oficiar como “andamiaje” (ver a continuación) para el ensamblado de centros ferrosulfurados en el sistema *in vitro*, si bien solo el clúster formado en las proteínas de largo completo (con la región NTE) es lo suficientemente estable para resistir el análisis por SEC.

Al considerar los pesos moleculares de las formas holo obtenidas a partir de la sobreexpresión en *E. coli* respecto de las formas holo obtenidas a partir de la reconstitución *in vitro* vemos que hay diferencias sustanciales y que, adicionalmente, ninguna de ellas posee un peso molecular equivalente a una forma dimérica, a no ser que consideremos cambios conformacionales importantes en cada uno de los monómeros durante la dimerización en torno al centro ferrosulfurado. Una situación de igual complejidad fue obtenida al comparar las holo-proteínas reconstituídas o purificadas en otras Grx (por ej. *EcGrx4* (Yeung et al., 2011) y *HsGrx2* (Lillig et al., 2005)). Teniendo en cuenta lo comentado en el punto anterior y considerando a *Tb1-C-Grx1* como una proteína monomérica, podemos especular que la forma holo obtenida de *E. coli* corresponde a una especie dimérica, coordinando un centro ferrosulfurado de tipo  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$  en base a los residuos C104 y dos moléculas de GSH unidas al clúster e interaccionando débilmente con el dominio Grx (ver próximo capítulo). La dimerización determina una especie de ~50 kDa por lo cual suponemos que la región NTE de ambos monómeros adopta una conformación distinta de la que adopta en la apo-*Tb1-C-Grx1*, plegándose sobre el dominio Grx. Especulamos que este “plegamiento” o compactamiento de la región NTE inducido por el clúster se da dentro del mismo monómero ya que en el caso contrario esperaríamos que la forma dimérica fuera más estable de lo que se observa. Por el contrario, la forma dimérica es muy poco estable, sugiriendo una ubicación poco favorable de la región NTE o una desorganización del sitio de unión de GSH (ver a continuación). En el caso de la forma holo obtenida en los ensayos de reconstitución, en base a lo reportado en (Zhang et al., 2013), a resultados preliminares obtenidos en la reconstitución de clústers sobre  $\text{T(SH)}_2$  en ausencia de

proteína (no mostrado) y a la menor diferencia de peso molecular respecto a la forma apo, podemos especular que está la holo-Grx de ~40 kDa identificada en estos casos está formada por la forma *monomérica* de Tb1-C-Grx1 coordinando un centro ferrosulfurado más grande y de tipo lineal. En esta forma holo, además, la región NTE juega un rol, ya sea ocupando algunas de las posiciones de coordinación del clúster en la zona lejana al sitio activo o estructurando el sitio de unión del tiol de bajo peso molecular. Esta última hipótesis tiene sustento en que la forma trunca, si bien tiene un clúster, lo hace de manera extremadamente lábil. Adicionalmente, los resultados estructurales preliminares sugieren que hay sutiles diferencias en el surco de unión a GSH en la proteína trunca o de largo completo. Estas posibles explicaciones se resumen en la Figura 4.16.

En conclusión, hay evidencias *in vitro* e "in vivo" de que Tb1-C-Grx1 puede coordinar de manera transitoria un centro ferrosulfurado y que depende de la C104 y alguno de los tres tioles de bajo peso molecular presentes en tripanosomátidos. La cisteína C181 parece no participar en este mecanismo. Es dable suponer que cumple una función equivalente a ScGrx5, si bien hay aspectos conformacionales y funcionales que aún quedan por resolver, en particular en lo que hace al posible rol de la región NTE en la coordinación de estos cofactores, su transferencia o en la interacción con chaperonas específicas de la mitocondria de estos parásitos.

## **Capítulo 5**

### **Estructura de la forma trunca de *Tb1-C-Grx1* y comparación con otras glutarredoxinas**

## 5.1. Información estructural disponible para glutarredoxinas

Al momento de comenzar este trabajo (principios de 2009) la información estructural sobre Grx con la cual se contaba estaba principalmente concentrada en Grx ditiólicas de clase I como *EcGrx1* y Grx de origen viral. A su vez, las únicas dos estructuras disponibles de Grx en forma holo correspondían a Grx ditiólicas (Johansson et al., 2007; Rouhier et al., 2007). En la actualidad<sup>70</sup> en el Protein Data Bank hay depositadas 92 estructuras reportadas como “glutarredoxin”, de las cuales solo 52 corresponden a Grx y las restantes a NrdH, Trx, TGR o proteínas con dominio SH3BG (no mostrado). Estas 52 estructuras representan 34 proteínas de 18 organismos distintos y más de la mitad fue reportada durante el curso de este trabajo (Figura 5.1). La mayoría de las estructuras disponibles proviene de Grx de clase I y sitio activo ditiólico las cuales son generalmente proteínas monoméricas que se producen con alto rendimiento en sistemas procariotas y son extremadamente solubles, lo cual ha hecho de estas proteínas modelos ideales para la técnica de NMR, determinando que el 37% de las estructuras de Grx hayan sido resueltas por esta técnica mientras que este porcentaje cae a 10% si consideramos todas las estructuras en el Protein Data Bank. Las únicas estructuras disponibles de dominios Grx de proteínas multidominio han sido resueltas aisladas del resto de la proteína, por lo cual no se posee información estructural completa sobre este subgrupo de Grx<sup>71</sup>. Respecto a las condiciones en las cuales se han obtenido las estructuras, para aquellas que fueron resueltas por cristalización y difracción de rayos X hay una ligera tendencia a obtener cristales en condiciones de pH neutro a alcalino (Figura 5.1) y en presencia de sales de sulfato (no mostrado), mientras que la mayoría de las estructuras obtenidas por NMR se resolvieron en amortiguadores de pH 6-7, que son ideales para esta técnica ya que se minimiza el intercambio de protones amídicos con el solvente (no mostrado). Finalmente, la información estructural disponible se limita a proteínas de unos pocos organismos modelo como *S. cerevisiae* y *E. coli* y hasta este trabajo no se poseía información estructural sobre Grx de protozoarios.

## 5.2. Ensayos de cristalogénesis con *Tb1-C-Grx1* y versiones mutantes

Obtener la estructura de *Tb1-C-Grx1*, ya sea en su forma apo u holo, fue uno de los objetivos centrales de esta Tesis y le dedicamos una parte muy importante del tiempo. Las singularidades estructurales y de secuencia de esta proteína (Capítulo 3), así como la capacidad de coordinar FeS a expensas de T(SH)<sub>2</sub> comentadas en el capítulo anterior determinaron que se tratara de una estructura muy atractiva por sus posibles diferencias con otras Grx conocidas y con las otras oxidoreductasas de tripanosomas comentadas en el Capítulo 2. El primer abordaje que tomamos para resolver la estructura de *Tb1-C-Grx1*

---

<sup>70</sup> Actualizado a Agosto de 2013.

<sup>71</sup> El grupo del Dr. Bellanda resolvió la estructura de *Tb1-C-Grx3* (ver Figura B8) completa por NMR (no publicado). También es relevante destacar que no existe información estructural sobre ninguna Grx de clase III (sitio activo CCXC/S) ya que aun no se ha logrado su producción en sistemas recombinantes, probablemente debido a una extensión hidrofóbica carboxiloterminale asociada a la interacción con factores de transcripción (Couturier et al., 2010).

fue la cristalografía de proteínas, en parte por la disponibilidad del equipamiento para cristalogénesis y difracción en el Institut Pasteur de Montevideo pero, fundamentalmente, por la posibilidad de recibir apoyo y entrenamiento por parte del personal altamente calificado de la Unidad de Cristalografía de Proteínas (PXF), lo que estaba considerado como parte esencial del proceso formativo de esta Tesis. El procedimiento experimental fue el habitual para los casos donde se intenta cristalizar una proteína no estudiada previamente. Brevemente, las diferentes versiones de proteína utilizadas fueron purificadas como se indicó previamente y preparadas en el amortiguador adecuado para los ensayos de cristalogénesis (generalmente Tris 20 mM pH 7.5-8 con o sin 50 mM NaCl) en presencia o no de otros componentes como ser GSH, T(SH)<sub>2</sub> o β-mercaptoetanol. Las proteínas fueron luego concentradas por ultrafiltración y, previo a la realización de los cribados robotizados, se realizó un ensayo manual de solubilidad probando al menos dos concentraciones de proteína en el sistema de gota colgante durante 24 hrs. Una vez determinadas las condiciones adecuadas para comenzar el cribado (concentración de proteína, pH del amortiguador, aditivos, etc.) el mismo se realizó de manera automatizada usando kits comerciales que exploran hasta 384 diferentes condiciones de cristalización por vez, en sistema de gota sentada y, generalmente, con gotas de 0.3 μL de muestra de proteína y 0.3 μL de reservorio, en equilibrio de vapor con 400 μL de reservorio. Las placas fueron observadas periódicamente por personal de la PXF y las condiciones prometedoras fueron replicadas manualmente en el sistema de gota colgante sobre vidrios siliconados variando diferentes aspectos de la condición inicial como ser concentración de proteína, pH del amortiguador, concentración de precipitante, relación de volúmenes entre gota y reservorio, etc.

Se realizaron cribados de cristalización con diferentes versiones de *Tb* y *Tc1-C-Grx1*, de largo completo o Δ76, con y sin etiqueta de afinidad, mutantes de cisteínas y, en algunos casos, tratando las proteínas previamente con GSSG para lograr su alquilación/oxidación (Capítulo 4). En la mayoría de los cribados se obtuvieron unas pocas condiciones donde crecieron formas cristalinas, mayoritariamente esferulitas o pequeñas espículas (no mostrado). En estos casos se intentó la reproducción y optimización manual en el sistema de gota colgante de las condiciones de cristalogénesis, recurriendo inclusive a técnicas de microsembrado ("microseeding") partiendo de fragmentos de cristales que crecieron en las placas del cribado robótico (no mostrado). En ningún caso logramos crecer cristales de *Tb1-C-Grx1* o *Tc1-C-Grx1* que fueran adecuados para difracción de rayos X. Sin embargo, los resultados del gran número de condiciones de cristalización probadas en los cribados (>1300) y de su seguimiento en el tiempo poseen *en sí mismo* información valiosa sobre la naturaleza fisicoquímica de estas proteínas, que podemos resumir en los siguientes puntos: *i*) tanto la forma FL como Δ76 son extremadamente solubles, llegando a concentraciones de ~100 mg/mL (~6 y 8 mM, respectivamente) sin precipitación evidente, lo que coincide con la información reportada para otras Grx monoméricas, como se comentó más arriba; *ii*) el estado de agregación de ambas versiones de la proteína, ensayado por SEC o DLS, no cambia sensiblemente a concentraciones ~10 mg/mL respecto de las usadas normalmente en los experimentos bioquímicos (~0.1-0.5 mg/mL, no mostrado); *iii*) la mayoría de las condiciones de cristalización a pH inferior a 5 determinan la precipitación de la(s) proteína(s), independientemente de la naturaleza del

amortiguador y de la presencia o no de aditivos, lo que ya había sido reportado por (Melchers et al., 2007) y confirmado en nuestro caso<sup>72</sup>; iv) todas las condiciones en las cuales aparecieron formas cristalinas poseen pH en el rango 8-9 dado por amortiguadores orgánicos como Tris o HEPES y no por sales de fosfato y v) en todas las condiciones en las cuales aparecieron formas cristalinas está presente como aditivo una sal de Ni<sup>2+</sup> o Li<sup>+</sup>. Es interesante destacar que el Li<sup>+</sup> y el Ni<sup>2+</sup> en sus formas de coordinación octaédricas (C.N.=6) poseen radios iónicos similares (76 y 69 pm, respectivamente (Shannon, 1976)) lo que podría sugerir que *Tb1-C-Grx1* interacciona con estos metales en un sitio de geometría conservada aún no identificado. En conclusión, este conjunto de resultados sugiere que trabajando finamente las condiciones de cristalogénesis sería factible mejorar la calidad y el tamaño de los cristales obtenidos para *Tb1-C-Grx1*. Aún así, el éxito de esta estrategia tiene asociado un importante grado de incertidumbre. Debido a esto, y aprovechando el hecho de contar con una forma de menor peso molecular de *Tb1-C-Grx1* adecuada para el análisis por NMR (mutante  $\Delta 76$ , Capítulo 4), nos inclinamos por esta técnica para resolver la estructura de esta proteína y analizar su interacción con ligandos.

### **5.3. Resolución de la estructura de *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$ por resonancia magnética nuclear**

La resolución de la estructura de *Tb1-C-Grx1* por NMR fue realizada en colaboración con el Dr. Massimo Bellanda (Universidad de Pádova, Italia) y fue parte del trabajo de Tesis del Dr. Carlo Pavan (Pavan, 2012). El grupo del Dr. Bellanda realizó los experimentos de asignación y la resolución de la estructura por el procedimiento experimental que se resume brevemente en la sección Materiales y Métodos (por más información, ver (Manta et al., 2013a)). Nuestro grupo, por su parte, llevó a cabo el análisis de la estructura y su discusión en el contexto de los demás resultados. En el trabajo original (Manta et al., 2013a) la estructura de *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  (PDB ID 2LTK) fue comparada fundamentalmente contra la estructura de *EcGrx4* (PDB ID 1YKA, (Fladvad et al., 2005)), una Grx de clase II y sitio activo CGFS. En este capítulo ampliamos y profundizamos el estudio estructural de esta proteína respecto a lo publicado en nuestros trabajos previos (Comini et al., 2013; Manta et al., 2013a), haciendo hincapié en las características estructurales que distinguen a *1-C-Grx1* de otras Grx de clase I y II y permiten comprender los resultados mostrados en el Capítulos 3 y 4. A su vez, en la última parte se presentarán resultados no publicados sobre la estructura de la forma FL de *Tb1-C-Grx1* y la posible relación de la región NTE con el dominio Grx.

---

<sup>72</sup> En este trabajo analizamos la estabilidad por pH de *Tb1-C-Grx1* FL y  $\Delta 76$  por espectroscopía y fluorimetría y efectivamente, la proteína muestra signos de precipitación a pH <5, evidenciados como un incremento en el cociente Abs 320 nm/Abs 400 nm y un incremento lineal en la Abs 280 nm. Sin embargo, el efecto es dependiente de la concentración de proteína y el tiempo de exposición a los pH extremos (no mostrado). Vale aclarar que en los experimentos de determinación de pKa mostrados en la sección anterior se realizaron controles adecuados para asegurar que la proteína estuviera correctamente plegada en el curso del ensayo.

Al momento de comenzar los experimentos tendientes a resolver la estructura por NMR interpretábamos que *Tb1-C-Grx1* FL era una proteína dimerica de ~32 kDa y con regiones de gran flexibilidad (ver Capítulo 4). Tanto el tamaño como las regiones flexibles constituían una limitante para poder resolver la estructura de la proteína por NMNMR por lo cual optamos, en una primera instancia, por resolver la forma trunca ( $\Delta 76$ ) y sin etiqueta de afinidad ya que esta se comportaba como una proteína monomérica de ~15 kDa. Para ello, la proteína recombinante fue producida con marcación isotópica de  $^{15}\text{N}$  o  $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$  y purificada como se describe en el Capítulo 8, confirmando la marcación homogénea por MS (no mostrado). Inicialmente se ensayaron diferentes condiciones experimentales variando la concentración de proteína (0.7-1.2 mM), el pH del amortiguador fosfato de sodio 50 mM (6.0-7.2), la fuerza iónica (50-150 mM NaCl) y la presencia o no de reductor (DTT), optándose finalmente por coleccionar los espectros a una concentración de proteína de 1 mM y en amortiguador pH 7.0 con 150 mM NaCl, 5 mM DTT y 90%/10% de  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , respectivamente, ya que a pH 6 o sin agente reductor la proteína tenía tendencia a la agregación durante el tiempo necesario para la adquisición de los datos (horas-días)<sup>73</sup>. En estas condiciones se obtuvo un espectro 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC de *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  de muy buena calidad, propio de una proteína plegada y con un número de picos muy similar al número total de aminoácidos (Figura 5.2.A), lo que permitió la asignación casi completa de todas las resonancias. Posteriormente se realizó el doble marcado y también se obtuvieron espectros de excelente calidad (Figura 5.2.B), permitiendo la realización de experimentos 3D y, posteriormente, la resolución de la estructura (ver a continuación). Los detalles técnicos sobre los experimentos usados en la resolución y los programas usados en el cálculo de la estructura se detallan en (Manta et al., 2013a).

#### 5.4. Topología y estructura general de *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$

La topología de la proteína y la disposición espacial de los elementos de estructura secundaria se muestran en la Figura 5.3.A. La estructura de *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  posee el típico plegamiento Trx, caracterizado por una lámina  $\beta$  central formada por las hebras  $\beta 1$  (residuos 91-95),  $\beta 2$  (residuos 122-125),  $\beta 3$  (residuos 147-150) y  $\beta 4$  (residuos 153-157), rodeada de 5 hélices  $\alpha$  ( $\alpha 1$ , residuos 78-89,  $\alpha 2$  residuos 104-117,  $\alpha 3$  residuos 129-139,  $\alpha 4$  residuos 158-167 y  $\alpha 5$  residuos 169-178) (Figura 5.3.B). *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  comienza en M77, siendo V78 el primer residuo ubicado en un elemento de estructura secundaria (hélice  $\alpha 1$ ). En la estructura se ven los residuos G75 y A76 previos a M77, los cuales derivan del vector de expresión (Figura 4.1). La posición A76 está conservada en la proteína madura, mientras que en el lugar de G75 el gen de *T. brucei* 1-C-Grx1 codifica para una isoleucina. Las hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$  se ubican a un lado de la lámina  $\beta$  y prácticamente ortogonales entre ellas. Las restantes hélices se ubican sobre la cara opuesta de la lámina  $\beta$ , con  $\alpha 2$  y  $\alpha 4$  paralelas entre sí. Las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$ , continuas en secuencia, se disponen una perpendicular de la otra. Este arreglo está facilitado por la presencia del residuo

<sup>73</sup> Es interesante destacar que la versión doble mutante C104/181S no fue estable en este amortiguador a ninguna de las concentraciones ensayadas (0,1-1 mM) ni tampoco en presencia de 50 mM de cada uno de los aminoácidos arginina y ácido glutámico (no mostrado).

conservado G168 y determina un patrón estructural característico de Grx (ver próximas Figuras). Todas las hélices son anfipáticas, con el lado hidrofóbico posicionado hacia el interior de la proteína, formando una extensa red de interacciones hidrofóbicas, mayoritariamente conservadas entre Grx. Es evidente la presencia de un *loop* entre  $\beta 1$  y  $\alpha 2$  previo al sitio activo (residuos 96-103), característico de las Grx de clase II (Figura 5.3.A-B, (Comini et al., 2013; Iwema et al., 2009; Johansson et al., 2010; Li et al., 2010a; Mesecke et al., 2008). Si bien este *loop* es conservado en Grx de clase II los pequeños elementos de estructura secundaria presentes *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  no, por lo cual no se numeran permitiendo de esa manera mantener la numeración original del plegamiento Trx. Al final de la hebra se presenta un “ $\beta$ -bulge” (Richardson et al., 1978) que determina que esta hebra esté significativamente torneada respecto del plano formado por las otras tres (Figura 5.3.B-C). El “ $\beta$ -bulge” no está conservado en otras estructuras de Grx pero sí en algunas estructuras de Trx (no mostrado). El residuo C104 está localizado en el extremo aminoterminal de la hélice  $\alpha 2$ , como sucede en todas las proteínas con plegamiento Trx (Collet and Messens, 2010; Martin, 1995) y las dos cisteínas presentes en la proteína (C104 y C181) están en la superficie de la proteína, si bien solo la cadena lateral de C104 presenta una accesibilidad al solvente propia de un grupo expuesto, mientras que la cadena lateral de C181 no (calculado con el programa GETAREA<sup>74</sup> (Fraczkiewicz and Braun, 1998) no mostrado). La cisteína C181, por su parte, se encuentra en una zona de potencial electrostático marcadamente negativo otorgado por una importante densidad de residuos ácidos mientras que la cara opuesta de la proteína, donde se ubica la C104, se destaca por poseer varios residuos con cargas positivas (Manta et al., 2013a)). La superposición de los 20 conformeros de menor energía obtenidos durante el cálculo de la estructura muestra que la proteína es mayoritariamente rígida (Figura 5.3.D), con una desviación cuadrática media (rmsd, por sus siglas en inglés) de  $0.54 \pm 0.12$  Å y con unas pocas regiones donde es evidente una mayor dispersión conformacional, como veremos en las próximas secciones (Figura 5.3.E).

## 5.5. Búsqueda de homólogos estructurales de *Tb1-C-Grx1*

En las próximas secciones se analizarán detalladamente algunas propiedades de la estructura de *Tb1-C-Grx1* y, en particular, ciertas regiones que presentan singularidades que nos permiten especular sobre las bases estructurales de su reactividad con oxidantes y la coordinación de centros ferrosulfurados. Estos estudios se basaron, en gran parte, en el análisis comparativo de *Tb1-C-Grx1* con otras proteínas estructuralmente homólogas y para las cuales se dispone de información adicional de origen bioquímico o biológico. Si bien todas las estructuras de la Figura 5.1 representan proteínas de la familia Grx, la identidad a nivel de secuencia entre ellas y *Tb1-C-Grx1* es baja (~20 % en promedio, no mostrado) por lo que la selección de la estructura(s) apropiada(s) para llevar a cabo este análisis comparativo no es trivial. En consecuencia, para elegir los mejores homólogos estructurales recurrimos al servidor DALI (Holm and Rosenström, 2010; Holm et al., 2008), el cual, además de ser uno de los más utilizados para comparación

<sup>74</sup> <http://curie.utmb.edu/getarea.html>

estructural, fue empleado con éxito en la caracterización de nuevas estructuras de Grx (Fladvad et al., 2005).

El servidor DALI realiza la comparación de la estructura de interés (en formato PDB) contra el total de la base de datos depositada en el Protein Data Bank, otorgando una lista de "hits" ordenada por un índice propio denominado "Z-score", el cual va desde valores superiores a 20 para estructuras prácticamente idénticas (por ejemplo, dos cadenas de un homodímero en la misma estructura) hasta un límite inferior de 2. Dentro de esta región se considera que las estructuras tienen una identidad significativa y, generalmente, comparten plegamiento (Holm et al., 2008). Al realizar este análisis con la estructura obtenida en este trabajo (PDB ID 2LTK) se recuperan 952 estructuras por encima del umbral, incluyendo redundancias derivadas del hecho que cada cadena polipeptídica es tratada por DALI como una unidad independiente. En esta lista se encuentran todas las estructuras de Grx consideradas en la Figura 5.1 así como los dominios Grx presentes en proteínas relacionadas como GST y estructuras de plegamiento Trx que presentan identidad de secuencia tanto con Trx como con Grx. Este dato refleja la importante conservación estructural de las proteínas con plegamiento Trx, ya comentada en el Capítulo 2, pero dificulta la selección de los homólogos estructurales adecuados. Al analizar en detalle el valor de Z-score obtenido para todos los resultados positivos en comparación el valor de rmsd (en Å) y la identidad de secuencia (%ID), podemos ver que la mayoría de las estructuras se nuclean en torno al Z-score promedio ( $6.3 \pm 2.3$ ) y poseen un rmsd de  $2.9 \pm 0.4$  Å respecto de 2LTK (Figura 5.4.A). A su vez, luego de las primeras 15 posiciones la identidad de secuencia tiene una marcada caída y se estabiliza en el entorno del 15% (Figura 5.4.A). Todas las estructuras que aparecen en las primeras 70 posiciones han sido anotadas como Grx o dominios con plegamiento Grx de proteínas multidominio como TGR<sup>75</sup> y su inspección caso a caso confirma la asignación, inclusive en algunas estructuras derivadas de proyectos de genómica estructural para las cuales no se posee información adicional (no mostrado). El límite de las Grx se puede establecer en la posición 72 donde aparece la estructura de SH3BRGL3 (PDB ID 1T1V), una proteína similar a las Grx pero sin motivo CxxC que fue mencionada en el Capítulo B (Nardini et al., 2004) (Figura 5.4.B). Varias de las estructuras de proteínas monodominio identificadas por debajo de esta posición corresponden a Trx de sitio activo poco canónico o NrdH (no mostrado).

Dada la importante similitud estructural de las proteínas con plegamiento Trx podemos considerar un límite más exigente que el introducido por defecto en la primera búsqueda. Un criterio usual propuesto por los autores de DALI es considerar solo aquellos "hits" con Z-score mayor a  $(n/10)-4$ , siendo n el número de aminoácidos de la proteína sonda (Holm et al., 2008). En nuestro caso ( $n=110$ ) esto determina un corte en 7. En función de ello y para considerar solo las estructuras más relevantes elegimos un criterio aún más exigente de  $Z\text{-score} \geq 10$ , solo superado por 60 "hits" con una rmsd de  $2.3 \pm 0.3$  Å (Figura 5.4.B), menor al promedio. Al analizar esta lista vemos que solo las primeras 52 posiciones pertenecen a

---

<sup>75</sup> Es interesante destacar que los dominios Grx presentes en TGR de platelmintos y mamíferos poseen un Z-score sustancialmente mayor que los dominios Grx presentes en GST, indicando que los primeros son estructuralmente más similares a *Tb1-C-Grx1Δ76* que los segundos, si bien a nivel de secuencia la relación es la opuesta (no mostrado).

Grx, correspondientes a 35 estructuras de 24 proteínas distintas, todas incluidas en la Figura 5.1. Hay varios aspectos relevantes a destacar en los “hits” que aparecen como mejores homólogos estructurales de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 (ver Figura 5.5 más adelante) En primer lugar, las proteínas que presentan mayor identidad estructural con el dominio Grx de *Tb1-C-Grx1* son representantes prototípicos de Grx de clase II, con sitios activos CGFS y el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 conservado (Figura 5.4.C. Entre ellas se destaca las estructura de *ScGrx5* (PDB ID 3GX8), *GrxS14* de *A. thaliana* (PDB ID 3IPZ (Li et al., 2010a) y *P. trichocarpa* (PDB ID 2LKU (Wang et al., 2011)), el primer (PDB ID 3ZYW, no publicado) y segundo (PDB ID 2YAN, no publicado) dominio Grx de la Grx3/PICOT humana (Haunhorst et al., 2010) y, las formas holo de *HsGrx5* (PDB ID 2WUL, (Johansson et al., 2010) y de *EcGrx4* (PDB ID 2WCI, (Iwema et al., 2009)). Todas las estructuras mencionadas más arriba pertenecen a organismos eucariotas, con la excepción de *EcGrx4*, la cual -sin embargo- solo alinea adecuadamente con *Tb1-C-Grx1* en su forma holo y no en su forma apo (PDB ID 1YKA, (Fladvad et al., 2005)). Esta sutil diferencia posee información relevante ya que, al comparar ambas estructuras es evidente que la mayor diferencia se da en la ubicación del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 precedente al sitio activo el cual adopta una conformación “eucariota” equivalente -por ejemplo- a la presente en la forma holo de *HsGrx5* como consecuencia de interacciones con la otra subunidad del dímero (Iwema et al., 2009; Johansson et al., 2010). Este cambio en el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 determina, además, que la porción aminoterminal de la hélice $\alpha$ 2 se estructure llevando la cisteína del sitio activo (C30) a la posición conservada (Figura 5.4.D). En segundo lugar, el análisis de DALI muestra que varias Grx de clase I presentan un excelente alineamiento estructural con *Tb1-C-Grx1*, entre las que destaca algunas Grx de plantas como *Populus tremula x tremuloides* *GrxS12* (PDB ID 3FZ9 y 3FZA, (Couturier et al., 2009)) y *AtGrxC5* (PDB ID 3RHB para la forma apo y y 3RHC para la forma holo (Couturier et al., 2011)), las Grx ditiólicas de levaduras *ScGrx1* y *ScGrx2* (PDB ID 3C15 (Yu et al., 2008)) y 3CTG (Li et al., 2010b)) y la Grx ditiólica mitocondrial humana *Grx2* (Figura 5.5). Nuevamente, se trata de proteínas de organismos eucariotas y recién en valores de Z-score cercanos al límite inferior considerado en este trabajo (Z-score  $\geq$ 10) aparecen Grx de clase I bacterianas o virales.

En función de estos resultados y para llevar a cabo la comparación estructural contra *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 se seleccionaron las estructuras de las proteínas indicadas en la Figura 5.5 y tratadas a continuación. Como modelo de Grx de clase II se seleccionó a las proteínas *Grx5* y *GrxS14*. La primera es la Grx monotiólica mejor caracterizada, para la cual además existen decenas de artículos sobre su función biológica (por ej. (Bellí et al., 2002, 2004; Rodríguez-Manzaneque et al., 2002; Sagemark et al., 2007; Shakamuri et al., 2012; Tamarit et al., 2003; Wingert et al., 2005; Ye et al., 2010)) así como estructuras representativas de la forma apo (*ScGrx5*, PDB ID 3GX8 (Wang et al., 2009)) y holo (*HsGrx5*, PDB ID 2WUL (Johansson et al., 2010)). Si bien ambas proteínas pertenecen a distintas especies, poseen un 48% de identidad de secuencia entre ellas y sus estructuras son superponibles en prácticamente toda su extensión (rmsd de 1.4 Å) presentando las mayores diferencia en el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2, el *cis-Pro loop* y la ubicación de la hélice $\alpha$ 1 (Figura 5.4.E). Generalmente las comparaciones las realizaremos con la estructura 2WUL ya que: *i*) presenta un rmsd respecto de 2LTK más bajo (Figura 5.5), *ii*) el sitio activo está mejor estructurado con la cisteína del sitio activo (C67) en posición aminoterminal de la hélice $\alpha$ 2 (Figura 5.4.E) y *iii*) posee la ventaja adicional

de ser una estructura en forma holo (Figura 5.4.D). La segunda Grx de clase II considerada es la GrxS14 (ver Figura 3.5), ya que: *i*) está bien caracterizada desde el punto de vista biológico y bioquímico (Bandyopadhyay et al., 2008; Cheng et al., 2006; Li et al., 2010a; Mapolelo et al., 2013; Wang et al., 2011), *ii*) se conocen dos estructuras de proteínas estrechamente emparentadas resueltas por diferentes técnicas (82% de identidad, rmsd 2 Å, ver más adelante) y *iii*) hay evidencia experimental de cuáles son los residuos involucrados en la unión de centros ferrosulfurados (Wang et al., 2011). La Grx de clase I escogida para las comparaciones es la *HsGrx2*, ya que se han reportado estructuras tanto de su forma apo (PDB ID 2FLS, no publicado) como holo (PDB ID 2HT9 (Johansson et al., 2007)) (Figura 5.4.F), sumado a una importante cantidad de resultados bioquímicos y biológicos que facilitan la interpretación de los resultados estructurales (Berndt et al., 2007; Hoff et al., 2009; Lillig et al., 2005; Mitra and Elliott, 2009). Su identidad de secuencia y rmsd respecto de *Tb1-C-Grx1* es apenas superior al promedio de las estructuras de  $Z\text{-score} \geq 10$  (Figura 5.5). Adicionalmente, se conoce una tercera estructura para *HsGrx2* resuelta por NMR en su forma apo y sin ligando (PDB ID 2CQ9, no publicado) la cual, sin embargo, no la consideramos en esta sección ya que su rmsd respecto de 2LTK es de 3.4 Å, sustancialmente mayor al indicado anteriormente. Sin embargo, es interesante destacar que la mayor diferencia entre las dos formas apo de *HsGrx2* (PDB ID 2FLS y 2CQ9) se da en la conexión  $\beta 1 - \alpha 2$ , región donde las Grx de clase II poseen el *loop* conservado previo al sitio activo y que comentaremos extensamente más adelante (Figura 5.4.F).

## 5.6. Oligomerización en solución y dinámica de *Tb1-C-Grx1Δ76*

La dinámica del esqueleto de enlaces amida fue investigada mediante experimentos de relajación. El tiempo de correlación ( $\tau_c$ )<sup>76</sup> medido para *Tb1-C-Grx1Δ76* fue de  $7.9 \pm 0.6$  ns, equivalente al valor de 7.7 ns estimado por HYDRONMR (Bernadó et al., 2002) a partir de la estructura y correspondiente a una proteína de ~13 kDa. Esto confirma que la proteína es monomérica aún en las altas concentraciones usadas para NMR. El análisis de esta proteína por cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión estática de luz en múltiples ángulos (SEC-MALS, por sus siglas en inglés) arrojó un peso molecular de 13.3 kDa, contra un valor esperado de 12.3 kDa (no mostrado). En función del peso molecular medido podemos estimar que una proteína globular de esta masa tendría un radio hidrodinámico ( $r_H$ ) de 18.6 Å si estuviera completamente plegada y de 32.2 Å si estuviera completamente desplegada (Wilkins et al., 1999). El valor de  $r_H$  determinado para *Tb1-C-Grx1Δ76* fue de 19 Å, indicando

---

<sup>76</sup> Si bien este trabajo no ahonda en la técnica de NMR, para comprender mejor estos resultados es necesario definir mínimamente estos parámetros. El tiempo de correlación  $\tau_c$  se define como el tiempo necesario para que una molécula rote 1 radian sobre sí misma y, evidentemente, está relacionado a propiedades del medio (viscosidad, temperatura) y a propiedades de la molécula (forma, tamaño). Cuanto mayor sea la molécula, mayor será su valor de  $\tau_c$  por lo cual este dato es informativo del estado de agregación de la proteína y de su globularidad.  $T_1$  y  $T_2$  son medidas del tiempo que le toma a la señal (magnetización) retornar al estado de equilibrio termodinámico por relajación ( $T_1$ ) o el tiempo en el cual se da la pérdida de coherencia ( $T_2$ ). Estos parámetros se determinan por experimentos específicos que permiten evaluar las propiedades dinámicas de las proteínas en el rango de ps a ms (en base a Cap. 8 del libro "Understanding NMR Spectroscopy" de James Keeler, disponible en <http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/Irvine>).

que se trata de una proteína plegada y relativamente compacta, aunque de volumen hidrodinámico ligeramente superior al esperado según su secuencia, en coincidencia con los resultados de SEC presentados en el Capítulo 4. Las medidas de  $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ -NOE apuntan en la misma dirección, mostrando que la proteína es relativamente rígida y con un esqueleto de muy limitada dinámica conformacional a excepción de unos pocos residuos y los extremos amino- y carboxiloterminales (Figura 5.6.A-C) (ver a continuación). Estos resultados, si bien representan diferentes aproximaciones, son cualitativamente coincidentes con la dispersión conformacional de los 20 conformeros mostrados en la Figura 5.3.D.

El programa HYDRONMR (Bernadó et al., 2002) también provee de un método para calcular los valores de tiempos de relajación  $T_1$  y  $T_2$  a partir de una estructura proteica y la desviación entre los valores calculados y medidos puede ser relacionada a fenómenos de intercambio químico o movimientos internos en la proteína. Como se puede ver en la Figura 5.6.D, la comparación del cociente  $T_1/T_2$  entre los valores medidos y calculados muestra claramente que algunas regiones poseen valores experimentales sustancialmente más grandes que los calculados. Dejando de lado los extremos de la proteína la zona de mayor diferencia se concentra en torno a los residuos 136-145 pertenecientes al extremo carboxiloterminales de la hélice  $\alpha_3$  y al *loop*  $\alpha_3$ - $\beta_3$  lo que sugiere que esta región posee un intercambio conformacional en el rango de los  $\mu\text{s}$  (Figura 5.6.E). En coincidencia algunos de los residuos de esta región (S140, W142, T144 e I145) mostraron un ensanchamiento de sus picos en los espectros 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC (Figura 5.2). Es importante destacar que el *loop*  $\alpha_3$ - $\beta_3$  contiene el residuo de prolina conservado en todas las estructuras con plegamiento tiorredoxina (P146 en *Tb1-C-Grx1*) y que por este motivo recibe el nombre de "*cis-Pro loop*". Se trata de una región de largo y composición relativamente conservada en todas las Grx -a excepción de las de clase III (Couturier et al., 2010)- y que, en el caso particular de las Grx de clase II, generalmente contiene a otro residuo de prolina ubicado en un motivo WPT altamente conservado (Figura 5.5).

## 5.7. Dinámica conformacional del "*cis-Pro loop*"

La dinámica conformacional en el rango de los  $\mu\text{s}$  -ms en la región de *cis-Pro loop* no había sido previamente identificada para ninguna Grx y desconocemos si es un comportamiento conservado en otras proteínas de esta familia. A modo de comparación, el único caso de dinámica conformacional estudiado por NMR en esta familia es el de la Grx1 humana (clase I, sitio activo CPYC) en donde los autores demostraron que en ausencia de GSH (sustrato) la proteína no presenta regiones móviles con equilibrios conformacionales en los rangos de tiempo identificados para la dinámica conformacional del *cis-Pro loop* de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* (Jensen et al., 2011). A pesar de que la identidad de secuencia entre *Tb1-C-Grx1* y las estructuras de Grx que elegimos como homólogos estructurales es  $\sim 30\%$ , el esqueleto de las 5 estructuras es superponible sin grandes desviaciones y los elementos de estructura secundaria coinciden prácticamente en toda su extensión, incluyendo la hélice  $\alpha_3$  (Figura 5.7.A). Más aún, la posición de la *cis-Pro* es prácticamente idéntica en todas las estructuras, si bien la distancia entre este residuo y la cisteína

aminoterminal del sitio activo es más larga en Grx de clase II (~6 Å) que en Grx de clase I (~5 Å) (no mostrado)<sup>77</sup>. Otro residuo conservado en esta región es el residuo hidrofóbico previo a la *cis*-Pro (generalmente isoleucina) el cual ha sido indicado como un residuo clave en la modulación de la reactividad del sitio activo en proteínas con plegamiento Trx ya que se encuentra a corta distancia de la cisteína aminoterminal (generalmente <4Å) y es capaz de afectar tanto su posicionamiento como su ionización (Ren et al., 2009). Como era previsible en función de la distancia de los residuos de *cis*-Pro, en las Grx de clase I se conserva una geometría “tipo tiorredoxina” con el residuo hidrofóbico a 4-5 Å del sitio activo, mientras que en Grx de clase II la distancia es promedialmente más grande (>6Å, Figura 5.7.D), además de que la conservación de esta posición es menor (Figura 5.5). Ambos resultados podrían contribuir a explicar porqué las Grx de clase II generalmente no poseen actividad redox.

Continuando con el mismo razonamiento, al compara los *cis*-Pro *loops* presentados en la Figura 5.7.B es posible identificar tres posiciones bien diferenciadas para el mismo, que denominamos: i) “abierta”, como la presente en *Tb1-C-Grx1Δ76*, ii) “intermedia”, como la presente en las otras Grx de clase II y iii) “cerrada”, como la presente en las Grx de clase I. Las dos estructuras comparadas en la Figura 5.7 que poseen el *cis*-Pro *loop* en forma “cerrada” corresponden a las estructuras apo y holo de *HsGrx2*, donde vemos que claramente el *cis*-Pro *loop* ocupa la misma posición en ambas (ver también Figura 5.4.F), lo que no había sido destacado previamente para ningún par de estructuras apo y holo de Grx. Una posible explicación para el desplazamiento de este *loop* en las estructuras de *HsGrx2* es la unión de ligando, ya que en ambas estructura está presente GSH unido no covalentemente, el cual interacciona con residuos de la hélice $\alpha$ 3 y del propio *loop*. Sin embargo, al comparar las dos estructuras disponible de *HsGrx2* en forma apo comentadas más arriba –una resuelta por cristalización y con GSH unido no covalentemente y la otra por NMR y sin ligando- con la estructura en forma holo de la misma proteína vemos que la ubicación del *cis*-Pro *loop* es muy similar, si bien no idéntica (ver Figura 5.4.F presentada anteriormente). El pequeño alejamiento del *cis*-Pro *loop* fuera del surco de unión a GSH en la forma apo de *HsGrx2* resuelta por NMR (PDB ID 2CQ9) podría atribuirse a la ausencia del “efecto ancla” que ejerce el GSH entre la región de la hélice $\alpha$ 3 y el *cis*-Pro *loop* con el extremo aminoterminal de la hélice $\alpha$ 2 y el final de  $\beta$ 1 (Figura 5.4.D). De hecho, el cambio más evidente entre las estructuras resueltas con GSH unido y la forma libre de ligando es la posición del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 (ver próxima sección), lo que apoya la idea de que en Grx de clase I la región de sitio activo se estructura en presencia de ligando, como se desprende de los experimentos de dinámica por NMR realizados para la Grx I de levadura comentados más arriba (Jensen et al., 2011). Reforzando esta idea, al comparar el otro par de estructura apo y holo correspondientes a una Grx de clase I (*AtGrxC5*, ver Figura 5.5 (Couturier et al., 2011)) vemos que este patrón se conserva y los *cis*-Pro *loop* de ambas estructuras son superponibles entre ellos (Figura 5.7.C) y superponibles a los *cis*-Pro *loop* de *HsGrx2* en sus dos formas (no mostrado). Es interesante remarcar que las dos estructuras de *AtGrxC5* poseen GSH unido y que no poseemos información sobre la ubicación del *cis*-Pro *loop* en la

---

<sup>77</sup> Este resultado se evidencia en la Figura 5.7.D pero no se indica allí para mantener la figura lo más simple posible.

forma sin ligando, pero podemos especular que estará en una conformación ligeramente más abierta que la reportada en las estructuras de la Figura 5.7.C.

Las posiciones “intermedias” corresponden a Grx de clase II (Figura 5.7.B). La estructura de *HsGrx5* fue resuelta en su forma holo y, si bien no poseemos la estructura en forma apo para comparar, se ha reportado la estructura de apo-*ScGrx5*. En la Figura 5.4.E podemos ver que estas estructuras no presentan importantes diferencias en la posición del *cis-Pro loop*. La otra proteína de clase II para la cual existen estructuras en forma apo y holo es *EcGrx4* (Fladvad et al., 2005; Iwema et al., 2009). Como se puede ver en la Figura 5.4.D, las dos formas holo (*HsGrx5* y *EcGrx4*) presentan *cis-Pro loop* prácticamente superponibles, mientras que la forma apo de *EcGrx4* no. Una posible explicación para la ubicación dispar de esta región en la forma apo de *EcGrx4* es que la estructura de la misma es la única resuelta por NMR. En esta línea, especulamos que la dinámica que observamos para el *cis-Pro loop* en *Tb1-C-Grx1Δ76* es una propiedad intrínseca de las Grx de clase II en su forma apo y que la cristalización selecciona o determina la observación de conformaciones más rígidas que las observables al estudiar la proteína en solución por NMR, como fue nuestro caso. En esta línea, la posición intermedia del *cis-Pro loop* en la estructura de *AtGrxS14* representaría una posición equivalente a la de *Tb1-C-Grx1Δ76*, solo que observada en estructuras cristalinas. Para poner a prueba esta hipótesis aprovechamos la existencia de dos estructuras muy similares de GrxS14 (*AtGrxS14* y *PtGrxS14*) resueltas por diferentes técnicas. Como se puede ver en la Figura 5.5, tanto la extensión como la secuencia que comprenden a la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* de estas proteínas es altamente conservada. Al comparar la posición del *cis-Pro loop* en las dos estructuras de GrxS14 respecto de 2LTK vemos que la estructura resuelta por NMR (PDB ID 2LKU) posee una conformación intermedia entre 2LTK y 3IPZ (Figura 5.7.E), lo que apoya la idea de considerar que en la Grx de clase II el *cis-Pro loop* es una región móvil y que esta dinámica se refleja mejor en las estructuras resueltas por NMR. Una forma posible de aproximarse a la dinámica conformacional en estructuras cristalográficas es el análisis de factores B (Smith et al., 2003), los cuales son considerados indicadores de desorden estático y/o dinámico e, indirectamente, de propiedades dinámicas, si bien la relación entre los mismos y la dinámica que se puede determinar por NMR no está claramente definida (Reichert et al., 2012). Al graficar los factores B normalizados de las 4 estructuras cristalográficas que estamos usando como referencia podemos ver que, efectivamente, la región correspondiente a la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* poseen factores B ligeramente mayores al promedio de los demás residuos (Figura 5.7.F). Este resultado es particularmente interesante en la forma apo de *AtGrxS14* ya que, si bien en la estructura cristalina de 3IPZ no se refleja la flexibilidad de este *loop*, los factores B de la hélice  $\alpha 3$  son más altos que el promedio.

Finalmente, es importante destacar que si bien la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* están lejanos en secuencia respecto del sitio activo, ambos elementos están estrechamente relacionados al mismo y, como veremos al final de este capítulo, hay una estrecha conexión entre el extremo aminoterminal desordenado de la proteína (región NTE) y la hélice  $\alpha 3$  a través de la hélice  $\alpha 1$ . Más aún, la región NTE interactúa con residuos de la hélice  $\alpha 3$  y del *cis-Pro loop* (ver Figura 5.12 más adelante) y probablemente afecte de

manera sustancial algunas propiedades del sitio activo. A modo de ejemplo, la forma FL de la proteína es capaz de coordinar centros ferrosulfurados de manera relativamente estable, mientras que la forma trunca ( $\Delta 76$ ) no lo es, como se comentó en el capítulo anterior. En este trabajo resolvimos la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$*  y pudimos observar que el *cis-Pro loop* se encuentra en una posición lejana al sitio de unión de GSH, más inclusive que en otras Grx de clase II. En este sentido, es probable que esta posición sea una consecuencia de la ausencia de la región NTE la cual podría afectar la posición de la misma, acercando los residuos claves para la unión de GSH a una geometría adecuada y generando la posibilidad de ensamblar centros ferrosulfurados más establemente. Más aún, quizás la región NTE participe en la unión de  $T(SH)_2$  durante la coordinación del cluster, explicando así la mayor eficiencia de este tiol en el ensamblado de centros ferrosulfurados respecto a GSH. Adicionalmente, el efecto de la región NTE a través de la hélice  $\alpha 3$  podría ser responsable de la diferente reactividad de la forma FL y  $\Delta 76$  con mBBr (Figura 4.12). En términos más generales, este tipo de análisis extendido a otras Grx clase I y II permitiría discriminar si la dinámica que presenta la región del *cis-Pro loop* es una característica conservada en las Grx de clase II y si se mantiene o no en presencia de ligando (GSH u otros). Por el momento, y en función de la evidencia aquí presentada, podemos sugerir que el *cis-Pro loop* en Grx de clase II presenta una forma “abierta” y con dinámica conformacional en el rango de picosegundos en las formas holo y se “cierra” sobre el sitio de unión a GSH en las formas “holo”. La dinámica de este lazo podría estar asociada a la transferencia de centros ferrosulfurados la cual ocurre en rangos de tiempo compatibles con los aquí presentados (Mapolelo et al., 2013).

## 5.8. Estructura del sitio activo y del *loop* $\beta 1$ - $\alpha 2$

Como se comentó, la cisteína 104 está localizada en el extremo aminoterminal de la hélice  $\alpha 2$ , en una posición equivalente a todas las estructuras de Grx seleccionadas (Figura 5.7.A) y a las oxidoreductasas que conservan el plegamiento Trx (ver Figura 2.2). En el caso de *Tb1-C-Grx1* la estructura del sitio activo está estabilizada por puentes de hidrógeno entre el grupo NH del enlace amida de M103 (M103-NH) y el oxígeno carboxílico del enlace amida de K96 (K96-O') y entre K96-NH y el oxígeno de la cadena lateral de S107 (Figura 5.8.A). El residuo de K96 está muy conservado en Grx (Figura 5.5) y ha sido indicado como uno de los residuos involucrados en la unión de GSH en otras Grx. En la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$*  el grupo amonio de su cadena lateral queda ubicado en la misma dirección que el tiol del sitio activo y a  $4.8 \pm 0.4 \text{ \AA}$  de distancia (promedio de los 20 conformeros) lo que sugiere que es capaz de afectar el entorno electrostático del tiol. El posicionamiento de este residuo de lisina próximo al sitio activo está determinado por dos factores: *i*) la cadena principal de la lisina participa de un elemento de estructura secundaria que la mantiene muy próxima al sitio activo (ver a continuación) y *ii*) la cadena lateral de K96 posee importantes interacciones de van der Waals con los residuos hidrofóbicos que lo rodean, fundamentalmente V126, L127 e I145 (Figura 5.8.A). Es interesante destacar que el residuo de V126 forma parte del surco donde se coloca el GSH (ver próxima sección) y está en contacto con la hélice  $\alpha 3$  a través de V136, mientras que la isoleucina 145 pertenece al *cis-Pro loop* comentado anteriormente (Figura 5.5).

En coincidencia con la relación que poseen los residuos K96, C104, V126 y L127 con el *cis-Pro loop* los mismos también muestran dinámica conformacional en el rango de  $\mu\text{s}$  -ms en los experimentos de relajación mostrados en la Figura 5.6, aunque menos marcada que la hélice  $\alpha 2$  y el *cis-Pro loop* en sí mismo.

Al comparar la estructura del sitio activo de las diferentes Grx podemos ver que no hay importantes diferencias en la geometría del mismo, ni en su ubicación respecto de los elementos de estructura secundaria ni en la disposición de las cadenas laterales (Figura 5.8.B-C). La diferencia más relevante es que la proteína de *T. brucei* posee una tirosina en la posición +3 luego de la cisteína del sitio activo (Y106), posición que es generalmente ocupada por una fenilalanina en las Grx de clase II. La tirosina es común en Grx de clase I como la *HsGrx2* y determina la ubicación de un grupo capaz de generar interacciones polares además de hidrofóbicas en una posición expuesta al solvente y cercana a C104 (Figura 5.8.D-C). Al analizar las estructuras disponibles para holo Grx se puede ver que este residuo participa tanto en la unión de GSH como en el aislamiento del clúster del solvente pero, interesantemente, en el caso de las Grx de clase I la unión del mismo determina un cambio en los ángulos de enlace de la tirosina hacia rotámeros que se denominan “de alta energía” ya que no son los más favorables (Couturier et al., 2011; Iwema et al., 2009; Johansson et al., 2007, 2010; Rouhier et al., 2007). En coincidencia, la posición de este residuo de tirosina en la forma apo de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* coincide con el residuo equivalente en la forma apo de *HsGrx2*, mientras que en la forma holo-*HsGrx2* el mismo está rotado  $\sim 100^\circ$  (Figura 5.8.C).

Como se comentó, *Tb1-C-Grx1* posee una extensión del *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$  típica de las Grx de clase II y ausente en Grx de clase I. Si bien el *loop* comienza en K96, este residuo no es diferencial entre Grx de clase I y II. Adicionalmente, todas las Grx poseen al menos 2 residuos entre esta lisina conservada y la cisteína aminoterminal del sitio activo (Figura 5.5). En todas las Grx de clase II para las cuales se conoce la estructura este *loop* protruye hacia afuera del *core* de la proteína y no establece contactos con los residuos del entorno del sitio activo, los cuales están sobre la otra cara de la hélice  $\alpha 2$  (Figura 5.8.E). Adicionalmente, el *loop* es relativamente hidrofóbico pero en todas las estructuras posee un residuo cargado en una posición central del mismo (E100 en *Tb1-C-Grx1*), el cual no presenta interacciones evidentes con otros residuos cargados (Figura 5.8.F). Al analizar en detalle la estructura de este *loop* en la proteína de *T. brucei* podemos ver que el lazo que forma está estabilizado por un enlace de hidrógeno a nivel del esqueleto de los dos residuos que lo delimitan (K96 y M103) y por interacciones hidrofóbicas con la hélice  $\alpha 2$  (Figura 5.8.G), lo cual coincide con los resultados de relajación que indican que esta región tiene una movilidad muy restringida<sup>78</sup>. Este tipo de elemento de estructura secundaria posee todas las características que distinguen a un lazo omega (“*omega loop*”). Los lazos omega fueron identificados por Rose a final de los ‘80 (Leszczynski and Rose, 1986) y se caracterizan por ser elementos de estructura secundaria de 6-16 aminoácidos de largo que forman un lazo con sus extremos muy

<sup>78</sup> De hecho, en la Figura 5.6.D puede verse que esta región tiene una movilidad medida *menor* que la calculada, indicando que hay factores que afectan su movilidad que no son evidentes en la estructura.

próximos. Los mismos son casi exclusivamente elementos de superficie, protruyendo hacia afuera del *core* de la estructura proteica y generalmente poseen al comienzo un residuo de glicina conservado y un residuo de prolina, permitiendo de esta forma un cambio de dirección de la cadena polipeptídica, así como un residuo en *cis* u otra prolina más adelante, lo que introduce un nuevo giro en la dirección de la cadena (Fetrow, 1995; Pal and Dasgupta, 2003). Todas estas características están conservadas en el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 presente en *Tb1-C-Grx1* y otras Grx de clase II, por lo cual consideramos que corresponde su denominación como *omega loop*.

Los *omega loops* han sido identificados en varios tipos de proteína y son, generalmente, elementos que participan en la interacción con sustratos o modulan aspectos catalíticos de enzimas (Fetrow, 1995; Pal and Dasgupta, 2003). Si bien desconocemos cual es el rol del lazo omega conservado en las Grx de clase II, se han elaborado algunas hipótesis basadas en evidencia estructural. Para *EcGrx4* se ha postulado que este *loop* actuaría como un “conmutador conformacional” que facilitaría el ensamblaje y la liberación de centros ferrosulfurados unidos por esta proteína con GSH como ligando (Iwema et al., 2009) ya que, como se puede ver en la Figura 5.4.D, la posición de este lazo difiere significativamente entre la forma holo y apo. En este mecanismo juega un papel protagónico la S33 del motivo CGFS cuyo hidroxilo es capaz de establecer puentes de hidrógeno con el residuo que precede a la cisteína del sitio activo (S29) en la forma apo y con el NH del enlace amida de K22 (equivalente a K96 en *Tb1-C-Grx1*) en la forma holo. En el primer escenario esta interacción tensa la región carboxiterminal del *omega loop* determinando el alejamiento de la cisteína de sitio activo (C30) de una posición favorable para unir el clúster, mientras que en el segundo escenario el puente de hidrógeno acerca los dos extremos del *loop* ubicando a la cadena lateral de K22 en una posición óptima para unir al grupo carboxilato del residuo de glicina del GSH y a la vez determina la liberación de C30 para quedar en una orientación adecuada para unir el metal (Fladvad et al., 2005; Iwema et al., 2009). Este mecanismo podría estar conservado en Grx bacterianas de clase II, donde se conserva la serina en la posición correspondiente a S29 (no mostrado) pero probablemente no en *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* (la posición equivalente es ocupada por M103) u otras Grx eucariotas.

También se ha asociado la presencia del *omega loop* a la ausencia de actividad redox (Comini et al., 2013; Mesecke et al., 2008) si bien no se ha propuesto una explicación conformacional adecuada. Analizando detalladamente las estructuras de Grx de clase I y II podemos ver que en las de clase I el pequeño lazo que conecta  $\beta$ 1 con  $\alpha$ 2 no tiene sus extremos “anclados”, permitiendo una separación mayor entre la cisteína aminoterminal del sitio activo y la lisina conservada (8.4 Å entre C37 y K34 de *HsGrx2*, cadena A) que la que se encuentra en las Grx de clase II (5.7 Å en *HsGrx5*, cadena A; 5.6 Å en *EcGrx4*, cadena A y 4.8 Å en *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76*). Nosotros interpretamos que esta diferencia es relevante a la hora de explicar la ausencia de actividad redox en Grx de clase II ya que en Grx de clase I esta lisina (K34 en *HsGrx2*, Figura 5.8.H) ocupa una posición que permite el correcto posicionamiento de la cisteína de GSH hacia el tiol de C37 (relativamente accesible al solvente) que facilitaría el reconocimiento del sustrato oxidado (disulfuro mixto entre GSH y proteína blanco) y que tenga así lugar la reacción de reducción (deglutinationilación, en

este ejemplo). Por el contrario, el arreglo espacial de estos mismos residuos es diferente para Grx de clase II, donde justamente la conexión  $\beta 1-\alpha 2$  se encuentra anclada en sus extremos, los cuales están a la mitad de la distancia (4-5Å), arrastrando la lisina hacia la hélice  $\alpha 2$  como se ve en el caso de *Tb1-C-Grx1Δ76* (Figura 5.8.G). Si bien la nueva posición de la lisina no necesariamente altera la unión no covalente de GSH a Grx (ver por ej. en *HsGrx5* y *EcGrx4*), determina el alejamiento del tiol de GSH de la cisteína de sitio activo, impidiendo de esta forma el ataque nucleofílico del mismo para formar el disulfuro.

Esta propuesta sugiere una explicación completamente original y basada en información estructural y bioquímica de porqué las Grx de clase II no tienen actividad redox. Obviamente, esto no implica que podamos descartar de plano que las Grx de clase II *sí* posean actividad redox con sustratos aún no identificados. Más aún, por las funciones conocidas de otros omega loops podemos especular que el mismo podría officiar como región de reconocimiento para blancos específicos aún no identificados.

Por último, es interesante considerar el posible rol del omega *loop* como “interruptor molecular” para intentar explicar el cambio de reactividad observado para C104 en los experimentos de pKa mostrados en el Capítulo 4. La corta distancia entre K96 y el tiol de C104 sugiere que el grupo amonio de la lisina podría actuar como base y desprotonar a C104 y, a su vez, el tiolato formado está a distancia adecuada para formar un puente de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de M103 (distancia ~3 Å). Adicionalmente, el grupo hidroxilo de Y106 del sitio activo se encuentra próximo a C104 y podría estar afectando la ionización de C104 mediante puentes de hidrógeno con grupos no convencionales, como ha sido descrito para otras Grx (Foloppe and Nilsson, 2004). Estas interacciones podrían explicar el bajo pKa medido para C104 (Capítulo 4), pero no la caída en reactividad a partir de pH 5. Un fenómeno de estas características podría estar asociado a la participación de un segundo residuo capaz de ceder un hidrogenión al tiolato de C104, disminuyendo su reactividad para actuar como nucleófilo. Este tipo de intercambio es generalmente llevado a cabo por residuos con cargas negativas como el ácido glutámico y el aspártico (Witt et al., 2008). Al inspeccionar la estructura de *Tb1-C-Grx1* no se identifican grupos ionizables con estas características vecinos a C104 en un radio de 5 Å (no mostrado), por lo tanto debemos considerar como una explicación probable a este efecto que el incremento de pH induce un cambio conformacional en la región que contiene a C104 o en alguna otra que termine provocando que su tiol no permanezca expuesto al solvente (por ej. por impedimento estérico de Y106). Un efecto conformacional de estas características es el que tiene lugar en la llamada “transición alcalina” del citocromo c, en donde se da un cambio en la coordinación en el entorno del hemo producto de un cambio conformacional inducido por el desplegamiento de un *omega loop* conservado, asociado a su vez a la protonación de uno o más residuos de lisina (Maity et al., 2006). También existe la posibilidad de que el cambio conformacional inducido por pH esté asociado a la protonación-desprotonación del residuo E100, pero esto requiere una demostración experimental en esta y otras Grx de clase II.

## 5.9. Extremo carboxilo terminal y entorno de la cisteína 181

Los residuos correspondientes al extremo carboxiloterminale (178-182), ubicados a continuación de la hélice  $\alpha 5$ , no poseen una estructura secundaria regular (Figura 5.3.B), como había sido predicho por los programas de análisis de secuencia comentados en el Capítulo 3. Sin embargo, la región que contiene a la C181 es rígida, como lo demuestra el hecho de que posee un valor promedio de  $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ -NOEs de 0.7, inferior al promedio de las regiones estructuradas de la proteína (0.8) pero significativamente mayor al de las regiones móviles como el *cis-Pro loop* (Figura 5.6). Es interesante explorar cuales son las interacciones que mantienen a C181 en una conformación espacial bien definida, particularmente teniendo en cuenta los resultados de oxidación presentados en el Capítulo 4. Lo primero a destacar es que, entre las estructuras escogidas como homólogos estructurales de *Tb1-C-Grx1*, solo *HsGrx5* posee una extensión posterior al final de la hélice  $\alpha 5$  comparable a la presente en la proteína de tripanosomas (Figura 5.9.A). En *Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  la extensión que posee a C181 está conectada al *core* de la proteína por una extensa red de contactos hidrofóbicos que involucran V91 al comienzo de la hebra  $\beta 1$ , L119 al final de la hélice  $\alpha 2$ , isoleucina 150 al final de la hebra  $\beta 3$ , L174 en la hélice  $\alpha 5$  e isoleucina 179 en la extensión que contiene a C181 (Figura 5.9.B). Tres de estos residuos (V91, L174 e I179) son específicos de *Tb1-C-Grx1* y conservados solo en Grx de tripanosomátidos (ver Figura 3.1), lo cual puede sugerir que esta red de interacciones es conservada dentro del género. La hélice  $\alpha 5$  posee una cara netamente hidrofóbica que mira hacia el interior de la proteína y participa de manera esencial en la estabilización de este parche hidrofóbico. A pesar de no poseer identidad de secuencia ni residuos conservados con la hélice  $\alpha 5$  de *Tb1-C-Grx1* (Figura 5.5), la contraparte estructural en *HsGrx5* también se encuentra anclada al *core* de la proteína mediante una extensa red de contactos hidrofóbicos (no mostrado). Sin embargo, algo distintivo en *Tb1-C-Grx1* es que la otra cara de esta hélice se haya poblada por una gran densidad de residuos cargados, incluyendo los residuos básicos K171, K172, K177 y R175 y los residuos ácidos D176 y D169, además del grupo carboxílico del extremo carboxiloterminale, el cual está en dirección hacia las cadenas laterales de R175 y K171, a una distancia de entre 3.1 y 4.1 Å, y probablemente aporte a la estabilización de este extremo de la proteína mediante interacciones salinas (Figura 5.9.C). K177, por su parte, ocupa la posición que en Grx de clase I es conservadamente ocupada por un residuo de cisteína que forma un disulfuro estructural con otra cisteína ubicada al comienzo de la hebra  $\beta 1$  (Figura 4.5, capítulo anterior). Como se mencionara anteriormente, la cadena lateral de la C181 se encuentra poco accesible al solvente, esto se debe fundamentalmente a que el tiol se encuentra formando puentes de hidrógenos colineales con los átomos de oxígeno de la cadena principal de I179 y R183 (Figura 5.9.C). Además, el puente de hidrógeno ente C181-SH $\gamma$  y R183-O $\prime$  es responsable de que el extremo de la proteína no quede totalmente libre en el solvente y se repliegue sobre la estructura de la misma. En particular llama la atención la ubicación de la cadena lateral del último aminoácido, L184, la cual en varios conformeros cubre a C181, contribuyendo a reducir su accesibilidad al solvente. Si bien no detectamos interacciones electrostáticas directas entre el átomo de azufre y grupos aminos de los residuos de lisina y arginina circundantes, no podemos descartar que la distribución de cargas positivas (R183, K177, R175 y K170) que circundan a este residuo pueda afectar globalmente su estado de

protonación y explicar, al menos parcialmente, que el pKa de C181 sea una unidad inferior al esperado para una cisteína “no catalítica” (Capítulo 4). Otra característica interesante de esta región es la distribución específica de cargas alternadas en su superficie (Figura 5.9.D-E), la cual podría estar implicada en la interacción de la proteína con GSSG y el disulfuro de Gsp durante el proceso de oxidación de *Tb1-C-Grx1* y en los consiguientes cambios conformacionales comentados anteriormente (Figura 4.9). De acuerdo al modelo propuesto, la formación de un disulfuro mixto con GSSG o el disulfuro de Gsp ocurriría primariamente con C181 y, en principio, no requeriría de ninguna interacción previa entre proteína y oxidante (ver próxima sección). Sin embargo la incorporación de estas moléculas a C181 podría desestabilizar a la hélice  $\alpha 5$  y la región carboxilterminal de la proteína, llevando al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas entre la hélice  $\alpha 5$  y el core de la proteína, induciendo así el cambio conformacional necesario para que la C181 tiolada se aproxime a la C104 y se dé la segunda reacción de intercambio tiol-disulfuro que originará el disulfuro intramolecular C104-C181. Los residuos de glicina que ocupan las posiciones conservadas 156 (*loop*  $\beta 4$ - $\alpha 4$ ) y 168 (*loop*  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ ) podrían oficiar de bisagras que facilitarían dichos cambios conformacionales sin alteraciones mayores en la estructura secundaria de la proteína. En esta línea, vale la pena recordar que Melchers y colaboradores (Melchers et al., 2007) determinaron que el disulfuro de Gsp resultó ser más eficiente que GSSG para oxidar a *Tb1-C-Grx1* lo cual puede deberse a que el Gsp es mejor grupo saliente que el GSH, como plantean los autores, o también a que el motivo espermidina presente en el Gsp podría contribuir a la interacción con la región carboxilterminal y a la estabilización del producto tiolado en posición adecuada cercana al surco de unión a GSH y el residuo C104. Queda pendiente la validación de este modelo mediante el estudio del proceso de oxidación en mutantes sitio específicos por técnicas bioquímicas y NMR. No se nos escapa que plantear un mecanismo de estas características implica, en última instancia, sugerir que *Tb1-C-Grx1* sí posee actividad reductasa de GSSG y Gsp disulfuro dependiente de  $T(SH)_2$  o una oxidoreductasa ditiólica como TXN (Filser et al., 2008).

## 5.10. Unión de tioles de bajo peso molecular

Recientemente, Deponte presentó una detallada revisión de los mecanismos enzimáticos por los cuales diferentes proteínas (GST, glioxalidasas, peroxidasas dependientes de glutatión, etc.) usan GSH para cumplir funciones redox (Deponte, 2013). Más allá de las diferencias específicas de cada familia, en general se conoce con cierto nivel de detalle el mecanismo por el cual estas proteínas usan la química redox del GSH para la catálisis. La excepción son las Grx, en donde la interacción entre Grx y GSH o GSSG está lejos de ser comprendida. Esta situación se agrava en nuestro caso particular, donde  $T(SH)_2$  y el Gsp también son posibles ligandos. Repasando brevemente el mecanismo propuesto para Grx detallado en la Introducción, vemos que ya sea para la reducción de disulfuros o para la coordinación de centros ferrosulfurados, las Grx deben unir una molécula de GSH y activarla para realizar una función que, en ausencia de la proteína, este tiol realiza muy ineficientemente (Manta et al., 2013b). Las Grx se consideran enzimas bisustráticas de tipo “ping-pong”, es decir, en las cuales no es *cinéticamente* observable la

formación de complejos ternarios. Al igual que para otras enzimas bisustráticas, en las enzimas “ping-pong” los parámetros enzimáticos como la constante de Michaelis ( $K_M$ ) o la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) se obtienen a partir de curvas de velocidad inicial en función de la concentración de un sustrato a una concentración fija -generalmente en exceso- del segundo sustrato. En estas enzimas el  $K_M$  medido (aparente) refleja una relación entre las constantes cinéticas individuales de la reacción catalizada en ese paso y los valores “intrínsecos” deben ser derivados de gráficos secundarios (Dalziel et al., 1957; Gallogly et al., 2009). En los casos mejor estudiados (Eckers et al., 2009; Gallogly et al., 2008, 2009; Mesecke et al., 2008; Peltoniemi et al., 2006; Srinivasan et al., 1997; Yang and Wells, 1991), las Grx han mostrado gráficos secundarios que se proyectan hacia el origen indicando un mecanismo de “reacción por encuentro” sin formación de complejo de Michaelis, es decir, donde la interacción enzima-sustrato no es *cinéticamente* detectable. Estos resultados chocan con la mayoría de la literatura sobre Grx, en donde se menciona la existencia de un sitio estructural *preexistente y conservado* de unión a GSH, denominado generalmente “surco de unión de GSH”, el cual se ha definido por estudios estructurales y de mutagénesis (Bellí et al., 2002; Berndt et al., 2007; Couturier et al., 2011; Feng et al., 2006; Fladvad et al., 2005; Wang et al., 2011; Zaffagnini et al., 2012). Llamativamente, este sitio de unión involucra *los mismos tipos de interacciones* tanto en las Grx catalíticamente activas que en las que no lo son, o inclusive en aquellas que unen no covalentemente el GSH para asistir en la coordinación de centros ferrosulfurados. Como se comentó en el Capítulo 3, la mayoría de los residuos considerados como esenciales para la unión de GSH están conservados en *Tb1-C-Grx1*, si bien no se conoce función biológica para la misma que dependa de este u otro tiol. En esta sección exploraremos los aspectos conformacionales de la unión de tioles de bajo peso molecular a *Tb1-C-Grx1*, tanto en su forma FL como trunca.

### 5.10.1. Estructura y conservación del sitio de unión a glutatión en *Tb1-C-Grx1Δ76*

Los residuos indicados como importantes en la unión de GSH son conservados y, más allá de que pueden variar ligeramente entre diferentes Grx, la naturaleza química de las interacciones que establece la proteína con el tiol son similares en todos los casos. Como norma, los residuos de unión a GSH se distribuyen en una región definida de la superficie proteica la cual generalmente presenta una importante densidad de carga otorgada por residuos básicos conservados (Comini et al., 2013; Manta et al., 2013a). *Tb1-C-Grx1* no es la excepción y la mayoría de los residuos conservados a nivel de secuencia se concentran en la región próxima al sitio activo (Comini et al., 2013). Entre estos residuos K96, C104, T144, D159 y R133 han sido mostrados como cruciales para la unión de GSH y el ensamblado de centros ferrosulfurados en varias Grxs y poseen una ubicación muy conservada en las estructuras que venimos considerando para comparar con *Tb1-C-Grx1Δ76*, definiendo los cuatro extremos del surco de unión a GSH (Figura 5.10.A). De hecho, como se puede ver en la Figura 5.5 la conservación de los mismos es muy alta e independiente de la clase. Tres de las cinco estructuras que estamos considerando en la comparación poseen GSH unido no covalentemente. Al mapear las moléculas de GSH sobre la estructura de *Tb1-C-Grx1Δ76*, las mismas no quedan completamente ubicadas en posición adecuada para

recapitular los contactos nativos que poseen en las respectivas estructuras (Figura 5.10.B). Las desviaciones más importante que se observan al comparar estos modelos estructurales son: *i*) como se comentó, la cadena lateral de K96 es tironeada por el *omega loop* y su grupo amonio se aleja del carboxilato del residuo de glicina del GSH (distancia de 3.6 Å vs. 2.8 Å en *HsGrx5*); *ii*) el residuo de R133 (ubicado en la hélice  $\alpha 3$ ), cuya carga positiva contribuye a fijar el GSH por el carboxilato de su residuo de glicina en *HsGrx5* y *EcGrx4*, en *Tb1-C-Grx1Δ76* adquiere una disposición que lo distancia significativamente (~6 Å) de una potencial interacción con GSH, y *iii*) los residuos T144-I145, ubicados en el *cis-Pro loop* ocupan parte de la cavidad donde se asienta GSH en *HsGrx5* estableciendo puentes de hidrógenos con sendos aminoácidos.

Respecto a este último punto, durante el análisis de la estructura de *Tb1-C-Grx1Δ76* para nuestro trabajo (Manta et al., 2013a) realizamos la comparación de la misma con *EcGrx4* (Iwema et al., 2009) y detectamos que la diferencia más importante entre ambas estructuras se da en el *cis-Pro loop* y, particularmente, en la posición de los residuos T144 y I145 comentados anteriormente. En la proteína de *T. brucei* T144 se encuentra más cercana a D159 y, en consecuencia, la cadena lateral de T144 ocluye la cavidad que es ocupada por el motivo  $\phi$ -Glu del GSH en la estructura de *EcGrx4*. Si bien esto no se conserva en las estructuras analizadas en la Figura 5.10.A, es evidente que la posición de T144 en *Tb1-C-Grx1Δ76* difiere de las demás. Como comentamos, esta región posee una importante plasticidad estructural la interacción entre T144 y el residuo de D159 explica porqué este último muestra también un ensanchamiento de la señal en espectro bidimensional (Figura 5.2). La cadena lateral de I145, por su parte, protruye hacia el surco de unión a GSH y participa en interacciones hidrofóbicas con V136, ya comentadas. Es más, debajo del surco de unión a GSH es posible identificar una extensa red de interacciones hidrofóbicas que involucra a I145 y varios residuos más, entre ellos V126, L127, M103 y la propia V136, que pertenecen a la hélice  $\alpha 3$  (Manta et al., 2013a). De hecho, es previsible que pequeños cambios en la posición de esta hélice repercutan sensiblemente en la región de unión de GSH. A su vez, como se comentó, esta hélice está estrechamente asociada a la hélice  $\alpha 1$  y al extremo aminoterminal de la proteína, pudiendo explicar las diferencias observadas en la titulación de la proteína FL o trunca con GSH o T(SH)<sub>2</sub> y los distintos espectros 2D obtenidos para ambas proteínas.

Si bien no podemos descartar que la posición de algunos de estos residuos se vea afectada por la región NTE, como veremos en la última sección de este capítulo, de este análisis podemos concluir que la conformación del sitio activo de *Tb1-C-Grx1Δ76* no posee la estructura adecuada para sustentar la unión no covalente de ligandos tiólicos de bajo peso molecular, con GSH como referencia. Como se verá a continuación estos resultados fueron corroborados por distintas aproximaciones bioquímicas y biofísicas.

### 5.10.2. Unión de tioles de bajo peso molecular *in vitro*

En este trabajo investigamos si los diferentes tioles de bajo peso molecular presentes en tripanosomátidos, particularmente GSH y T(SH)<sub>2</sub>, pueden unirse no covalentemente a Tb1-C-Grx1 tanto en su forma FL como  $\Delta 76$ . Para ello intentamos distintas aproximaciones experimentales, que se resumen en esta sección. Inicialmente investigamos la unión de GSH a Tb1-C-Grx1 FL WT mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), titulando la proteína (50-100  $\mu$ M) con 0.5-2 mM GSH (n=3) en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.8 y 25°C y en ningún caso logramos obtener un resultado que indicara que se producía unión. Hay varios motivos por los cuales una interacción no covalente entre proteína y ligando podría no ser medible por ITC pero, en este caso, las opciones más probables son: i) el GSH se une a la proteína con una muy alta afinidad ( $K_d \leq 0.5 \mu$ M) determinando un valor de  $c > 100$ <sup>79</sup> o ii) el GSH se une a la proteína con baja afinidad ( $K_d \geq 1$  mM) determinando un valor de  $c < 1$ . La unión de GSH con alta afinidad la podemos descartar ya que la proteína no se une a una resina de GSH-sefarosa (no mostrado). Dado que el único residuo de W presente en la proteína está localizado en *cis-Pro loop* y, particularmente, en el motivo WPT conservado en Grx de clase II (Figura 5.5) intentamos determinar la unión de GSH a la proteína FL mediante cambios en el espectro de fluorescencia intrínseca o en el espectro de CD en la región del ultravioleta cercano (Figura 5.11.A-B). Como se puede ver en la Figura 5.11.A, la titulación con GSH hasta un exceso de 10 veces en concentración molar produce un efecto menor al 4% en la intensidad máxima de fluorescencia<sup>80</sup>. Análogamente, al seguir la titulación por CD el resultado fue equivalente, con solo un pequeño efecto en la señal dicroica en la región de W142 cuando el GSH alcanza un exceso molar de  $\sim 10$  veces respecto de la proteína (Figura 5.11.B). Estos resultados, puestos en su conjunto, sugieren que el GSH reducido no interacciona con la proteína, al menos no con una constante de disociación relevante desde el punto de vista biológico. A su vez, la presencia en exceso de GSH no produce un efecto detectable en espectros de fluorescencia o CD de las proteínas, lo cual es entendible si consideramos que la cadena lateral del residuo de W conservado no interacciona con residuos del surco de unión a GSH ni con el GSH (Figura 5.11.C).

Una de las ventajas de NMR es que es una de las pocas técnicas que nos otorga resolución a nivel de aminoácido de la unión de un ligando a una proteína, sin necesidad de resolver previamente la estructura de la proteína ya que alcanza con la asignación preliminar de los picos en los espectros 2D <sup>15</sup>N-HSQC lo cual es relativamente accesible para proteínas pequeñas y bien plegadas.. Luego de la asignación del espectro <sup>15</sup>N-HSQC realizamos la titulación de Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$  tanto con GSH y T(SH)<sub>2</sub>. Como se ve en la Figura 5.11.D, los mayoría de los picos en el espectro <sup>15</sup>N-HSQC de Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$  no

<sup>79</sup> El "valor c de Wiseman" se define como  $c = K_a [Protein\ in\ cell]_{initial} n$ , siendo  $K_a$  la constante de equilibrio de la asociación y  $n$  el número de sitios que presenta la macromolécula. Generalmente, se considera que las medidas óptimas de ITC se obtienen cuando este valor está en el rango de 10-100, si bien hay excepciones (Turnbull and Daranas, 2003).

<sup>80</sup> A modo de comparación, vale la pena notar que al realizar este mismo experimento con la Grx de clase I de *T. brucei* 2-C-Grx1 obtuvimos resultados completamente opuestos, donde se puede ver un claro perfil de unión no covalente tanto del GSH como del T(SH)<sub>2</sub> (no mostrado).

sufren corrimientos detectables al titular la proteína con estos tioles, lo que apunta en la misma línea que los resultados comentados en el párrafo anterior y coincide con lo reportado para otras Grx de clase II como *PtGrxS14* (Wang et al., 2012), el dominio Grx de la TGR de ratón (Dobrovolska et al., 2012) y Grx de clase I como *ScGrx1* (Jensen et al., 2011). A su vez, si bien la estructura de la forma FL no está resuelta aún, poseemos un importante conjunto de resultados preliminares, entre ellos espectros  $^{15}\text{N}$ -HSQC de buena calidad en los cuales es posible asignar la mayoría de los picos correspondientes a residuos del dominio Grx por comparación directa con la asignación realizada en la forma trunca (ver más adelante Figura 5.12.A). Una vez asignados (preliminarmente) los picos del  $^{15}\text{N}$ -HSQC de *Tb1-C-Grx1* FL WT realizamos el mismo experimento de titulación que con GSH y  $\text{T(SH)}_2$  hasta un exceso de  $\sim 100$  veces en concentración molar. En conjunto, ambos tioles determinaron un resultado similar, con una muy pequeña perturbación general de la posición de los picos en el espectro 2D. Solo 10 picos mostraron un corrimiento superior a 0.02 ppm, el cual se considera un límite inferior debajo del cual el corrimiento puede deberse a fluctuaciones de la determinación experimental. Entre ellos, el corrimiento promedio obtenido en la máxima concentración de titulante fue inferior a 0.1 ppm, llegando a un máximo de 0.13 ppm en el residuo G157 (Figura 5.11.E). Sin embargo, a pesar de que el corrimiento es chico, los residuos detectados mostraron un resultado interesante y diferente respecto a la forma trunca. En ambos casos hay corrimiento en los picos de C104, S107, W142, todos cercanos al sitio activo pero, además, también se evidencia un corrimiento en el desplazamiento químico de residuos de la hélice  $\alpha 4$  como G157, T162 o I160, así como de T180, el residuo inmediatamente anterior a C181 y ubicado en el extremo carboxiloterminar, en la superficie opuesta de la proteína respecto al surco de unión de GSH. Desconocemos cual es el camino estructural por el cual estos residuos están conectados a la interacción con GSH o  $\text{T(SH)}_2$  pero, evidentemente, hay rasgos de la estructura de la forma FL de la proteína que difieren de la forma trunca. A su vez, estos resultados apuntan a una interacción de los tioles de bajo peso molecular con la región carboxiloterminar de la proteína, en coincidencia con los residuos de oxidación mostrados en el Capítulo 4. Finalmente, los pequeños corrimientos registrados son acumulativos pero no determinan la saturación que sería lo esperable en experimento de unión, lo cual se puede interpretar considerando que la unión de GSH o  $\text{T(SH)}_2$  a *Tb1-C-Grx1* FL es de muy baja afinidad ( $\geq 10$  mM), en coincidencia con los demás resultados presentados en esta sección. Puestos en su conjunto, estos resultados sugieren que la unión no covalente de tioles a *Tb1-C-Grx1* no se da en el rango de concentraciones fisiológicamente relevantes (Manta et al., 2013b).

## 5.11. Resultados preliminares sobre la dinámica y conformación de la *Tb1-C-Grx1* de largo completo en solución

Una vez completada la estructura de la forma trunca de *Tb1-C-Grx1* decidimos intentar resolver la estructura de la forma de largo completo, particularmente porque habíamos acumulado una importante cantidad de evidencias que indicaban que ambas proteínas, si bien comparten el dominio Grx, presentan diferencias relevantes en aspectos como la capacidad de coordinar centros ferrosulfurados. La proteína

FL fue producida con marcación isotópica de  $^{15}\text{N}$  y purificada como se describió para la forma trunca (ver Capítulo 8). Con esta proteína realizamos los primeros experimentos 2D y pudimos obtener un  $^{15}\text{N}$ -HSQC de muy buena calidad en condiciones idénticas a las usadas para obtener el espectro para la forma trunca (Figura 5.12.A). La primera observación que se desprende del análisis de este espectro es que su calidad y la densidad de picos de resonancia en la zona central no se corresponden al esperado para una proteína de 32 kDa (*Tb1-C-Grx1* dimérica), sino a una proteína de menor masa molecular. Para confirmar o descartar esta suposición se colectaron experimentos de relajación de  $^{15}\text{N}$  a partir de los cuales pudimos determinar un valor de  $\tau_c = 9.4$  ns para la forma larga de la proteína, correspondiente a una proteína de  $\sim 17$  kDa (no mostrado). En coincidencia, la determinación del peso molecular de *Tb1-C-Grx1* FL en solución por SEC-MALS otorgó un valor de 18.3 kDa, superior al valor de 16.3 kDa esperado por secuencia pero muy lejano al de una especie dimérica que habíamos derivado de experimentos de SEC ( $\sim 32$  kDa, Capítulo 4). A partir de estos resultados se determinó que esta proteína posee un  $r_H$  de 28 Å, lo que es un valor intermedio al esperado para una proteína de 18.3 kDa completamente plegada (20.1 Å) o completamente desplegada (37.7 Å) (Wilkins et al., 1999) (no mostrado), lo que significa que la forma FL de *Tb1-C-Grx1* en solución presenta un comportamiento hidrodinámico anormal para su peso molecular. Más aún, al analizar detalladamente los experimentos de relajación resulta evidente que la proteína está formada por dos unidades con dinámicas conformacionales opuesta ya que la región correspondiente al dominio Grx se comporta de manera prácticamente equivalente a la forma  $\Delta 76$ , presentando inclusive una mayor flexibilidad en el *cis-Pro loop* que en la forma trunca, mientras que el extremo aminoterminal posee claras evidencias de estar desplegado en solución (ej.  $T_1$  bajos,  $T_2$  altos, NOEs promedio por debajo de 0.3, no mostrado). Como se comentó anteriormente, estos datos fueron determinantes para descartar la hipótesis de que *Tb1-C-Grx1* fuera una proteína dimérica y permitieron explicar el comportamiento hidrodinámico anormal de *Tb1-C-Grx1* FL como consecuencia de que la región NTE está mayoritariamente desplegada en solución.

Sin embargo, a pesar de ser una porción desplegada y contrario a lo que suponíamos previamente, la región NTE interacciona con el dominio globular de la proteína ya que el 43% de los picos del HSQC de la forma FL poseen desplazamientos significativos en el corrimiento químico ( $\Delta\delta$ ) al comparado con la forma trunca ( $\Delta\delta \geq 0.05$ , Figura 5.12.B). De hecho, el valor promedio de  $\Delta\delta$  para los 110 residuos del dominio Grx de *Tb1-C-Grx1* FL respecto de la forma trunca es de  $0.17 \pm 0.24$  ppm, superior -por ejemplo- al mayor  $\Delta\delta$  obtenido en la titulación de la forma FL con tioles de bajo peso molecular (0.13 ppm, Figura 5.11.E). En la Figura 5.12.B queda evidenciado, además, que las regiones de la proteína que presentan un  $\Delta\delta$  mayor al promedio son la hélice  $\alpha 1$ , el par de residuos M103 y C104, la porción carboxiloterminal de la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop*, mientras que el loop  $\beta 1 - \alpha 2$  (*omega loop*) previo al sitio activo es la región que presenta menor  $\Delta\delta$ , si bien esto también puede deberse a la presencia de dos residuos de prolina en tan solo 6 aminoácidos ya que estos residuos no aparecen en el  $^{15}\text{N}$ -HSQC. Para mapear los residuos con mayor  $\Delta\delta$  en la estructura de la proteína elegimos como límite arbitrario 2 veces el  $\Delta\delta$  promedio, de manera de centrarnos solo en aquellos residuos que posee mayores diferencias y obtener así una aproximación más confiable a la región de interacción del NTE con el dominio Grx. Como se puede ver en

la Figura 5.12.C, los residuos que sobrepasan este umbral son 20 y todos están ubicados en la superficie de la proteína. Nueve de ellos son residuos cargados (K79, K80, D81, D83, R133, K137, E138, E141 y D159), 7 polares (T85, M103, C104, S134, Y135, S140, W142 y T144) 3 no polares (V78, G157 e I82). Su distribución sobre la superficie delimita una cinta de contactos que va desde el extremo aminoterminal hacia la región del sitio activo, pasando por sobre la hélice  $\alpha_3$  y el *cis-Pro loop* (Figura 5.12.D). Este análisis deja en evidencia la importante interacción entre el extremo de la hélice  $\alpha_1$  y la hélice  $\alpha_3$ , mediada por al menos tres interacciones: un puente salino entre K79 y E138, un puente de hidrógeno entre D83 y Y135 e interacciones hidrofóbicas entre I82 y V131 (no mostrado). Además, probablemente exista otra interacción hidrofóbica estabilizando la interacción entre estas dos hélices ya que los resultados de asignación de estructura secundaria a partir del corrimiento químico obtenidos para la proteína de largo completo indican que la hélice  $\alpha_1$  es al menos una vuelta más larga que en la estructura  $\Delta 76$  (no mostrado), confirmando a su vez las predicciones *in silico* presentadas en el Capítulo 3. Evidentemente, la región NTE interactúa con elementos de estructura clave en el *core* de la proteína, como ser el *cis-Pro loop* y los residuos del sitio activo, lo cual podría explicar algunos aspectos diferenciales entre la forma trunca y FL, como ser la unión de centros ferrosulfurados o la reactividad de C104.

En base a estos resultados podemos delimitar la zona de la superficie de la región globular con las cuáles la región NTE realiza interacciones, pero aun no sabemos su disposición. Para ello, recurrimos a modelos *in silico* de bajas complejidades basadas en la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76*, usando el servidor I-TASSER. Lo primero que hicimos, a modo de control, fue realizar el modelo computacional de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* a partir de su secuencia. En este caso, el servidor encuentra a 2LTK como el mejor molde y construye un modelo estructural con un valor de rmsd respecto de la estructura original 0.6 Å (no mostrado), prácticamente equivalente a la desviación cuadrática media que presentan los 20 confórmeros mostrados en la Figura 5.3.D. A continuación, realizamos modelos de la proteína incluyendo la región NTE usando nuestra estructura (PDB ID 2LTK) como molde. Para obtener resultados más representativos realizamos modelos de varias de las proteínas ortólogos de *Tb1-C-Grx1* en otros tripanosomátidos así como las proteínas homólogas en otros organismos como *B. saltans* o *A. thaliana*. Escogimos estas proteínas porque todas presentan un dominio Grx sumamente conservado respecto de *Tb1-C-Grx1* y una región aminoterminal con algunos puntos en común con la región NTE de la proteína de *T. brucei* (ver Figura 3.1 y sección correspondiente). Como se puede ver en la Figura 5.12.E, las estructuras de los dominios Grx obtenidos *in silico* para todas las proteínas son prácticamente superponibles a la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* resuelta por NMR, con un rmsd promedio de  $0.8 \pm 0.3$  Å, lo que era esperable dada la importante conservación de secuencia entre estas proteínas (>40% en promedio). Ahora bien, la región NTE debe ser modelada *ab initio*, ya que no está presente en ninguna de las estructuras usadas como molde por el servidor ni en estructuras de otras proteínas que presenten una región relacionada a nivel de secuencia (no mostrado). Independientemente del largo y composición de esta región, en todos los modelos la región NTE se ubica en una posición similar, recorriendo el exterior de la proteína desde el extremo aminoterminal hacia la hélice  $\alpha_3$ , generando interacciones con la hélice  $\alpha_2$ , el lazo omega y el *cis-Pro loop* (Figura 5.12.E). Estos resultados no son coincidentes con los residuos identificados como

puntos de contacto de la región NTE en *Tb1-C-Grx1* por NMR y, a su vez, el análisis detallado de la posición de los grupos cargados de la región NTE sobre la superficie de la proteína no muestra un patrón de interacciones salinas adecuado (no mostrado), lo cual sugiere que la ubicación de la región NTE en los modelos no es correcta. En consecuencia, la mejor información que poseemos deriva de los  $\Delta\delta$  y sigue siendo relevante intentar resolver la estructura de la versión de largo completo, en lo que estamos trabajando.

## 5.12. Conclusión: ¿Homología estructural para funciones conservadas?

En este capítulo se presentó y discutió la estructura del dominio Grx de la 1-C-Grx1 de *T. brucei* (Manta et al., 2013a), particularmente en comparación a otras estructuras e integrando esta información con los resultados mostrados en capítulos anteriores. Al analizar la estructura detalladamente identificamos dos regiones relevantes que no habían sido destacados en análisis anteriores y que puede afectar la función de estas proteínas: *i)* el *cis-Pro loop*, que podemos considerar que posee una dinámica conformacional propia de Grx y aun no adecuadamente explorada en esta familia y *ii)* el lazo omega, que no había sido previamente caracterizado a este nivel de detalle. Como se discute más arriba, la evidencia experimental y la comparación estructural apunta a que ambos elementos juegan un rol clave en la función de estas proteínas, tanto en la coordinación de centros ferrosulfurados como en la modulación de la actividad redox. Más aún, al analizar detalladamente las estructuras de Grx de clase II y el efecto del *omega loop* sobre algunos residuos claves en la actividad de las Grx propusimos una explicación estructural de porqué esta subfamilia de proteína no presenta actividad redox, la cual requiere ser validada con mutantes en Grx de clase I y II. Adicionalmente, la comparación de las pocas estructuras disponibles de Grx en forma holo sugiere que la coordinación de centros ferrosulfurados involucra diferentes arreglos conformacionales en Grx de clase I y II, como ha sido propuesto por otros autores (Iwema et al., 2009; Johansson et al., 2010).

La resolución de la estructura del dominio Grx de *Tb1-C-Grx1* nos permitió obtener la primera estructura de una Grx de *T. brucei* y, en consecuencia, la primer estructura de una Grx de un organismo de la rama eucariota Excavata (Figura 1.1). Al comparar esta estructura con otras Grx llama la atención la alta similitud estructural que presentan los representantes de los diferentes grupos eucariotas entre sí e, inclusive, entre Grx de eucariotas y bacterias. Más aún, en la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* no encontramos elementos diferenciales que nos induzcan a pensar que la estructura de las Grx de tripanosomátidos evolucionaron independientemente para adaptarse a un metabolismo dependiente de T(SH)<sub>2</sub>, más allá de la región NTE cuya función específica en las funciones de la proteína aún queda por determinar. Si consideramos que los eucariotas aparecieron, como mínimo, hace ~850 millones de años (Cavalier-Smith, 2002) y que los tripanosomátidos aparecieron con la conquista de la superficie terrestre hace ~370 millones de años (Simpson et al., 2006), la conservación estructural entre Grx de organismo tan distantes indica que las misma son previas a la separación de estos reinos y que se ha mantenido

relativamente incambiada desde la aparición de las bacterias sobre la tierra hace ~3800 millones de años (Cavalier-Smith, 2002). Todas las estructuras de Grx conocidas conservan los elementos básicos para interactuar con el GSH, inclusive en las estructuras de proteínas equivalentes (no Grx) de organismos que no utilizan GSH en su metabolismo, como ser micobacterias o bacilos gram positivo (Capítulo 2). En este sentido, es importante recordar que se considera que el metabolismo dependiente de GSH evolucionó prácticamente a la par de las bacterias y que posee al menos 3000 millones de años de antigüedad (Deponete, 2013). En concordancia con estas observaciones, recientemente Inglés-Prieto y colaboradores obtuvieron la estructura de tiorredoxinas “resucitadas” y observaron que el plegamiento Trx se ha mantenido asombrosamente incambiado por al menos durante 4000 millones de años (Inglés-Prieto et al., 2013). Al considerar estos resultados en conjunto, podemos sugerir que las Grx son estructuras extremadamente antiguas, conservadas a lo largo de la evolución y adaptadas para catalizar la química del GSH, las cuales evolucionaron por “incorporación de módulos” sobre un andamiaje básico, como ha sido propuesto para otras proteínas de la superfamilia Trx (Atkinson and Babbitt, 2009a, 2009b). Como se comentó en la Introducción (Figura 1.15) estos nuevos “módulos” pueden incorporarse en unos pocos lugares del plegamiento, siendo los extremos amino y carboxiloterminales lo más frecuente. En este sentido, la adaptación que ocurrió las Grx de tripanosomátidos fue la incorporación de una región intrínsecamente desplegada en el extremo aminoterminal. Si bien desconocemos el rol de esta adaptación evolutiva es tentador especular que la misma está asociada al reconocimiento específicos de sustratos o interactores de las 1-C-Grx1 en tripanosomátidos, los cuales no han sido aún caracterizados. Finalmente, los resultados aquí presentados presentan un reto ya que, si consideramos la alta identidad estructural entre Grx ¿Cómo se explica que la 1-C-Grx2 no haya sido capaz de suplir la función de Grx5 en levaduras, siendo que es más parecida a nivel de secuencia que la propia 1-C-Grx1?. Aún no tenemos una explicación convincente para ello pero suponemos que debe haber sutiles diferencias estructurales que hacen la diferencia, lo cual podremos responder solo cuando completemos la resolución estructural de 1-C-Grx2.

## **Capítulo 6**

### **Aproximación al rol biológico de *Tb1-C-Grx1* y a su función en la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei***

## 6.1. Motivación y aproximación experimental

Luego de haber abordado aspectos evolutivos, bioquímicos y estructurales de *Tb1-C-Grx1* en los capítulos anteriores, retomamos la línea de exploración biológica iniciada en trabajos previos de nuestro grupo (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008) que en esta tesis tenían por objetivo verificar la indispensabilidad de la proteína para la supervivencia del parásito en el huésped mamífero así como aproximarnos a su rol biológico. Para ello, abordamos la caracterización fenotípica de líneas transgénicas sobreexpresantes de la forma silvestre o mutantes C104S y C181S (ver a continuación). A su vez aprovechamos las excelentes capacidades técnicas del IP para desarrollar un modelo de infección animal basado en sistemas de inducción *in vivo* de las diferentes versiones de la proteína, los cuales nos aportaron información muy valiosa sobre el posible rol de 1-C-Grx1 en el progreso de la infección. En esta sección se presentará la caracterización de estas líneas tanto en condiciones de cultivo axénicas como en modelos animales. Todo el trabajo de cultivo celular, WB y citometría fue realizado por el autor, mientras que el trabajo de microscopía y modelos animales fue realizado fundamentalmente por el Director de esta tesis (Dr. M. A. Comini) y la Dra. Andrea Medeiros (Facultad de Medicina-Institut Pasteur). Para los ensayos de infección animal se contó con la colaboración técnica del personal de la UATE. Parte de estos datos fueron publicados en (Manta et al., 2013a) y, como quedará planteado en las próximas secciones, constituyen resultados mayoritariamente preliminares los cuales requieren de una importante cantidad de trabajo adicional para esclarecer los eventos moleculares que determinan la función de esta (y otras) Grx en *T. brucei*.

## 6.2. Generación de líneas transgénicas sobreexpresantes de *Tb1-C-Grx1*

Durante la primera etapa de investigación en este proyecto, Comini y colaboradores intentaron sin éxito generar líneas interferentes (RNAi) o “knock-out” (KO) de *Tb1-C-Grx1* en la forma infectiva de *T. brucei*. Como se discute en el trabajo original (Comini et al., 2008), la refractariedad de BSF de *T. brucei* a soportar cualquier disminución de la expresión de *Tb1-C-Grx1* fue un claro indicador de su indispensabilidad. En el mismo trabajo los autores generaron una línea transgénica capaz de expresar de manera inducible una copia ectópica de la versión silvestre (WT) del gen de 1-C-Grx1. Como cepa de referencia (“background”) se usó la línea monomórfica de *T. brucei* 514-1313<sup>81</sup> desarrollada por Alibu y colaboradores (Alibu et al., 2005) que, de ahora en más, denominaremos línea parental y se representará con el acrónimo “TbWT”. El gen de 1-C-Grx1 WT fue clonado en un vector con resistencia a higromicina (pHD1700<sup>82</sup>) y las líneas estables fueron seleccionadas mediante este antibiótico. Esta línea transgénica se denominará “TbGrx1” (Comini et al., 2008). Adicionalmente, Rettig y Comini (Rettig, 2007) desarrollaron líneas sobreexpresantes de las versiones C104S y C181S de esta proteína, a las cuales denominamos de ahora en más “TbC104S” (Manta et al., 2013a) y “TbC181S” (no publicado).

---

<sup>81</sup> La línea 514-1313 es una modificación de la línea Lister 427 (pedigrí en [http://tryps.rockefeller.edu/DocumentsGlobal/lineage\\_Lister427.pdf](http://tryps.rockefeller.edu/DocumentsGlobal/lineage_Lister427.pdf)) que posee integrado en su genoma una copia de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 asociada a un casete de resistencia a fleomicina, cuya expresión está controlada por promotores “tet” inducibles por tetraciclina. Para minimizar la expresión en ausencia de inductor (“leaking”) esta línea también posee integrada dos copias del gen que codifica para la proteína represora del operon tet “tn10”, asociadas a un casete de resistencia a gentamicina.

<sup>82</sup> <http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/clayton/vectors.html>

En todos los casos la proteína recombinante inducida posee la misma estructura de dominios que la proteína silvestre de *T. brucei*, con la secuencia de localización mitocondrial original, la región NTE y el dominio Grx, sumado a dos copias del epítopo *c-myc* en posición carboxiloterminales, lo que le adiciona 20 aminoácidos más respecto a la versión endógena. Tanto la forma silvestre (Comini et al., 2008) como una de las versiones mutantes de *Tb1-C-Grx1* recombinante (ver a continuación) son correctamente importadas hacia la mitocondria, donde la señal de localización mitocondrial es procesada. Antes de continuar, es importante destacar que todas estas líneas sobreexpresantes fueron desarrolladas sobre la línea parental y mantienen la expresión de la copia endógena de *Tb1-C-Grx1* (indicada como “eGrx” en las próximas figuras), la cual puede ser diferenciada de la copia recombinante (“rGrx”) en experimentos de WB de tres maneras: *i*) el nivel de expresión de la versión recombinante (ectópica) una vez inducida es como mínimo 5-10 veces mayor que la copia endógena (ver a continuación), *ii*) la copia ectópica es ~2 kDa más pesada producto de los etipotes *c-myc* y *iii*) la copia ectópica puede ser reconocida específicamente con anticuerpos contra ese epítopo, ausente en la copia endógena. Más allá de la posibilidad de diferenciarlas, la presencia de la versión endógena determina que debemos ser muy cuidadosos en el análisis de los resultados que presentaremos a continuación ya que los mismos derivan de la sobreexpresión de una proteína cuya copia funcional sigue presente, existiendo la posibilidad de efectos de toxicidad o “*off-target*” difíciles de disecar en los experimentos que llevamos a cabo.

### 6.3. Caracterización de la línea TbC104S

Se obtuvieron 3 clones sobreexpresantes para la forma C104S de 1-C-Grx1 (Rettig, 2007), los cuales fueron caracterizados fenotípicamente de manera individual (Manta et al., 2013a). En primer lugar se evaluó el crecimiento de los mismos en condiciones de cultivo axénico en presencia o ausencia del agente inductor de la expresión de la copia ectópica de 1-C-Grx1 (tetraciclina u oxitetraciclina) (Figura 6.1.A-B) con resiembra a una densidad de  $1 \times 10^5$  cel/mL en medio de cultivo fresco cada 48 hrs, como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se colectaron muestras de los cultivos a distintos tiempos con el fin de controlar los niveles de expresión de la copia ectópica 1-C-Grx1 C104S y su versión endógena mediante WB. Como se puede apreciar en la Figura 6.1.C, en dos de los tres clones obtenidos la expresión de la copia ectópica es inducible por tetraciclina, mientras que uno de los clones (clon 1 en Figura 6.1) mostró niveles de sobreexpresión equivalentes en presencia o ausencia del inductor, lo cual indica una deficiencia en el mecanismo de represión de la copia ectópica de esta proteína. Este fenómeno es conocido como “leakiness” (permeabilidad) y ha sido reportado de manera frecuente en los sistemas “*tet-on*” generados para tripanosomátidos (ver por ej. (Alloatti et al., 2010; Basu et al., 2013; Gould et al., 2013; Wickstead et al., 2002)). A pesar de la diferencia en el control transcripcional de la copia ectópica en el clon 1, bajo el régimen de cultivo mostrado en la Figura 6.1.A los tres clones presentan una cinética de crecimiento exponencial similar e independiente de la presencia de inductor y de los niveles de la forma endógena de esta proteína (Figura 6.1.C), lo que sugiere que la sobreexpresión del mutante C104S de 1-C-Grx1 no tiene un efecto deletéreo en el parásito en éstas condiciones de cultivo axénico.

La concentración de tetraciclina usada como inductor fue la misma que la reportada para la línea TbGrx1 (1  $\mu$ g/mL, (Comini et al., 2008)) y, adicionalmente, en estos experimento probamos que la inducción también fuera posible por oxitetraciclina (“oxitet”, Figura 6.1.C), ya que este antibiótico es el inductor usado en los modelos animales de infección (ver más adelante). La concentración usada de oxitet fue

puesta a punto en experimentos paralelos con el mismo sistema de expresión y resultó ser necesario usar una concentración 10 veces mayor para lograr niveles de inducción similares (Comini y Medeiros, no mostrado). Como los resultados fueron equivalentes, para todos los demás subsiguientes experimentos usamos oxitetraciclina. Al analizar la curva temporal de sobreexpresión de la copia ectópica en la línea TbC104S (clon 3) pudimos determinar que la misma es detectable por WB a las 16 hr post inducción, alcanzando antes de las 24 hrs niveles equivalentes a los mostrados para las 48 hrs en la Figura 6.1.C (no mostrado). El nivel de sobreexpresión que alcanza la copia ectópica es varias veces superior a la forma endógena, pero muy variable, como se puede ver en la Figura 6.1. Con el objetivo de determinar el exceso relativo de la copia ectópica respecto de la forma endógena expresada en la cepa WT registramos varias imágenes de WB a partir de experimentos equivalentes a los de la Figura 6.1.C en donde ambas versiones de 1-C-Grx1 (endógena y ectópica) y el control de normalización o carga, la TXN, fueran visibles. Estas imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ (ver Capítulo 8) y pudimos determinar que la copia recombinante se expresa, como mínimo, a niveles 5-10 superiores respecto a la versión endógena (Manta et al., 2013a), lo cual está en línea con lo demostrado previamente por Comini y colaboradores empleando el mismo sistema huésped/vector para la sobreexpresión de la ectópica de la proteína 1-C-Grx1 WT (Comini et al., 2008). Por otro lado y como se verá a continuación, observamos (Figura 6.1.C) marcadas fluctuaciones en la expresión de la forma endógena de 1-C-Grx1 cuando el mutante C104S es sobreexpresado, si bien no logramos identificar un patrón específico ni causa definida que explique dicho efecto (ver más adelante).

Como parte de la caracterización fenotípica de estos clones también se evaluó el patrón de crecimiento partiendo de diferentes densidades celulares iniciales, en presencia o no de inducción de la copia ectópica. Estos experimentos se incluyeron porque durante la caracterización de la línea TbGrx1 se reportó un aumento en la expresión de la copia ectópica durante la fase estacionaria o de escasas de nutrientes (*"starvation"*) (Comini et al., 2008), la cual no se alcanza en los experimentos como los mostrados en la Figura 6.1.A donde el repique periódico repone los nutrientes disponibles para el parásito. En una primera instancia determinamos que los tres clones de TbC104S sometidos a crecimiento continuo (cultivo tipo *batch*) en presencia o ausencia de inductor con una siembra inicial de  $1 \times 10^5$  cel/mL mostraron un patrón muy similar entre ellos y, a su vez, similar a la línea parental, alcanzando la fase estacionaria entre 48 y 72 hrs luego de la siembra y con densidades celulares máximas de  $3-4 \times 10^6$  cel/mL (no mostrado). Esto coincide con lo comentado más arriba, confirmando que no hay un efecto evidente de la sobreexpresión del mutante C104S en el crecimiento de esta línea. Para forzar condiciones de escasas de nutrientes, realizamos una variación del experimento antes comentado. Las células fueron sembradas a  $1 \times 10^5$  cel/mL (fase de crecimiento exponencial) en presencia o ausencia de inductor y crecidas en cultivo continuo por 48 hrs, cuando alcanzan una densidad  $1.5 - 3 \times 10^6$  cel/mL (fase exponencial tardía, Figura 6.1.D). En este punto se realiza una toma de muestra para WB y repique a dos densidades celulares ( $1$  y  $5 \times 10^5$  cel/mL), posteriormente crecidas otras 24 hrs, cuando se realiza el recuento y cosecha de las muestras para WB. Como se puede ver en la Figura 6.1.D, todos los cultivos retoman el ritmo de crecimiento esperado luego del repique a las 48 hrs pero los cultivos repicados a *menor densidad* celular continúan en fase exponencial 24 hrs después de la resiembra (densidad celular en día 3  $\sim 2 \times 10^6$  cel/mL ver Figura 6.1.D), mientras que los cultivos sembrados a *mayor densidad* celular ya entraron en fase estacionaria cumplido este tiempo (densidad celular en día 3  $\sim 5 \times 10^6$  cel/mL ver Figura 6.1.D). Al analizar en detalle los resultados podemos ver que la sobreexpresión de la copia

ectópica C104S produce un efecto marcado en el crecimiento de los cultivos sembrados a mayor densidad, los cuales alcanzan densidades celulares sustancialmente menores que los no inducidos. Sin embargo, ambos clones ensayados responden distinto en este experimento, tanto a nivel de densidad celular (Figura 6.1.D) como de sobreexpresión de la copia ectópica (Figura 6.1.E) lo que puede indicar que el resultado es artefactual o, por el contrario, puede representar variaciones epigenéticas en el funcionamiento del sistema de expresión recombinante y de regulación de la copia endógena de 1-C-Grx1 entre clones que aún no podemos explicar, ya que, por ejemplo, el clon 2 muestra un comportamiento diferente en el experimento de la Figura 6.1.C

Finalmente, es importante destacar que realizamos la determinación de la localización subcelular de la forma ectópica de la proteína en el parásito mediante microscopía confocal usando anticuerpos tanto contra la proteína recombinante como contra el epítipo *c-myc*. Estos resultados confirman la correcta localización subcelular de la copia ectópica en la mitocondria del parásito y muestran que esta línea transgénica, al igual que TbGrx1 (Comini et al., 2008), no presenta cambios evidentes en la morfología producto de la sobreexpresión de Tb1-C-Grx1 (Manta et al., 2013a).

#### **6.4. Comparación TbC104S con TbGrx1 y TbWT**

El siguiente paso fue comparar el crecimiento de la línea TbC104S (clon 3) relativo a la otra línea sobreexpresante previamente caracterizada (TbGrx1, (Comini et al., 2008)) y a la línea parental (TbWT). Para ello las tres líneas fueron sembradas a  $1 \times 10^5$  cel/mL y analizadas con dos regímenes de recuento y resiembra. En el primer caso los cultivos fueron contados manualmente cada 48 hrs y repicados a la densidad inicial (Figure 6.2.A-B) permitiendo que los cultivos alcancen densidades celulares de fase exponencial tardía - estacionaria ( $\sim 4 \times 10^6$  cel/mL). En el segundo caso el recuento se realizó cada 24 hrs, manteniendo los cultivos siempre en densidades de fase exponencial ( $\leq 2 \times 10^6$  cel/mL, Figura 6.2.C-D). Como se puede ver en la Figura 6.2A-D, si bien hay una pequeña diferencia en la densidad celular que alcanza la línea TbC104 respecto de las otras dos, esta diferencia es independiente de inducción de la copia ectópica y no es significativa en ningún caso. A su vez, esta sutil diferencia se observa para ambas líneas transgénicas (TbGrx y TbC104S) y es más evidente en los cultivos mantenidos durante 10 días con repique diario (Figura 6.2.C-D), los cuales se mantienen siempre en crecimiento exponencial. Esta menor tasa de crecimiento puede estar asociada al costo metabólico de mantener el sistema de expresión ectópico funcional, el cual requiere de la co-expresión de la proteína represora de tetraciclina así como de los genes de resistencia a los diferentes antibióticos (gentamicina e higromicina; ver Materiales y Métodos). Adicionalmente, en este mismo experimento puede verse que los niveles de sobreexpresión alcanzados son similares a los comentados en la figura anterior y a los reportados para la línea TbGrx1 (Comini et al., 2008) (Figura 6.2.E) y que es posible crecer el clon 3 de TbC104S hasta 20 días sin que se evidencie "leaking" (Figura 6.2.F). La obtención de un clon con un sistema de expresión ectópico estable e inducible resulta muy importante para los futuros experimentos *in vivo*.

## 6.5. Caracterización de la línea TbC181S y comparación con las restantes líneas transgénicas y parental

Luego de tres rondas de transfección con el plásmido pHD1700-Tb1-C-Grx1 C181S se lograron generar tres líneas transgénicas (TbC181S) resistentes al antibiótico de selección (higromicina) (Rettig, 2007) las cuales mostraron distintos patrones de crecimiento en cultivo (Figura 6.3.A) y expresión de la proteína recombinante (Figura 6.3.B). De los tres clones obtenidos solo uno mostró una expresión inducible por tetraciclina (clon 2) mientras otro no respondió al agente inductor (no mostrado) y el tercero presentaba altos niveles de expresión de la copia ectópica aún en ausencia de inducción (clon 3). Por motivos que desconocemos, el clon que perdió el control regulable de la expresión de la copia ectópica (clon 3) mostró una tasa de duplicación que prácticamente duplica a la del clon inducible en condiciones de cultivo, con o sin agregado de oxitetraciclina (Figura 6.3.A). Sin embargo, al comparar la diferencia de densidad celular alcanzada por ambos clones en función de la inducción, vemos que para el clon 2 la diferencia entre la línea inducida y no inducida es significativa, lo que sugiere un efecto deletéreo de la inducción del mutante C181S previamente no identificado en las otras líneas sobreexpresantes. Extrapolando este posible efecto tóxico al clon 1, donde hay una expresión constitutivamente alta del mutante C181S, es de esperar que la misma se haya acompañado por la activación de mecanismos que contrarresten el efecto nocivo que puede tener la expresión de este mutante sobre la fisiología celular (ver más abajo).

A continuación se evaluó el efecto de la sobreexpresión de C181S sobre el crecimiento de cultivos tipo *batch* iniciados a diferentes densidades celulares comparando inducción vs. no inducción. Como se puede ver en la Figura 6.3.C el efecto deletéreo de la sobreexpresión de C181S es mucho más marcado en los inóculos de baja densidad celular ( $\leq 10^4$  cel/mL) en los cuales se evidencia una pronunciada fase *lag* y/o retardo en la proliferación de los parásitos. La fase *lag* transcurre sin división celular aparente pero se caracteriza por el aumento en volumen y masa de las células así como una importante actividad metabólica abocada a la preparación de la etapa proliferativa. La duración de la fase *lag* está influenciada por varios factores como la carga del inóculo (a menor inóculo mayor tiempo de fase *lag*), el tiempo que le tome a las células recuperarse del *shock* físico y mecánico de la transferencia a medio fresco, así como de su estado metabólico inicial. Este último factor se relaciona a la capacidad de la célula de contar con co-enzimas, factores de crecimiento autócrinos y un pool de enzimas inducibles necesarias para metabolizar los nutrientes presentes en el medio fresco. En base a esto, la interpretación que consideramos más probable para el fenotipo observado en cultivos de baja densidad es que la sobreexpresión de C181S esté afectando algún proceso biosintético indispensable para una rápida adaptación metabólica de la célula a un medio rico en nutrientes. Una forma de intentar demostrar esta hipótesis es analizar el consumo de glucosa por los parásitos sembrados a baja densidad celular inicial en cultivo continuo bajo condiciones de inducción del mutante C181S comparado a la línea no inducida. Como se puede ver en la Figura 6.3.D, si bien el efecto de la sobreexpresión del mutante C181S recapitula lo mostrado anteriormente (Figura 6.3.C), la diferencia en el consumo de glucosa entre la línea inducida y no inducida recién se torna significativa en el día 4, donde los cultivo ya salieron de la fase *lag* (Figura 6.3.E). Más aún, la glucosa remanente en el medio de cultivo de la línea inducida es *menor* que en la línea no inducida, lo que apunta a cierta desregulación metabólica en la vía glicolítica producto de la sobreexpresión de C181S.

Por último, teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente para las otras líneas transgénicas se decidió evaluar de manera comparativa el fenotipo de crecimiento de las tres líneas transgénicas en un único experimento (para reducir diferencias derivadas de los lotes de suero y medio empleados) y bajo un régimen de cultivo con siembra a baja densidad basado en los resultados mostrados en la parte anterior (Figura 6.3.D). Al sembrar las células a  $5 \times 10^3$  cel/mL minimizamos el efecto del retardo en la fase *lag* que presenta la línea TbC181S inducida respecto de las restantes y al repicar cada 72 hrs se evita que las células entraran en fase de crecimiento estacionaria, donde la escases de nutrientes tiene un efecto marcado en la proliferación de la línea TbGrx1 (Comini et al., 2008). Como se puede ver en la Figura 6.3.F, las tres líneas se comportan de manera equivalente (dentro del margen del error) hasta el día 6 y la diferencia entre las líneas inducidas y no inducidas comienza a ser evidente recién a partir del día 9 para los mutantes C104S y C181S y el día 12 para el sobreexpresante de la forma WT. A partir de esos tiempos, las líneas inducidas presentan una tasa de crecimiento inferior a las no inducidas como se puede notar a partir de las menores densidades celulares obtenidas en cada repique y la curvatura negativa que comienza a describir la curva de densidad celular acumulada (Figura 6.3.G). La línea TbGrx1 por su parte, si bien demora unos días más en sufrir el efecto de la inducción, llega a un punto similar al día 12. El fenómeno no se revierte ni se agudiza en el siguiente repique (día 15), donde la densidad celular que alcanzan los cultivos inducidos ( $\sim 1 \times 10^6$  cel/mL) es prácticamente la mitad de la alcanzada por los cultivos no inducidos, indicando sin ninguna duda un efecto deletéreo de la sobreexpresión de estas proteínas sobre la proliferación de la forma infectiva de *T. brucei* bajo este régimen de cultivo. Más aún, en la Figura 6.3.F-G queda evidenciado que dicho efecto es más marcado para las líneas que expresan los mutantes de 1-C-Grx1, destacándose la línea TbC181S por presentar la mayor diferencia de crecimiento al comparar cultivos inducidos y no inducidos. Es interesante destacar que, contrario a lo que se muestra en esta figura, en los regímenes de cultivo ensayados anteriormente no habíamos podido evidenciar esta diferencia entre las líneas inducidas y no inducidas de TbC104S y TbGrx1. Adicionalmente, ambas réplicas biológicas de este experimento muestra que las proteínas recombinantes se expresan a niveles similares en todos los casos (analizado por WB) durante los 15 días que duró el mismo, sin evidencia de leaking en ninguno de ellos (en la Figura 6.3.H se muestra de manera representativa el resultado obtenido para el clon 3 del mutante C181S).

## **6.6. Efecto de la sobreexpresión de las diferentes versiones de 1-C-Grx1 para la supervivencia del parásito *in vivo* y el progreso de la infección.**

### **6.6.1. Estrategias basadas en la infección con cepas monomórficas**

La mayoría de los trabajos de investigación con la forma infectiva de *T. brucei* se realiza empleando cepas adaptadas al crecimiento en cultivos axénicos, obtenidas a través de sucesivos pasajes en roedores de experimentación, lo cual en su conjunto las ha llevado a perder y/o reducir su capacidad de diferenciarse a la forma "short stumpy" (SS, ver Capítulo 1). Debido a su homogeneidad morfológica, estabilidad antigénica e incapacidad de transformarse a otros estadios del ciclo de vida, dichas líneas celulares han sido denominadas *monomórficas*. Como se mencionara en la Introducción, las infecciones naturales suceden por cepas *pleiomórficas* y transcurren con ondas recurrentes de parasitemia marcadas por la aparición de nuevas poblaciones clonales de parásitos conteniendo una nueva variante de VSG y la concomitante diferenciación de la anterior población parasitaria al estado no replicativo SS y/o su

eliminación por parte del sistema inmune, lo que posibilita el establecimiento de un estado pseudo-crónico de infección en el hospedero. En el caso de las líneas monomórficas esto no ocurre y la infección en animales de laboratorio tiene un progreso agudo y fulminante, con pérdida de indicadores de salud y elevados niveles de parasitemia (Macgregor et al., 2013), dado que la proliferación de los parásitos en sangre solo está limitada por la resistencia que pueda ofrecer el sistema inmune del huésped. Si bien esto es una desventaja evidente de las infecciones con cepas monomórficas, las mismas han sido adaptadas para analizar el efecto de la supresión o sobreexpresión específica de genes mediante inductores, como en las Figuras mostradas más arriba, y su desarrollo dentro del animal estará igualmente afectado por el ambiente hostil que impone el hospedero, lo que permite el análisis funcional de genes así como el efecto de compuestos con potencial farmacológico en la progresión de la infección *in vivo*.

Las pruebas de función génica *in vivo* se pueden llevar a cabo con líneas de parásitos carentes del gen en cuestión (por ej. líneas KO), con expresión o silenciamiento regulable del gen endógeno (por ej. líneas con RNAi inducibles o KO condicional) o con líneas donde se exprese de manera inducible una versión alterada y disfuncional de la secuencia endógena sin alterar la expresión de esta última, estrategia conocida como “dominante negativo”. Esta última aproximación es fundamentalmente útil en los casos en los cuales los parásitos son refractarios a la supresión o subregulación de una proteína endógena, como es nuestro caso, pero su éxito depende de *cómo* funcione la proteína en cuestión *in vivo* para ser aplicable y no tanto de su función específica (ver a continuación). Una de sus aplicaciones más comunes es para estudiar el efecto de proteínas que cumplen su función formando homo- o heteromultímeros, ya que la estrategia necesita solamente de la sobreexpresión de una forma mutada de la proteína endógena (Lagna and Hemmati-Brivanlou, 1998). Existen varios ejemplos del empleo exitoso de esta herramienta en *T. brucei* para la caracterización de la función de proteínas que forman o no homo- o hetero-complejos (ver por ej. (Abdulla et al., 2008; Gluenz et al., 2008; Salmon et al., 2012)). Algo importante a tener en cuenta es que la estrategia de dominante negativo generalmente no neutraliza por completo la actividad de la forma endógena de la proteína blanco y que por lo tanto la severidad del fenotipo dependerá de los niveles de expresión alcanzados de la copia ectópica y del impacto funcional de las mutaciones en la actividad biológica de la proteína blanco.

En colaboración con la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo hemos puesto a punto el modelo de infección de ratones de la cepa BALBc/J, la cual es reconocida como una cepa susceptible a la infección por *T. brucei brucei* (Antoine-Moussiaux et al., 2008). El desarrollo de esta herramienta nos ha permitido realizar varios estudios de validación biológica de blancos moleculares de estos patógenos empleando líneas RNAi o KO clásicas o condicionales del gen en estudio (Manta et al., 2013a; Roldán et al., 2011)(Krul y Comini, 2013, no publicado; Hiller, Comini, Krauth-Siegel, 2013, no publicado; Musunda, Comini, Krauth-Siegel, 2013, no publicado). Finalmente, es importante destacar que *T. brucei brucei*, a diferencia de la subespecie *T. b. rodhesiense*, no es patogénica para el ser humano pero sí para animales, a pesar que la segunda es tan solo una variante fenotípica que se diferencia de la primera exclusivamente en poseer un gen que le confiere resistencia a proteínas plasmáticas humanas (Balmer et al., 2011) (ver Capítulo 1). Por lo tanto los comportamientos biológicos observados en este modelo pueden ser trasladados y son clínicamente de alto impacto para la subespecie patógena humana.

### 6.6.2. Modelos *in vivo* de infección con las líneas transgénicas TbGrx1 y TbC104S

Dado que no fue posible desarrollar líneas RNAi o KO para *Tb1-C-Grx1*, en este trabajo nos valimos de la estrategia de dominante negativo para estudiar el efecto de esta proteína en la infección de *T. brucei*. Cuando se realizó el diseño de estos experimentos considerábamos que *Tb1-C-Grx1* era una proteína dimerica por lo cual la sobreexpresión del mutante C104S a niveles 5-10 veces superiores a la proteína endógena determinaría la formación de heterodímeros híbridos entre la proteína endógena y el mutante recombinante, y homodímeros de C104S, los cuales, entre otras posibles funciones afectadas, no serían capaces de ensamblar centros ferrosulfurados por la ausencia de la cisteína 104 en una o dos de las subunidades del dímero. Si bien en la actualidad sabemos que esto fue un error de interpretación, estos experimentos dieron resultados muy relevantes (ver a continuación) los cuales, en función de la función propuesta para las Grx monotiólicas en la biogénesis de centros ferrosulfurados, pudieron ser también interpretados en el marco de una estrategia de dominante negativo aunque considerando la formación de *heteromultímeros* disfuncionales y no de *heterodímeros* (WT/C104S) u *homodímeros* (C104S/C104S).

En primer lugar se priorizaron los ensayos de infección con la línea sobreexpresante de C104S (TbC104S) debido a que los resultados de ensamblaje *in vivo* (expresión en sistema procariota) e *in vitro* (Capítulo 4) indicaban la incapacidad de este mutante para unir un FeS. También se incluyó el sobreexpresante de la línea WT (TbGrx1) por su sensibilidad demostrada *in vitro* a estreses que tendrían lugar a nivel fisiológico (Comini et al., 2008; Namangala, 2012; Salmon et al., 2012). Las infecciones, monitoreo y extracciones de sangre y eutanasia de hembras BALBc/J se realizaron como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se confeccionaron dos grupos de animales, uno de los cuales recibió agua normal (grupo “-T”) y el otro recibió oxitetraciclina (1 mg/mL, grupo “+T”) en el agua de consumo desde el día 3 previo a la infección, con agregado de antibiótico fresco cada 48 hrs y hasta donde se indique en el correspondiente ensayo. A su vez, estos grupos se separaron en subgrupos de seis animales cada uno que fueron infectados con la línea parental (TbWT) y las líneas transgénicas TbC104S o TbGrx1. La supervivencia de los animales a lo largo del tiempo se grafica como curvas de Kaplan-Meier en modo porcentual (Figura 6.4A y C). De manera periódica se realizaron tomas de muestras en todos los animales vivos de cada grupo para determinar la carga de parásitos en sangre (parasitemia; Figura 6.4.B y D). Aquellos animales que presentaban un estado de salud marcadamente deteriorado y/o niveles de parasitemia  $\geq 10^8$  cel/mL fueron sacrificados por razones éticas ya que nuestra experiencia previa indica que ~90% de los animales con este nivel de parasitemia mueren en el lapso de las siguientes 24 hrs.

La infección en los animales del grupo control (TbWT) tratados o no con oxitetraciclina tuvo un desarrollo típico caracterizado por una alta mortandad al cabo de 2 semanas como consecuencia de los elevados niveles de parasitemia ( $10^6$  cel/mL), en coincidencia con estudios similares con cepas monomórficas (Claes et al., 2009; Emmer et al., 2010) (Figura 6.4.A-B). Además no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los animales que recibieron o no el agente inductor, lo que nos permite asegurar que la administración de oxitetraciclina, tal como se observó *in vitro*, no afecta la proliferación de los parásitos de la línea parental *in vivo*. Por el contrario, el perfil de supervivencia de ratones infectados con la línea TbC104S ( $\pm$ T) mostró marcadas diferencias respecto de lo comentado para la línea parental. Al analizar los resultados de la Figura 6.4.A vemos que el grupo infectado con la

línea mutante y que no recibió oxitet (TbC104S-T) presenta un tiempo de supervivencia media ( $T_{50}$ ) aproximadamente nueve días superior al del grupo control TbWT-T, ocurriendo el deceso del último animal de este grupo el día 29 post-infección, 13 días más tarde que el observado para el grupo TbWT-T y que, en concordancia con la mayor supervivencia exhibida por el grupo TbC104S-T, la parasitemia en estos animales evolucionó de manera sostenida pero con valores promedialmente inferiores a los del grupo TbWT-T (Figura 6.4.B). Una posible explicación de este comportamiento diferencial entre líneas *no inducidas* podría ser la menor tasa de crecimiento de la línea mutante respecto de la línea parental, aunque la magnitud del fenómeno *in vitro* (Figura 6.2.C) no se correlaciona con lo que se evidencia *in vivo* (Figura 6.4.A).

Sin embargo, el fenómeno más notable se da al comparar el efecto de la inducción en los animales infectados con la línea TbC104S. En este grupo de animales se observó solamente un deceso (al día 7) en todo el período de 77 días durante el cual el grupo permaneció en observación. Esto se traduce en una sobrevivencia del 83% y una significativa reducción de la capacidad infectiva de los parásitos bajo condiciones de inducción de la copia ectópica del mutante C104S de 1-C-Grx1 respecto del grupo control no inducido TbC104S-T. De hecho, el análisis de la parasitemia en los animales del grupo TbC104S+T pone claramente en evidencia no solo la menor tasa proliferativa de estos parásitos (con niveles de parasitemia 1-3 órdenes de magnitud inferiores a los del grupo TbC104S-T) sino su incapacidad de sostener la misma en el curso de la infección. En ese sentido, resultó muy interesante observar que a partir del día 10 post-infección la proliferación de los parásitos en sangre adquirió un comportamiento cíclico con picos de parasitemia cada 7-10 días seguidos de descensos marcados (1-2 órdenes de magnitud) en el número de parásitos. Al cabo de 62 días de monitoreo continuo de los animales y habiendo pasado casi dos meses sin un deceso se procedió a suspender el tratamiento con oxitet del grupo TbC104S+T y se examinaron muestras de sangre de manera frecuente por espacio de 20 días. En ningún caso se observó la reaparición de parásitos en sangre y/o de signos y síntomas de enfermedad, por lo cual los animales se consideraron curados. Adicionalmente, en el único caso de alta parasitemia del grupo TbC104S+T (animal que muere al día 7) se realizó la extracción total de sangre por punción cardíaca y los parásitos fueron purificados como se indica en el Capítulo 8, para luego realizar ensayos de inmunofluorescencia y WB con ellos. A partir de estos experimentos pudimos demostrar que en las condiciones de inducción *in vivo* usadas en estos experimentos se da la inducción de la copia ectópica y su correcta localización mitocondrial, si bien el nivel de proteína recombinante alcanzado *in vivo* parecen inferiores a al que observamos previamente al inducir la proteína en cultivos axénicos (no mostrado, (Manta et al., 2013a))

Análogamente al experimento de infección recién comentado, se realizó el experimento de infección con la línea transgénica TbGrx1 (Figura 6.4.C-D). Los controles de infección con la cepa salvaje (TbWT) mostraron un perfil de supervivencia y desarrollo de la parasitemia prácticamente idéntico al mostrado anteriormente (TbWT  $\pm$ T en Figura 6.4.C) y por lo tanto independiente de la administración de oxitetraciclina. Los ratones inoculados con TbGrx1 que no fueron alimentados con oxitetraciclina (grupo TbGrx1-T) presentaron un perfil de supervivencia muy similar al del grupo control (TbWT-T), distinguiéndose de este último por un desfase de 4 días en el  $T_{50}$ . Este comportamiento se diferencia marcadamente del grupo TbC104S-T comentado más arriba (Figura 6.4.A). La administración de inductor de la expresión a los animales infectados con TbGrx1 produjo un incremento en su tasa de supervivencia (TbGrx1+T,  $T_{50}$ =21 días) en relación a la obtenida para el grupo que no recibió este tratamiento (TbGrx1-

T,  $T_{50}=11$  días). Por otro lado, 2 de los 6 (33 %) animales del grupo TbGrx1+T se mantuvieron vivos hasta el día 35 post-infección. Esta diferencia en la supervivencia de los animales infectados con TbGrx1 T+ y T- resultó significativa. El desarrollo de la parasitemia en el grupo TbGrx1+T resultó bastante atípico ya que luego de un pico inicial al día 4 post-infección (Figura 6.4.D), 3 días más tarde (día 7) la misma descendió a niveles indetectables siendo el límite de sensibilidad del método de recuento de  $2.5 \times 10^4$  cel/mL de sangre. Excepto por los dos animales sobrevivientes, donde al cabo de 35 días no se observaron parásitos en sangre, en el resto de los ratones la parasitemia se incrementó a niveles similares a los detectados en el grupo control (TbGrx1-T; Figura 6.4.D), lo cual es compatible con el patrón de supervivencia observado (Figura 6.4.C). Esta recuperación de la actividad proliferativa *in vivo* de los parásitos TbGrx1+T podría estar indicando que los mismos lograron establecer mecanismos compensatorios para superar el efecto nocivo que ejercía la sobreexpresión de 1-C-Grx1. Es interesante destacar que este mismo comportamiento se observó en experimentos de infección análogos a los mostrados aquí con parásito KO para una GPx mitocondrial (Hiller, Comini, Krauth-Siegel, 2013, no publicado).

Si bien los datos presentados aquí señalan que la capacidad infectiva de parásitos inducidos a sobreexpresar la forma WT de 1-C-Grx1 es menor a la de células con niveles normales de esta proteína, el efecto es marcadamente inferior al observado para el sobreexpresante de C104S. Esto no solo se puede apreciar en el mayor nivel de supervivencia alcanzado por el grupo TbC104S +T (83%) respecto del grupo TbGrx1 +T (33%) al final del experimento sino también a partir de los datos de parasitemia que revelan que, si bien en el grupo TbC104S+T persisten animales infectados a lo largo del tiempo, la carga de parásitos en los mismos es promedialmente un orden de magnitud inferior a la detectada en los animales del grupo TbGrx1+T.

### **6.7. Respuesta a estrés oxidativo y depleción de hierro de la línea sobreexpresante de 1-C-Grx1 C104S.**

Comini y colaboradores demostraron que el agregado de  $100\mu\text{M Fe}^{3+}$  al medio de cultivo no afecta el crecimiento de la línea parental así como tampoco de la línea TbGrx1, independientemente de si se induce o no la expresión de la copia ectópica (Comini et al., 2008). Por el contrario, la sobreexpresión de la copia silvestre de Tb1-C-Grx1 determina que estas células sean considerablemente más sensibles al quelante de hierro DFX que las células no inducidas y, adicionalmente, se tornan menos resistentes al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , un agente oxidante permeable que puede ser particularmente tóxico en presencia de metales de transición no quelados (Comini et al., 2008). Con el fin de poder contar con información adicional que nos permita comprender el drástico fenotipo observado *in vivo* para esta línea celular, en este trabajo realizamos experimentos de desafío similares a los descritos arriba pero sobre la línea TbC104S y utilizando citometría de flujo para realizar el recuento de los parásitos viables luego de cada tratamiento (Figura 6.5). Esta aproximación nos permitió un análisis más detallado del efecto de los tratamientos, así como la posibilidad de explorar una mayor cantidad de condiciones experimentales y aumentar el número de réplicas. Como se puede ver en la Figura 6.5.A-B, el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 24 hrs tiene un marcado efecto citoestático y citotóxico en la línea TbC104S e independiente de la inducción de la copia ectópica. En presencia de concentraciones bajas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10-25  $\mu\text{M}$ ) las densidades celulares alcanzadas luego son equivalentes a la densidad de siembra y no se observa un incremento significativo

de la señal de yoduro de propidio (PI), lo que indica un efecto citoestático del oxidante. El punto de inflexión entre el efecto citoestático y citotóxico parece ocurrir entre 50 y 100  $\mu\text{M}$ , ya que los parásitos no solo dejan de crecer sino que mueren, como indica además el incremento en los valores de células positivas para PI. Esto es evidenciable en los propios campos de análisis del citómetro donde se ve el despoblamiento de la zona correspondiente a las células viables (Figura 6.5.C). La deferoxamina, por su parte, tiene un efecto mayoritariamente citoestático, ya que los niveles celulares alcanzados luego de 24 hr de cultivo en presencia de la droga no son nunca inferiores al punto de partida y no se evidencia un incremento en la población de parásitos positivos para PI (Figura 6.5.D-E). Esto se correlaciona con el resultado de citometría, donde no se ve un cambio importante en la población de células viable por efecto del quelante (Figura 6.5.F). En conclusión, a diferencia de lo observado para el sobreexpresante de la 1-C-Grx1, altos niveles de la versión mutada C104S no alteran la capacidad de respuesta de la forma infectiva del parásito frente a estímulos oxidantes y de depleción de hierro. Las posibles razones de esto se discuten sobre el final.

### **6.8. Localización subcelular de 1-C-Grx2 y fenotipo de líneas BSF y PCF sobreexpresantes.**

Antes de centrarnos en el análisis de los resultados de las líneas sobreexpresantes de las versiones de 1-C-Grx1 consideramos importante confirmar que en la mitocondria de la BSF coexisten dos Grx de clase II. Para ello debíamos confirmar la compartimentalización subcelular de la 1-C-Grx2 y, adicionalmente, determinar si la sobreexpresión de esta proteína se asociaba a algún fenotipo adverso para el crecimiento de parásitos cultivados *in vitro*. Tal como se mencionó en el Capítulo 3 la 1-C-Grx2 presenta una extensión aminoterminal predicha como secuencia de localización mitocondrial la cual fue procesada eficientemente por la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales de levadura, permitiendo que esta proteína localice en la matriz mitocondrial de *S. cerevisiae* (Filser et al., 2008). La detección de la forma endógena de la proteína mediante inmunofluorescencia con anticuerpos  $\alpha$ -1-C-Grx2 fue infructuosa (no mostrado), seguramente debido a que los niveles de la 1-C-Grx2 tanto en la forma sanguínea como procíclica de *T. brucei* son muy bajos (Comini et al., 2008). Por lo tanto los experimentos de localización subcelular fueron realizados sobre las líneas celulares sobreexpresantes de una versión ectópica de 1-C-Grx2 etiquetada con *c-myc* (ver sección Materiales y Métodos) empleando tanto anticuerpos  $\alpha$ -1-C-Grx2 como  $\alpha$ -*c-myc*. Como se observa en la Figura 6.6A, en ambos estadios se identificó señal específica para 1-C-Grx2 proveniente de la mitocondria de los parásitos, la cual se puso en evidencia mediante marcado con Mitotracker™ o bien usando anticuerpos -lipoamida deshidrogenasa (Roldán et al., 2011).. El análisis del patrón de crecimiento de células PCF y BSF portadoras de una copia ectópica de 1-C-Grx2 se realizó en cultivo tipo "batch", análogo a lo descrito más arriba, trabajando con tres clones independientes cultivados en presencia o ausencia de tetraciclina y analizando la expresión por WB. La curva de crecimiento exhibida por parásitos PCF fue similar en todos los clones sean estos cultivados o no con inductor (no mostrado), mientras que en el caso de las líneas BSF, si bien el perfil de crecimiento global de los clones es similar independientemente de la inducción obteniéndose para la fase exponencial de crecimiento (días 2 y 3) un tiempo de duplicación promedio similar para los clones inducidos y no inducidos respectivamente y, a su vez, similar a al tiempo de duplicación de la lineal parental (Figura 6.6.B). Sin embargo una inspección más cuidadosa de la curva revela dos diferencias llamativas entre clones que sobreexpresan la 1-C-Grx2 y aquellos que no y estas

diferencias son un retardo en la extensión de la fase *lag* y la fase estacionaria para la mayoría de los clones inducidos. No obstante, ese retardo en superar la fase *lag* es transitorio y no acarrea consecuencias en la capacidad proliferativa de las células durante la fase de crecimiento exponencial. En cambio, el retardo en la fase estacionaria provoca que a las 120 hs de cultivo ininterrumpido aún se detecte un buen número de parásitos viables en los tres clones inducidos, mientras que la viabilidad cayó a cero en dos de los clones no inducidos y en el tercero la densidad celular se halla al límite de detección por el método de recuento en cámara de Neubauer (Figura 6.6.B). Por lo tanto, a diferencia de la 1-C-Grx1 (en todas sus versiones), la sobreexpresión de la 1-C-Grx2 en la mitocondria de parásitos infectivos pareciera tener un efecto positivo en la supervivencia de los mismos en condiciones de cultivo de agotamiento de nutrientes. Aunque aún estamos lejos de comprender las causas de este fenómeno, es relevante mencionar que estudios recientes de RNAi en formato “*high-throughput*” señalaron que la 1-C-Grx2 sería indispensable para el proceso de diferenciación de la forma BSF a la PCF (Alsford et al., 2011).

## 6.9. Integración de la información biológica obtenida para *Tb1-C-Grx1*

Evidentemente, los resultados mostrados en este capítulo señalan un rol indiscutible de *Tb1-C-Grx1* en el progreso de la infección, al menos en este hospedero mamífero y en infecciones con cepas monomórficas. El marcado fenotipo observado *in vivo* no se evidencia en las líneas celulares en cultivo, lo cual sugiere que 1-C-Grx1 es esencial para enfrentar las condiciones hostiles impuestas por el hospedero. Ahora bien, las bases moleculares de este fenotipo pueden ser muy diversas, desde efectos puntuales en una vía biosintética afectada hasta efectos pleiotrópicos y multifactoriales. En esta sección intentaremos abordar algunas posibles explicaciones. La evidencia acumulada hasta ahora indica que: *i)* *Tb1-C-Grx1* es parcialmente capaz de revertir el fenotipo del mutante  $\Delta$  *grx5* (Filser et al., 2008), *ii)* la línea sobreexpresante de 1-C-Grx1 presenta indicio de desregulación del metabolismo del hierro (Comini et al., 2008), *iii)* esta proteína es capaz de coordinar centros ferrosulfurados *in vitro* a expensas de la cisteína del sitio activo y tioles de bajo peso molecular (este trabajo), *iv)* las líneas transgénicas *TbGrx1* y *TbC104S* poseen una menor capacidad proliferativa *in vivo* (este trabajo) y *v)* *Tb1-C-Grx1* interacciona *in vivo* con algunas chaperonas de la familia de las HSP70 como las involucradas en la biogénesis de centros ferrosulfurados en otros eucariotas (experimentos de inmunoprecipitación, no mostrado). Estos datos, considerados en su conjunto, nos permiten especular que *Tb1-C-Grx1* cumple un rol en la maquinaria de biogénesis de centros ferrosulfurados en la mitocondria de *T. brucei* equivalente (total o parcialmente) al que cumple la *Grx5* de levaduras o humanos (Lill et al., 2012). Si bien esto requiere ser probado de manera definitiva, parece una hipótesis razonable y nos ofrece un marco sólido para interpretar nuestros resultados.

El rol esencial de *Grx5* en la biogénesis de centros ferrosulfurados en la mitocondria eucariota fue demostrado hace una década (Rodríguez-Manzaneque et al., 2002), si bien recién en el último año se logró una definición precisa de su mecanismo. A diferencia de lo considerado originalmente (Bandyopadhyay et al., 2008; Mühlenhoff et al., 2003), *Grx5* no es una proteína “scaffold” independiente sino que cumple su función en el contexto de un complejo con al menos otras dos proteínas (chaperonas, ver Figura final) (Uzarska et al., 2013). En este sentido, es lógico esperar que tanto la sobreexpresión de la forma silvestre de la proteína (línea *TbGrx1*) como de la forma mutante (línea

TbC104S) determine un efecto en la biogénesis de centros ferrosulfurados. En el primer caso (línea TbGrx1), el incremento en la abundancia de Tb1-C-Grx1 dentro de la mitocondria del parásito puede determinar un cambio en la relación estequiométrica entre la Grx y las chaperonas, “secuestrando” a las mismas en complejos que, si bien pueden ser productivos para la biogénesis de centros ferrosulfurados, no necesariamente lo serán para otras funciones donde estas chaperonas pueden operar. En el segundo caso, los resultados son concluyentes en cuanto a que la expresión de un mutante de 1-C-Grx1 carente de la cisteína de sitio activo e incapaz de unir FeS afecta negativa y significativamente la proliferación y supervivencia de *T. brucei* en un hospedero mamífero. Si seguimos con la línea de pensamiento de la frase anterior, la sobreexpresión del mutante C104S determinará un efecto más marcado ya que poblará la mitocondria del parásito de complejos entre la chaperona y la Grx mutante improductivos para la biogénesis de FeS. La inhibición del paso de transferencia corriente arriba llevaría a la acumulación del cofactor en la proteína de andamiaje tipo U (IscU, (Smíd et al., 2006)) y, probablemente, a una deficiencia en la formación de holo-proteínas, como se reportó para el mutante  $\Delta grx5$  en *S. cerevisiae* (Mühlenhoff et al., 2003). Este efecto podría determinar una adaptación metabólica secundaria, como sucede en levaduras, donde la interrupción de esta vía determina la activación de mecanismos compensatorios tendientes a incrementar la incorporación y movilización de hierro y/o la producción del cofactor (Kaplan and Kaplan, 2005), si bien por el momento en tripanosomas no se ha demostrado una conexión entre la maquinaria mitocondrial de biogénesis de centros ferrosulfurados y mecanismos de captación o movilización de hierro ni regulación transcripcional de la misma (Manta et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010).

A su vez, esta propuesta permite explicar (al menos parcialmente) los resultados obtenidos para la línea TbC104S inducida (Figura 6.5) y expuesta a  $H_2O_2$  y DFX, donde observamos un comportamiento diferente a lo reportado previamente por Comini y colaboradores (Comini et al., 2008) para la línea TbGrx1. En los resultados mostrados en este trabajo, la sobreexpresión del mutante C104S no sensibiliza a los parásitos contra la depleción de hierro y/o tratamientos que determinan estrés oxidativo. La DFX tiene un efecto citoestático asociado que generalmente se puede explicar por la depleción de hierro del cultivo, el cual es provisto por la transferrina presente en el suero bovino (Breidbach et al., 2002). La ausencia de efecto mayor de la DFX en la forma inducida de TbC104S respecto de la no inducida puede explicarse porque, al estar interrumpida la biogénesis de centros ferrosulfurados en un paso previo a su transporte hacia blancos terminales, las necesidades de hierro del parásito se reducen al mínimo, cosa que no sucede en la línea transgénica TbGrx1 donde –probablemente– la maquinaria de biogénesis de FeS no está interrumpida. En la misma línea, el efecto tóxico del  $H_2O_2$  observado por Comini y colaboradores en la línea TbGrx1 inducida podría explicarse a expensas de la gran disponibilidad de centros ferrosulfurados lábiles y acumulados sobre la copia ectópica de 1-C-Grx1 WT, mientras que en la línea TbC104S no se llega a este paso y el hierro se acumula en etapas previas o en reservorios más protegidos de la acción de oxidantes, como sucede en otros eucariotas (Subramanian et al., 2011).

En los organismos eucariotas en los cuales la biogénesis de centros ferrosulfurados está relativamente bien definida, como ser levaduras (Kim et al., 2011, 2011; Lill et al., 2012; Mühlenhoff et al., 2010) o humanos (Ye and Rouault, 2010), también se conocen varios procesos metabólicos esenciales dependientes de FeS. Si bien el hierro también es esencial para la forma infectiva de *T. brucei* (Steverding, 1998) las proteínas dependientes de este metal o de centros ferrosulfurados presentes en la forma infectiva del parásito son asombrosamente pocas (revisado recientemente en (Manta et al., 2012)),

siendo la TAO la mejor caracterizada (Chaudhuri et al., 2006). Sin embargo, algunas de las proteínas portadoras de clúster de hierro y azufre son esenciales y la alteración de la biogénesis de centros ferrosulfurados por sobreexpresión de versiones silvestres o mutadas de 1-C-Grx1 puede determinar efectos específicos deletéreos, si bien esto requiere ser ensayado específicamente. Uno de los casos que merece ser destacado por su posible rol en el desarrollo del parásito *in vivo* es el de la proteína RIL/ABCE1, una proteína homóloga al inhibidor de la ribonucleasa L que posee un motivo aminoterminal que une un clúster de [4Fe-4S] y dos dominios de unión de ATP ("ATP binding cassette", ABC-E1) la cual cumple un rol esencial en la regulación de la síntesis proteica en todos los eucariotas (Nürenberg and Tampé, 2013) y que es esencial para ambas formas de *T. brucei* (Estévez et al., 2004). Inesperadamente tanto la supresión como la sobreexpresión de esta proteína también rindió un fenotipo deletéreo en la forma infectiva del parásito llevando a los autores a aducir que esto podría ser consecuencia de una desregulación en la síntesis de determinadas proteínas estadio-específicas controlada por RLI/ABCE1 (Estévez et al., 2004). Por lo tanto, podemos especular alternativamente que la sobreexpresión de 1-C-Grx1 determine un incremento en la síntesis de holo-RIL/ABCE1 aportando también al fenotipo deletéreo de esta línea transgénica. Otro proceso metabólico esencial en *T. brucei* que depende de la biogénesis de centros ferrosulfurados es la tiolación de RNA de transferencia, lo cuales son importados hacia la mitocondria concomitantemente con un proceso de modificación de base que depende de las etapas iniciales de la maquinaria ISC presentes en la mitocondria (Alfonzo and Lukeš, 2011; Paris et al., 2010).

También es posible que la exacerbación del fenotipo *in vivo* respecto al observado *in vitro* sea producto de las condiciones más hostiles que debe afrontar el parásito en el mamífero las cuales dependen de factores difíciles de reproducir en condiciones *in vitro* (Manta et al., 2013<sup>a</sup>; Comini et al., 2012) ya que involucra ambas ramas del sistema inmune (Vincendeau and Bouteille, 2006). Una de las respuestas del hospedero mejor caracterizadas frente a una infección parasítica es la limitación del hierro disponible en el torrente sanguíneo (Manta et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010), lo cual podría aportar al agravamiento del fenotipo infectivo de la línea transgénica TbGrx1 inducida (+T). Es interesante destacar que la evolución de la infección del grupo TbC104S+T se parece mucho a la que tiene lugar en la naturaleza donde no todos los animales se infectan o la infección no progresa en todos, transcurre con ondas de parasitemia controladas y una evolución con características pseudo-crónicas en la medida que el estado general de salud del paciente o animal infectado pueda sostenerlo. Finalmente, no descartamos tampoco que este fenotipo derive de un efecto "off-target" de la sobreexpresión de 1-C-Grx1 que desemboque en interacciones no deseadas de esta proteína con otros componentes de la mitocondria que termine afectando algún proceso o función importante.

Un último punto que merece ser destacado es que, a diferencia de otros eucariotas, en *T. brucei* (y probablemente otros tripanosomátidos) 1-C-Grx2 comparte la localización subcelular con 1-C-Grx1, lo que determina que en la mitocondria de este organismo coexistan dos Grx monotiólicas que no parecen tener funciones intercambiables ya que la primera no subroga la función de la segunda en este organelo. Esta falta de redundancia funcional no excluye que ambas proteínas puedan ser parte de la maquinaria biosintética de FeS, es decir que puedan interactuar con los mismos componentes de esta vía metabólica, por el contrario, y dado que ambas estarían involucradas en la última etapa de la biosíntesis de centros ferrosulfurados (por analogía funcional con 1-C-Grx de otras especies), la diferencia entre ambas podría radicar en la especificidad que presente cada una de ellas por las apo-proteínas a las cuales

les deben transferir el cofactor. Si bien debe existir un *pool* básico y esencial de proteínas con centros ferrosulfurados común a ambos estadios, también es evidente, por lo que se comentó en repetidas oportunidades, que cada una de las formas del ciclo de vida del parásito tiene distintos requerimientos metabólicos. En ese sentido, las distintas isoformas mitocondriales de 1-C-Grx podrían estar implicadas en la biosíntesis de determinados conjuntos de proteínas ferrosulfuradas específicas para cada estadio. Por ejemplo, la 1-C-Grx2, cuya expresión fue más abundante en la forma que habita el insecto (Comini et al., 2008) y cuyo silenciamiento por ARNi produjo un fenotipo anormal únicamente en parásitos en proceso de diferenciación a la forma procíclica (Alsford et al., 2011) califica como la isoforma encargada de participar en la síntesis de proteínas con centros ferrosulfurados que son parte integral del ciclo de Krebs y citocromos en la preparación adaptativa que lleva de la forma LS a la forma SS (Manta et al., 2012).

## **Capítulo 7**

### **Conclusión general**

Los procesos redox en tripanosomas están gobernados por el par TXN/T(SH)<sub>2</sub> que ocupa un rol central en el transporte de electrones hacia blancos celulares. A su vez, el T(SH)<sub>2</sub> puede cumplir funciones no asociadas a TXN que amplifican su relevancia fisiológica (Manta et al., 2013a, 2013b). Sin embargo, el interior de la mitocondria de los tripanosomas es una “isla redox” en la cual no se ha reportado la existencia de T(SH)<sub>2</sub> ni de las oxidoreductasas clásicas como Trx o TXN (Manta et al., 2013b). Sin embargo, en este organelo coexisten dos Grx estrechamente relacionadas, una de las cuales ha sido el foco principal de este trabajo, así como rutas biosintéticas claves para todos los organismos como ser la biogénesis de centros ferrosulfurados, en donde las Grx ofician de punto de encuentro entre el metabolismo redox y el metabolismo del hierro. En este trabajo abordamos aspectos evolutivos, bioquímicos, estructurales y funcionales de Tb1-C-Grx1 que podemos resumir en los siguientes puntos:

- i. Tb1-C-Grx1 es parte de una familia de proteínas relacionadas pobremente caracterizada y más compleja de lo considerado originalmente, integrada por miembros conservados a lo largo de toda la escala evolutiva y otros que parecen estar restringidos a kinetoplástidos.
- ii. Esta familia posee dos Grx monotiólicas de localización mitocondrial, probablemente relacionadas a nivel evolutivo y con funciones no intercambiables, una de las cuales es indispensable para la forma sanguínea del parásito.
- iii. Tb1-C-Grx1 presenta elementos de secuencia que indican que esta proteína es una adaptación evolutiva exclusiva de kinetoplástidos, si bien algunas Grx de organismos fotosintéticos podrían ser secuencias ortólogas.
- iv. Tb1-C-Grx1 es capaz de coordinar in vitro centros ferrosulfurados a expensas de GSH, Gsp o T(SH)<sub>2</sub> siendo probable que la combinación de elementos de estructura ausentes en otras Grx (*i.e.* región NTE) y el uso de tioles específicos del parásito determinen un mecanismo de coordinación con variaciones respecto de los caracterizados para otras Grx monotiólicas.
- v. Si bien es probable que esta proteína no posea actividad redox, no podemos descartar que existan oxidorreductasas mitocondriales aún no identificadas que sustenten mecanismos redox basados en monotioles como GSH o Gsp, ya que los mismos son capaces de afectar el estado redox de Tb1-C-Grx1.
- vi. El análisis de secuencia y estructura de Tb1-C-Grx1 indica que esta proteína posee similitudes y diferencias con otras estructuras de Grx. Entre las similitudes identificamos un elemento de estructura compartido con todas las Grx de clase II que podría explicar la ausencia de actividad redox en estas proteínas.
- vii. Finalmente, si bien no pudimos probar un rol específico de esta proteína en el desarrollo de células de *T. brucei* en condiciones de cultivos, resultó evidente que el mismo es determinante para el progreso de la infección en modelos animales.

En función de nuestros resultados y la información en la literatura y presentada en los capítulos anteriores elaboramos un modelo básico sobre el metabolismo del hierro y de centros ferrosulfurados en la forma sanguínea de *T. brucei*, ubicando a Tb1-C-Grx1 como un componente clave de las etapas iniciales de la biogénesis mitocondrial de centros ferrosulfurados (Figura 7.1).

“Sin Goliat, David es solo un vago tirando piedras”

Billy Crystal, actor y comediante estadounidense

## **Capítulo 8**

### **Materiales y Métodos**

## 8.1. Reactivos y fungibles

Los reactivos de biología molecular (ADN polimerasas, enzimas de restricción, fosfatasa, ligasa y amortiguadores correspondientes) fueron adquiridos en Fermentas<sup>83</sup>, Invitrogen, NewEngland Biolabs, Promega o Roche (Alemania). Los oligonucleótidos cebadores fueron adquiridos en Eurofins (Alemania), MWG Biotech (Alemania) o IDT (EUA) (detallados en Tabla S1) mientras que los kits para purificación de ADN a partir de reacciones de PCR, geles de agarosa o cultivos de bacterias fueron obtenidos en Machenery-Nagel (Alemania), Promega, Sigma-Aldrich, Invitrogen o VivoScience (Uruguay). Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Applichem (Alemania), Invitrogen o Sigma-Aldrich (en orden alfabético): ácido acético (HAc), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido iodoacético (IAA), ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido tricloroacético (TCA), albúmina sérica bovina (BSA), aprotinina A, 2,2-bipiridina (Byp), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal), cistatina, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), cloruro de sodio (NaCl), cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>), 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy), ditioneitol (DTT), *N*-etilmaleimida (NEM), extracto de levadura, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), glutatión (GSH), glutatión disulfuro (GSSG), monoglutationilpermidina (Gsp), iodoacetamida (IAM), isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG), lisozima de clara de huevo (liofilizada), β-mercaptoetanol (βME), monobromobimano (mBBR), pepstatina A, piridoxal-5'-fosfato (PLP), sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), *N*-α-tosil-L-lisina clorometilcetone (TLCK), triptona, triptosa, Tritón X-100®, sorbitan monolaurato de polioxi-etileno (Tween-20®). Todas las sales y demás reactivos de uso general fueron adquiridos de grado analítico en las empresas mencionadas, con la excepción de algunos líquidos o solventes para usos no analíticos. El tripanotión reducido (T(SH)<sub>2</sub>) se produjo a partir de espermidina (Fluka, Alemania) y GSH por Natalie Dirdjaja (Laboratorio de la Dra. R. L. Krauth-Siegel, Centro de Bioquímica, Universidad de Heidelberg) acorde a lo descrito en (Comini et al., 2009) y se almacenó a -20°C a una concentración de 60-80 mM disuelto 35 mM HAc. El gas argón (Ar >99.99% puro) fue adquirido en AGA (Uruguay), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % en J.T. Baker (EUA) y el alquilante de tioles de alto peso molecular maleimida pegilada de 5 kDa (M-PEG-5000) en Iris Biotech (Alemania). El bromuro de etidio (BrEt) fue adquirido en Eurobio (Francia). La D-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucosa (99% <sup>13</sup>C) y el cloruro de <sup>15</sup>N-amonio (98% <sup>15</sup>N) fueron adquiridos en Cortecnet (Francia). Los antibióticos cloranfenicol, ampicilina, kanamicina, gentamicina, higromicina B, fleomicina y tetraciclina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Invitrogen, en diferentes presentaciones. La oxitetraciclina (oxitet), por su parte, fue adquirida de marcas disponibles en el mercado local para uso veterinario (ej. Oximic Plus, Laboratorio Microsules, Uruguay) y preparada por suspensión en agua filtrada en condiciones estériles y almacenada a -20°C protegida de la luz. Se

---

<sup>83</sup> Las empresas proveedoras de los diferentes reactivos han ido cambiando durante el curso de este trabajo y muchas compañías pequeñas han sido absorbidas por otras. En consecuencia, el país de fabricación/procedencia de los productos puede variar, si bien el país de referencia de la compañía no. Para simplificar este documento los reactivos se presentan bajo el nombre de la compañía al momento de ser adquiridos, siga esta existiendo en la actualidad o no, no se indica país para las grandes compañías como Sigma-Aldrich o General Electric y los detalles técnicos sobre ciertos productos o equipos se especifican solo cuando hacen al protocolo experimental.

tomaron precauciones para que la masa de compuesto activo por mL de agua fuera constante en las preparaciones. El mesilato de deferoxamina (DFX, Sigma-Aldrich) se preparó a 100 mM por disolución en agua, se filtró en condiciones estériles y se almacenó a -20°C. La deferoxamina usada para los experimentos en animales fue adquirida como ampollas de Desferal® para uso médico (Novartis, Uruguay). El medio de cultivo “Iscove’s Modified Dubelco Modified” (IMDM) fue adquirido en Invitrogen, Gibco (EUA) o Sigma-Aldrich. Los compuestos hipoxantina, cisteína, timidina, bactocuproína, penicilina, y estreptomicina usados para suplementar el medio IMDM fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, mientras que el suero fetal bovino (FBS) no reactivo para tetraciclina y el suero de caballo se adquirieron en PAA (EUA). El suero de ratón fue obtenido a partir de sangre de animales sanos en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Institut Pasteur de Montevideo (IPM). Todas las columnas, resinas y camisas usadas en la purificación de proteínas recombinantes fueron adquiridas en General Electric Healthcare Lifesciences (GE). El péptido conteniendo los residuos 49 a 76 de la región aminoterminal de Tb1-C-Grx1 fue producido en un sintetizador automático de péptidos a partir de aminoácidos protegidos con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonil y obtenido con los extremos amino y carboxilterminal modificados por grupos acetilo y amida, respectivamente (Ac-GDVRDIEETHPDFQPRLVSADLAEDEIA-Am,  $MW_{teórico} = 3177.52$  Da). El péptido fue purificado por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en columnas de fase reversa C18 preparativa según se detalla en (Pavan, 2012).

## **8.2. Generación de construcciones para expresión de proteínas recombinantes**

### **8.2.1. Aspectos generales de la generación de construcciones para la expresión de proteínas recombinantes**

La amplificación de las diferentes secuencias de interés se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando, generalmente, 50 ng de ADN como molde, 2  $\mu$ M de los cebadores específicos (Tabla S1) y 0.2  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Si bien se utilizaron diferentes polimerasas dependiendo del destino del producto de PCR o el largo del mismo, las más usadas fueron la polimerasa *Platinum Taq* (Invitrogen, usada a 1 U cada 10  $\mu$ L de reacción), la *Phusion Taq* (Finnzymes, Finlandia, 1 U cada 25  $\mu$ L de reacción) y la *Pwo DNA Polimerase* (Roche, 0.6 U cada 10  $\mu$ L de reacción). Los *amplicones* se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1-1.5% en amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) pH ~8.3 0.5 X y las bandas resultantes se revelaron por tinción con BrEt y visualización en cámara G-Box (Syngene, EUA). Los amplicones fueron purificados desde los geles o directamente desde la reacción de PCR utilizando kits comerciales. Tanto los amplicones como los vectores fueron cuantificados espectrofotométricamente en Nanodrop (Thermo-Fisher). Los productos de PCR obtenidos con adeninas libres en los extremos 3' fueron ligados en vectores “T” comerciales (pGEM-T easy, Promega; o pCR2.1-TOPO, Invitrogen) incubando 50 ng de vector con 250 ng del producto de PCR

y, generalmente, 1 U de T4 ADN ligasa (Roche) por cada 10 uL de reacción durante toda la noche (ON, ~16 hr) a temperatura ambiente (TA) en el amortiguador provisto con el kit. La ligación fue transformada por shock térmico en células *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5 $\alpha$  (Invitrogen) incubando 100  $\mu$ L de bacterias con 5  $\mu$ L de reacción de ligación durante 30 min en hielo, luego 45 segundos a 42°C y luego 2 min más en hielo, antes de agregar 500  $\mu$ L de medio de cultivo "SOC" (Invitrogen) o 1000  $\mu$ L de medio de cultivo "LB" (detallado como 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl, ajustado a pH 7,4 con NaOH) y termostaticado a 37°C. Las células transformadas fueron incubadas 1 hr a 37°C con agitación, posteriormente plaqueadas en LB-agar suplementado con 100  $\mu$ g/mL ampicilina y 40  $\mu$ g/mL X-Gal e incubadas ON a 37 °C. En las etapas de clonado, 3-10 colonias seleccionadas por  $\alpha$ -complementación (colonias blancas) fueron crecidas ON en medio LB a 37°C y agitación orbital a 220 rpm para la producción de ADN plasmídico ("miniprep") y su posterior análisis por restricción usando la enzima *EcoRI* (Invitrogen, 0,5-1 U por cada 10 uL de reacción, incubadas 3-5 hr a TA), que flanquea el sitio de clonado múltiple (MCS) en los vectores "T" mencionados. Los plásmidos confirmados como positivos por restricción fueron secuenciados usando cebadores genéricos en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del IPM o en Macrogen (Corea del Sur). El subclonado de los genes de interés en vectores de expresión para células procariontas o eucariotas se realizó a partir de los vectores confirmados como positivos (por restricción y/o secuenciación) usando los sitios de restricción específicos introducidos en los cebadores usados para el clonado. Brevemente, 50-100  $\mu$ g del vector portando el gen de interés se digieren con las endonucleasas adecuadas y el inserto liberado se purifica de la mezcla de reacción o a partir de geles de agarosa mediante el uso de kits. El inserto digerido se subclona en los vectores de expresión cortados con las mismas enzimas usando el protocolo de ligación y transformación comentado anteriormente, con la excepción de que las bacterias transformadas se plaquean en placas de LB-Agar conteniendo el antibiótico necesario para mantener la construcción (ver más adelante). En estos casos se incluye un control de religación, donde el vector "receptor" digerido es incubado en idénticas condiciones pero sin amplicón. La selección de las colonias portadoras del vector correctamente integrado se realiza por dos aproximaciones. Para analizar pocas colonias (3-5) las mismas se crecen ON en 5 mL de medio LB a 37°C con agitación orbital a 220 rpm, cosechan y el ADN plasmídico obtenido por miniprep se analiza por digestión enzimática y visualización en geles de agarosa. Para analizar 10 o más colonias se realiza, en una primera instancia, una selección mediante "PCR de colonia" usando los cebadores específicos del clonado y analizando del producto por geles de agarosa. En todos los casos, los vectores confirmados por digestión y/o PCR fueron secuenciados en ambas direcciones con los cebadores específicos.

### **8.2.2. Clonado de *Trypanosoma brucei* 1-C-Grx1 y generación de vectores de expresión**

La amplificación y clonado de *Tb1-C-Grx1* se detalla en (Filser et al., 2008). La secuencia completa del gen fue obtenida por amplificación a partir de ADN copia (línea celular 449) usando cebadores genéricos para las regiones 3'-UTR y 5'-UTR combinados con cebadores específicos internos (Filser et al., 2008). La

secuencia de *Tb1-C-Grx1* fue posteriormente amplificada a partir de ADN genómico (cepa 427) con cebadores específicos para su inserción en vectores de expresión para procariotas o eucariotas. La secuencia completa (M1-L184), incluyendo el péptido de señalización mitocondrial (MTS) fue amplificada con los cebadores A y B mientras que la región codificante de la proteína madura (residuos Q42-L184, *Tb1-C-Grx1* de largo completo o "FL") fue amplificada con los cebadores C y B. Los cebadores A y C introducen un sitio de restricción para *BamHI* en el extremo 5' mientras que el cebador B introduce un sitio de restricción para *HindIII* en 3'. Comini y colaboradores (Comini et al., 2008) generaron el vector de expresión en *T. brucei* pHD1700-*Tb1-C-Grx1-c-myc<sub>2</sub>* al subclonar la secuencia completa (+MTS) en el vector pHD1700 (cedido por la Dra. C. Clayton, Centro de Biología Molecular (ZMBH), Universidad de Heidelberg) previamente digerido con las enzimas *BamHI* y *HindIII*. A partir de este vector en este trabajo se generaron los mutantes puntuales de cisteína por serina en las posiciones 104 y 181 utilizando el kit comercial "Quik Change Site Directed Mutagenesis" (Stratagene). Para ello, el vector pHD1700-*Tb1-C-Grx1-c-myc<sub>2</sub>* fue usado como templado y los oligonucleótidos D/E (para el mutante C104S (Manta et al., 2013a)) y F/G (para el mutante C181S, (Rettig, 2007)) como cebadores internos (Tabla S1). La reacción de extensión de cebadores se realizó con la polimerasa *Pfu* y la posterior digestión del vector parental mediante la nucleasa *DpnI* (Invitrogen), según instrucciones del fabricante. La presencia del inserto en las construcciones fue confirmada por digestión con las enzimas *KpnI/NcoI* y al menos 2 de los vectores positivos fueron secuenciados en ambas direcciones. A partir del amplicón sin MTS (Filser et al., 2008) se generó el vector de expresión para procariotas al insertar la región codificante flanqueada por sitios *HindIII* y *BamHI* en el vector pQE30 (Quiagen) digerido con estas enzimas, generando así la construcción pQE30-*Tb1-C-Grx1FL* que permite la expresión inducible de la proteína madura con "cola de histidinas" como etiqueta de afinidad. Los mutantes puntuales C104S y C181S se realizaron sobre el vector pQE30-*Tb1-C-Grx1FL* según se describe en Sardi y colaboradores (Sardi et al., 2013) con el kit de mutagénesis indicado más arriba usando los oligonucleótidos H/I y J/K, respectivamente. Para la expresión de la proteína sin etiqueta de afinidad, la forma madura (FL) de *Tb1-C-Grx1* así como una versión truncada de la proteína (residuos M77-L184, denominada  $\Delta 76$ , ver a continuación) fueron amplificadas por PCR a partir del vector original (Filser et al., 2008) usando los oligonucleótidos L (cebador directo para FL) o M (cebador directo para  $\Delta 76$ ) en combinación con el cebador N (reverso para ambos), los cuales introducen sitios para las enzimas de restricción *NcoI* en 5' (L y M) y *KpnI* en 3' (N) (Manta et al., 2013a). Los productos de PCR digeridos con *NcoI* y *KpnI* y purificados fueron ligados al vector de expresión pET-trx1b, derivado de pETM20, desarrollado por el Dr. Günther Stier (EMBL-Heidelberg, Alemania) previamente tratado con las mismas enzimas generando así los vectores de expresión pET-trx1b-*Tb1-C-Grx1FL* y pET-trx1b-*Tb1-C-Grx1* $\Delta 76$  (Manta et al., 2013a). Sobre ambas versiones (FL y  $\Delta 76$ ) se realizaron las siguientes mutaciones: C104S, C181S y C104/181S. El mutante C181S se generó por PCR usando el vector pET-trx1b-*Tb1-C-Grx1FL* como molde y los cebadores L (para FL) y M ( $\Delta 76$ ) a ambos con sitios *NcoI* en 5', en combinación con el cebador O (sitio *KpnI* en 3') que incluye la mutación C181 aprovechando el hecho de que el residuo a mutar está muy próximo al extremo C-terminal de la proteína. El mutante C104S se generó por PCR usando el vector pET-trx1b-*Tb1-C-Grx1FL* como molde y los mismos cebadores directos

(L para FL y M para  $\Delta 76$ ), en combinación con el cebador reverso P, que incluye la mutación en Cys104 y un sitio de corte para *KpnI*. Estas PCR producen amplicones denominados “*megaprimer FLC104S*” o “*megaprimer  $\Delta 76C104S$* ”, los cuales fueron purificados de la reacción de PCR y empleados como cebadores en una segunda reacción de PCR, usando como templado el vector pET-trx1b-*Tb1-C-Grx1FL* y el cebador reverso N (para producir las versiones FL y  $\Delta 76$  C104S) u O (para producir las versiones FL y  $\Delta 76$  C104/181S).

### **8.2.3. Clonado de *Trypanosoma cruzi* 1-C-Grx1 y generación de vectores de expresión**

El marco abierto de lectura correspondiente al gen de *Tc1-C-Grx1* fue amplificado a partir de ADN genómico de la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* (cedido gentilmente por el Dr. S. Guerrero, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina) utilizando los cebadores Q y R que poseen sitios de restricción para *NcoI* (5') y *KpnI* (3'), respectivamente, según se detalla en (Fleitas, 2012). El diseño de los cebadores se realizó en base a la secuencia putativa de la proteína de interés identificada en el genoma de *T. cruzi* cepa CL Brener (*locus* 508216, XM\_802744, (El-Sayed et al., 2005)) por homología de secuencia con la ortóloga en *T. brucei* (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008) incluyendo todo el marco de lectura (residuos 1-188). La secuencia de la proteína madura (FL, sin MTS) fue obtenida por PCR usando los oligonucleótidos S (sitio *NcoI* en 5') y R (sitio *KpnI* en 3') diseñados de manera tal de remover la secuencia predicha como MTS. Los amplicones fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y secuenciados en ambas direcciones. Debido a la existencia de un sitio endógeno para *NcoI* en la posición donde comienza el dominio Grx, la digestión los vectores con las enzimas *NcoI* y *KpnI* libera un inserto equivalente a la versión trunca ( $\Delta 76$ ) de *Tc1-C-Grx1*, el cual fue subclonado en el vector pET-trx1b digerido con *NcoI* y *KpnI*, como se indicó anteriormente. Para la generación del vector de expresión de la proteína FL fue necesaria la remoción de este sitio interno de *NcoI*. Para ello, en una primera instancia se realizó un PCR utilizando los cebadores T (cebador directo que muta el sitio *NcoI*) y R (cebador reverso) y el amplicon fue purificado y usado como cebador reverso para una segunda reacción de PCR junto al cebador S. La mutación de la cisteína del sitio activo por serina (C105S) se realizó análogamente al mutante C104S en *Tb1-C-Grx1* comentada más arriba, utilizando los cebadores S (directo para versión FL) y U (reverso para versión C105S) para la generación del “*megaprimer*” con la mutación C105S, el cual fue purificado y posteriormente usado para la generación de la versión mutante en una nueva reacción de PCR.

### **8.2.4. Vectores de expresión para *Trypanosoma brucei* 1-C-Grx2**

La región codificante del gen *Tb1-C-Grx2* fue amplificada análogamente a lo descrito para *Tb1-C-Grx1*, tanto con (+) o sin (-) MTS (Filser et al., 2008). Posteriormente, ambas secuencias fueron subclonada en el vector pQE30 o en el vector pET43.1b+ (Novagen), como se detalla en (Comini et al., 2008).. El vector para la expresión ectópica de 1-C-Grx2 en *T. brucei* fue desarrollado por M. Comini y N. Dirdjaja (no publicado)

a partir de la construcción pCR2.1-*Tb1-C-Grx2*+MTS amplificando la secuencia completa con los cebadores V y W (Tabla S1, sitios de corte para *Bam*HI) y subclonándola en el vector pHD1700 para generar el vector pHD1700-*Tb1-C-Grx2-c-myc*<sub>2</sub>.

### **8.3. Expresión de proteínas recombinantes**

#### **8.3.1. Aspectos generales de la expresión de proteínas recombinantes**

Para la expresión de proteínas recombinantes se usaron las cepas de *E. coli* BL21(DE3), Novablue o Rosetta(DE3)pLysS. En todos los casos las líneas celulares originales fueron usadas para generar células quimio o electrocompetentes y transformadas por shock térmico (30-90 segundos a 42°C) o electroporación en cubetas de 1 mm (Sigma-Aldrich) mediante la aplicación de un pulso de 500 V y 8 ms de duración en electroporador (BTX, EUA), respectivamente. Las células transformadas fueron seleccionadas mediante plaqueo en presencia del antibiótico apropiado y la/s colonia/s seleccionadas se usaron para generar crioinóculos en medio de cultivo con 15% de glicerol, los cuales se almacenaron a -80°C. Estos crioinóculos fueron utilizados como cultivos madre para la expresión de proteínas cuando fuera necesario, la cual se realizó siempre en incubadoras con control de temperatura y agitación orbital regulable (Infors HT, Suiza) pertenecientes a la Unidad de Producción de Proteínas Recombinantes (UPR). La resina usada para el primer paso de purificación fue, generalmente, una resina con Ni<sup>2+</sup> inmovilizado (IMAC, de "immobilized-metal affinity chromatography") obtenida en GE, ya sea en su forma preempacada (HisTrap® de 1 y 5 mL) o empacadas manualmente en columnas XK 16/20 o HR 5/5 (GE) de volumen variable. Estas cromatografías se realizaron a TA usando una bomba peristáltica tricanal "Tris" (Teledyne Isco, EUA). En los casos en que se utilizaron otras cromatografías, las mismas se realizaron a TA o 4°C, según se indique, en cromatógrafos ÄKTA de UPR-IPM o del Laboratorio de la Dra. R.L. Krauth-Siegel, BZH, Universidad de Heidelberg.

#### **8.3.2. Expresión y purificación de versiones de *Tb1-C-Grx1* y *Tc1-C-Grx1* sin etiqueta de afinidad**

Las diferentes versiones de *Tb1-C-Grx1* (FL, FL-C104S, FL-C181S, FL-C104/181S, Δ76, Δ76-C104S, Δ76-C181S, Δ76-C104/181S) y *Tc1-C-Grx1* (FL, FL-C105S y Δ76) clonadas en el vector pET-trx1b se expresan como proteínas de fusión con la tiorredoxina de *E. coli* (*EcTrx*) en la región aminoterminal, separada del producto de interés por un parche de histidinas y un sitio de corte para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEVp, ver más adelante). Generalmente, las células *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) transformadas fueron crecidas a 37°C y 220 rpm en medio 2YT (detallado como: 16 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 5 g/L de NaCl, ajustado a pH 7.4 con hidróxido de sodio) con 50 μg/mL de kanamicina hasta una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) ~ 0.8-1 y la expresión de la proteína

recombinante es inducida ON con 200  $\mu$ M IPTG a 20°C y 220 rpm. Las células inducidas fueron cosechadas por centrifugación a 4000 g durante 10 min a 4°C y resuspendidas en amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.8 con 300 mM NaCl (amortiguador A) suplementado con 1 mM de PMSF, 40  $\mu$ g/mL TLCK, 150 nM pepstatina, 4 nM cistatina, 100  $\mu$ g/mL aprotinina y 1 mg/mL of lisozima ("amortiguador de lisis", 5 mL/g de pellet celular húmedo). La suspensión celular se incubó 1 hr en hielo previo a su disrupción por 3 ciclos de sonicado en baño de hielo (Sonicador Branson 450, EUA) usando un programa de 1 segundo ON: 1 segundo OFF hasta completar 2 min totales en modo ON, generalmente usando el "macrotip" o "microtip" al 30% o 50% de potencia, respectivamente, y con descansos de 1-2 min en hielo entre ciclos. La suspensión celular sonicada se trató con  $\sim$ 0.01 U/mL de ADNasa (Invitrogen) y 10 mM  $MgCl_2$  y posteriormente se centrifugó a 20000 g durante 1 hr para remover el *debris* celular y, en caso de ser necesario, se repitió esta etapa con la fracción soluble separada de la primera centrifugación. La fracción soluble final (fracción "LIS") fue filtrada por filtros de 0.45  $\mu$ m (Minisart, Sartorius) y cargada en una columna de IMAC previamente equilibrada en amortiguador A con un flujo de 1-2 mL/min. La columna fue lavada con 5 volúmenes de columna (CV) de amortiguador A y se colectó conjuntamente la fracción no unida de la siembra y este primer lavado (fracción "FNU1"). La columna cargada se lavó con 5 CV de amortiguador A con 20 mM imidazol (fracción "LAV") y las proteínas unidas fueron eluidas con 500 mM imidazol en amortiguador A (amortiguador de elución, fracción "ELU1"), ya sea en un único escalón o mediante la aplicación de un gradiente lineal de 1-2% de amortiguador de elución/min en cromatógrafo ÄKTA (GE) con detección UV-visible en línea a 280 nm. La fracción ELU1 contiene mayoritariamente ( $\sim$ 90%) a la proteína de fusión (analizada por SDS-PAGE, ver más adelante) en amortiguador con alta concentración de imidazol (generalmente  $>$ 200 mM). La proteína de fusión se separa en sus dos componentes por proteólisis con la proteasa TEVp para lo cual, en una primera instancia, se ensayaron diferentes condiciones de corte (T, tiempo, relación sustrato:TEVp, etc.) optándose por tratar la fracción ELU1 con 5 mM DTT y TEVp en una relación proteína de fusión:TEVp de  $\sim$ 1/35:70 (g/g). El corte se realiza en simultáneo con una diálisis a 4°C en membrana con tamaño de poro de exclusión (MWCO) de 3 o 10 kDa (Sigma-Aldrich) contra amortiguador A con agitación. Generalmente, en la primera etapa de la diálisis un volumen de muestra se dializa contra 20 volúmenes de amortiguador durante 4 hrs a 4°C con agitación y en la segunda etapa se realiza 1 volumen contra 20-40 volúmenes, ON y en iguales condiciones, generando una dilución final de los componentes de bajo peso molecular presentes en el proteolizado de  $\sim$ 400-800 veces. La mezcla proteolizada y con baja concentración de imidazol fue centrifugada 1 hr a 20000 g y 4°C o clarificada por filtración  $\mu$ 0.45 nuevamente sembrada en una IMAC equilibrada en amortiguador A. Se recuperó la FNU (fracción "FNU2"), la cual posee la proteína de interés, y se trató con 2-5 mM EDTA y 5 mM DTT por 30 min a TA para luego concentrarla por ultrafiltración (filtros Milipore de Sigma-Aldrich o Vivaspín de GE). La EcTrx con cola de histidina es retenida en este segundo paso de IMAC y se eluye posteriormente mediante amortiguador de elución (fracción "ELU2"). Finalmente, la fracción FNU2 fue repurificada por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en columnas preparativas Superdex 75 16/60 o 26/60 (GE) equilibradas en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl (amortiguador B) y previamente

calibradas en iguales condiciones con estándares de proteínas globulares (Gel Filtration Calibration Kit LMW, GE). El pico correspondiente a la proteína de interés (confirmado por electroforesis y espectrometría de masa, ver más adelante) fue colectado, concentrado, filtrado a 0.22  $\mu\text{m}$  y almacenado a 4°C en amortiguador B o, en su defecto, a -80°C con glicerol 10 %. Debido a restricciones del clonado el producto FL de *Tb* y *Tc* 1-C-Grx1 retiene una extensión GAMG previo a Q42, mientras que las versiones truncas (*Tb* $\Delta$ 76 y *Tb* $\Delta$ 77) reciben una extensión GA previo la metionina inicial.

### **8.3.3. Expresión y purificación de versiones de *Tb*1-C-Grx1 con cola de histidina**

La producción y purificación de las formas con “cola de histidinas” de *Tb*1-C-Grx1 (Filser et al., 2008) se realizó siguiendo un procedimiento muy similar al utilizado para la primera etapa de la purificación de las versiones sin etiqueta de afinidad. Brevemente, las células *E.coli* de la cepa Novablue (Novagen) transformadas con el vector pQE30 correspondiente fueron crecidas en medio 2YT con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina a 37°C y 220 rpm, inducidas ON con 200  $\mu\text{M}$  IPTG a 20°C y 180-220 rpm, cosechadas por centrifugación, lisadas por lisozima y sonificado y purificadas por IMAC, como se describió anteriormente. Generalmente se agregó un último paso de purificación por SEC, como se comentó para la forma sin etiqueta de afinidad. Debido a que la proteína eluída de la IMAC en las formas WT y C181S se obtiene con evidencias de poseer compuestos de hierro unidos (ver texto), previo al paso de SEC las proteínas fueron tratadas con 5 mM DTT y 5 mM EDTA por 30 min a TA. Las versiones de *Tb*1-C-Grx1 producidas a partir de este vector poseen una extensión MRGSH<sub>6</sub>SG aminoterminal precediendo a Q42. Para favorecer la producción “in vivo” de la holo-proteína el cultivo es suplementado con ~100  $\mu\text{M}$  FeCl<sub>3</sub> inmediatamente antes de la inducción.

### **8.3.4. Expresión y purificación de la proteasa del virus del grabado del tabaco**

La proteína recombinante TEVp con cola de histidina se expresó a partir de una construcción desarrollada por van der Berg y colaboradores (van den Berg et al., 2006) gentilmente cedida por la Unidad de Cristalografía de Proteínas (PXF) del IPM. El vector pTH24 portando el gen de TEVp con varias mutaciones que aumentan el rendimiento y estabilidad de la proteína purificada, fue usado para transformar células de *E. coli* de la cepa Rosseta(DE3)pLysS (Invitrogen). Las células transformadas fueron crecidas en medio 2YT suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloramfenicol a 37 °C y 220 rpm, hasta una OD<sub>600</sub> ~0.6 cuando la expresión fue inducida con 1 mM IPTG durante 16 hr a 20 °C y 220 rpm. Cumplido este tiempo, las células se cosechan por centrifugación, lisan y clarifican como se indicó más arriba con la única diferencia de que se agrega 1% (v/v) de Triton-X100 al lisado celular previo a la centrifugación. La purificación se realiza por IMAC de manera análoga y se recupera la proteína en el eluído con una pureza >90%. La proteína purificada se trató con 2 mM EDTA y 5 mM DTT 30 min a TA antes de realizarse el cambio de amortiguador con una HiTrap® previamente equilibrada en

amortiguador fosfato de sodio 25 mM pH 7.0 con 200 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, adicionándose posteriormente 10% glicerol. Se guardan alícuotas de 1-3 mg/mL a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **8.3.5. Expresión y purificación de la desulfurasa de cisteína de *Escherichia coli***

Células de *E.coli* cepa BL21(DE3) fueron transformadas con el plásmido pET28a(+) con el gen codificante para la desulfurasa de cisteína de *E. coli* (*EclscS*), gentilmente cedido por el Dr. Carsten Berndt (Department of Neurology, Medical Faculty, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Alemania) (Berndt et al., 2007). Las células transformadas se crecieron en medio de cultivo "Terrific" (TB, detallado como 24 g/L de extracto de levadura, 12 g/L de triptona, 9,4 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,2 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 4 mL de glicerol 100%) con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  kanamicina a  $37^{\circ}\text{C}$  y 220 rpm hasta una  $\text{OD}_{600} \sim 0.8$ . En este punto, el medio fue suplementado con 10  $\mu\text{M}$  PLP y la expresión de la proteína inducida con 150  $\mu\text{M}$  IPTG a  $15^{\circ}\text{C}$  y 180 rpm durante 16 hrs. La proteína fue purificada por IMAC como se describió anteriormente y el eluido se incubó con 100  $\mu\text{M}$  PLP por 1 hr a TA previo a ser dializado ON contra amortiguador A en membranas de 10 kDa de MWCO. La proteína dializada se concentró hasta  $\sim 500 \mu\text{M}$ , cuantificó espectrofotométricamente (ver más adelante) y degaseó extensamente bajo flujo de Ar previo a ser almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  en presencia de 10% (v/v) de glicerol.

### **8.3.6. Expresión y purificación de versiones de Tb1-C-Grx1 isotópicamente marcadas para NMR**

La preparación de las versiones libres de etiqueta de afinidad e isotópicamente marcadas de Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$  y FL se realizó de manera similar a lo descrito solo que las células fueron crecidas en medio M9 conteniendo 1 g/L  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  y/o 4 g/L  $^{13}\text{C}$ -glucosa como la única fuente de nitrógeno y carbono, respectivamente. A su vez, el paso final de SEC fue omitido. La fracción "FNU2" fue concentrada y se realizó cambio de buffer usando una columna HiTrap<sup>®</sup> (GE) previamente equilibrada en amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH 7.0 con 150 mM NaCl y 10 mM DTT. Las proteínas fueron concentradas hasta la concentración deseada (0.4-1 mM) y se agregó 10 % de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

## **8.4. Herramientas computacionales y bioinformáticas**

A continuación se detallan solamente aquellos programas que merecen una descripción particular por su frecuencia de uso o su relevancia en este trabajo, dejando fuera los paquetes informáticos usados para resolver y analizar las estructuras obtenidas por NMR, comentados brevemente en la sección correspondiente y detallados en (Manta et al., 2013a; Pavan, 2012). Algunos programas de uso puntual se comentan en la sección correspondiente.

### 8.4.1. Bases de datos

En este trabajo recurrimos habitualmente a información disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y las bases de datos específicas sobre tripanosomas (TriTryp, <http://tritrypdb.org/tritrypdb>), organismos patógenos (GeneDB, <http://www.genedb.org>) y el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org>). A su vez, consultamos regularmente información sobre proteómica (Acestor et al., 2009; Gunasekera et al., 2012; Panigrahi et al., 2009; Urbaniak et al., 2012; Zhang et al., 2010) y transcriptómica (Kolev et al., 2010; Nilsson et al., 2010; Rastrojo et al., 2013; Siegel et al., 2010) de tripanosomas y leishamanias publicadas en los trabajos citados y se recurrió frecuentemente a información biológica y taxonómica disponible en el proyecto "Tree of Life web project" (<http://tolweb.org/tree>).

### 8.4.2. Búsqueda, alineamiento de secuencias y visualización

En este trabajo generalmente recurrimos al DELTA-BLAST ("Domain enhanced lookup time accelerated - Basic Local Alignment Search Tool", [NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)) como técnica de búsqueda usando secuencias de proteínas como sonda ("query"). Esto se debe a que esta versión del BLAST presenta mejoras respecto de versiones anteriores (ej. PSI-BLAST) particularmente útiles en la detección de homólogos distantes (Boratyn et al., 2013). El algoritmo de DELTA-BLAST (Boratyn et al., 2012) utiliza matrices de sustitución desarrolladas específicamente para una cierta clase de proteínas agrupadas por conservación de dominio. Para ello, el algoritmo realiza primero un alineamiento de la secuencia blanco contra el alineamiento múltiple (MSA) que define el dominio al cual pertenece la misma, según la base de datos de dominios conservados CCD. Esta base de datos está curada manualmente y refinada en base a las estructuras tridimensionales existentes para cada dominio y se usa, entre otras cosas, para la anotación automáticamente de proteínas ((Marchler-Bauer et al., 2011), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Cada dominio conservado se representa por su matriz de sustituciones determinada a partir del MSA correspondiente y la búsqueda por homología con la secuencia blanco se realiza contra ese subconjunto restringido previamente, permitiendo la detección más precisa de secuencias homologas e incorporando, indirectamente, información sobre la conservación "estructural" (dominios). Las secuencias fueron alineadas mediante la herramienta Clustal Omega del European Bioinformatic Insititute (EBI, UK) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (Sievers et al., 2011) con los parámetros de búsqueda que tabulados por defecto. Los alineamientos fueron analizados inicialmente en Jalview (<http://www.jalview.org>) y luego manipulados en BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) para la preparación de las figuras. Los dendrogramas y árboles filogenéticos fueron construidos a partir de la herramienta propia de Clustal Omega (Blackshields et al., 2010) y visualizados usando el servidor "i-Tree of Life" (Letunic and Bork, 2011) disponible en

<http://itol.embl.de>. La identidad y similitud de secuencias fue analizada de a pares con la herramienta disponible en BioEdit la cual se basa en la matriz de sustitución "BLOSUM62", utilizada por defecto en varios algoritmos de búsqueda y alineamiento como BLAST. En estos procedimientos generalmente la "identidad" se define como el porcentaje de residuos idénticos entre dos secuencias alineadas y la "similitud" como el porcentaje de residuos considerando similares en base a matriz de similitud predefinida. BLOSUM62 considera la matriz reportada originalmente en (Gribskov et al., 1987) basada en conservación de propiedades fisicoquímica (escala "MacLahan"). Los logos de secuencia se realizaron con el servidor WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com>, (Crooks et al., 2004)) en base a los alineamientos obtenidos en Clustal Omega. En consecuencia, los espacios "vacíos" (estrictamente, poco representados) en el alineamiento ("gaps") pueden representarse gráficamente mediante el ancho de la letra en el logo, dando una idea más realista de la conservación a lo largo de todo el alineamiento. La conservación en una cierta posición, por el contrario, se representa por la ocupación vertical (probabilidad/bits) y se distribuye según la abundancia relativa de cada aminoácido en esa posición.

### 8.4.3. Identificación de péptidos de localización subcelular

Para el análisis de las secuencias de proteínas recurrimos herramientas disponibles en servidores, muchos de ellos accesibles a través del sitio EXPASY (<http://www.expasy.org/proteomics>) (Gasteiger et al., 2003). Para la identificación de péptidos señal se usó TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Petersen et al., 2011), MitoProt (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) (Claros and Vincens, 1996), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), PREDATOR (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) (Small et al., 2004) y MULTILOC2 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) (Blum et al., 2009). Como destacan Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2010) la variedad en largo, composición y ubicación de los péptidos de MTS en tripanosomas determinan que los algoritmos de predicción puedan fallar u otorgar resultados confusos. Los autores desarrollaron un nuevo sistema el cual, si bien no está disponible online, les permitió predecir la localización subcelular y los MTS de casi 500 proteínas de *T. brucei*, muchas de las cuales fueron experimentalmente identificadas como mitocondriales ya sea por ellos (Zhang et al., 2010) (<http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2010/07/26/nar.gkq618/suppl/DC1>) o por Panigrahi y colaboradores ((Panigrahi et al., 2009, 2009), <http://www.trypsproteome.org>). A su vez, recientemente Mach y colaboradores reportaron una lista de proteínas mitocondriales en *T. brucei* la cual también fue usada para corroborar las predicciones ((Mach et al., 2013), <http://gbe.oxfordjournals.org/content/5/5/860/suppl/DC1>).

#### **8.4.4. Análisis *in silico* de propiedades de secuencias de péptidos y proteínas**

La secuencia fueron analizada mediante varios servidores *on-line* para predecir propensión a formar estructura secundaria o regiones desordenadas, a saber: DISEMBL (<http://dis.embl.de>) (Linding et al., 2003a), GlobPlot2 (<http://globplot.embl.de>) (Linding et al., 2003b), AGADIR (<http://agadir.crg.es>) (Muñoz and Serrano, 1994), , Parcoil2 (<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2>) (McDonnell et al., 2006) y COILS ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)). Adicionalmente, para el análisis de la composición de dominios o elementos de estructura secundaria/terciaria se recurrió a servidores más completos donde se integran diferentes funciones, como ser: PROSITE (<http://prosite.expasy.org>) (Sigrist et al., 2012), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>) (McGuffin et al., 2000), PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) (Letunic et al., 2012) e I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Roy et al., 2010, 2012; Zhang, 2008).

#### **8.4.5. Análisis de modelos estructurales**

Para la comparación de estructuras se recurrió a las herramientas disponibles en el servidor DALI (Holm and Rosenström, 2010; Holm et al., 2008). Las imágenes de modelos estructurales presentadas en el trabajo se realizaron mediante el programa PyMOL v 0.99 (<http://www.pymol.org>) a partir de archivos PDB depositado en el "Protein Data Bank" (<http://www.rcsb.org>) o generados durante este trabajo.

#### **8.4.6. Gráficas, referencias e imágenes**

Todas las gráficas y ajustes matemáticos fueron realizados usando el programa Origin (v.7 u 8, OriginLab, EUA) mientras que los test estadísticos para los experimentos de infección se realizaron en Excell® (Microsoft, EUA) o con el programa MedCalc (<http://www.medcalc.org>). Las estructuras de moléculas pequeñas fueron dibujadas y optimizadas en el programa ChemSketch (<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch>). Las referencias fueron administradas y editadas con el programa Zotero (<http://www.zotero.org>). Las imágenes fueron procesadas mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) y Abode Photoshop®, mientras que las figuras se realizaron con Adobe Illustrator® y el montaje final se realizó con Adobe InDesign®, todos del paquete Abode Creative Suite 4 (<http://www.adobe.com>).

## 8.5. Procedimientos generales de análisis de calidad y conformación de proteínas recombinantes

### 8.5.1. Medidas espectroscópicas

Los espectros de absorción se realizaron, mayoritariamente, en un espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent) con portacubeta no termostatizado y usando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma Analytics, Alemania), con velocidades de barrido de 20-50 nm/min. En todos los casos se realizó la sustracción del espectro del amortiguador o disolvente en idénticas condiciones. Los espectros y medidas de fluorescencia en estado estacionario fueron realizados en un espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (Agilent) con portacubeta múlticelda termostatizado y cubetas de cuarzo de 0.5 o 1 cm de paso óptico (Hellma Analytics o Sigma-Aldrich). Generalmente, 3-5 espectros fueron adquiridos y promediados para cada experimento y el centro de masa ("mass center") de los espectros se determinó según:

$$mass\ center = \frac{\sum RFU_i \times \lambda_i}{\sum RFU_i}$$

donde  $RFU_i$  es la intensidad de fluorescencia a cada longitud de onda  $i$  (nm). En caso de ser necesario, los componentes dispersivos (banda de Ramman y/o difracciones de segundo orden (Lakowicz, 2006) fueron sustraídos a partir de espectros del disolvente adquiridos en idénticas condiciones sin las moléculas fluorescentes. La mayoría de los experimentos para la determinación del pKa de cisteínas (ver más adelante) fueron realizados por espectroscopía de fluorescencia en microplaca (Greiner) usando un equipo Varioskan (Thermo-Scientific, EUA). Los espectros de dicroísmo circular fueron adquiridos en espectropolarímetros Jasco 810 o Jasco 815 (Jasco Inc., Japón) con portacubeta termostatizados, purga constante por  $N_2$  a ~5 L/min y calibrado de acuerdo a instrucciones del fabricante con ácido (+)-10-canforsulfónico. Los espectros en el ultravioleta (UV lejano  $\lambda < 250$  nm) fueron adquiridos en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.0 en cubetas de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico usando muestras de proteína a 10-50  $\mu$ M, salvo excepciones indicadas. Los espectros en el UV cercano y visible ( $\lambda > 250$  nm) fueron adquiridos en cubetas de cuarzo de 1.0 – 2.0 cm de paso óptico en amortiguador B o similar en presencia o ausencia de DTT (concentración máxima 500  $\mu$ M) usando concentraciones de proteína de 50-100  $\mu$ M. Generalmente, la velocidad de escaneo usada fue de 20-50 nm/min, el paso de banda de 0.2 - 1 nm, el voltaje del fotomultiplicador se mantuvo  $< 600$  V y 3-5 espectros fueron adquiridos y promediados para cada condición. En todos los casos se tomaron igual número de espectros del amortiguador en idénticas condiciones, los cuales fueron promediados y el espectro resultante sustraído manualmente al de la muestra. Los espectros en el UV lejano se expresan como elipticidad media por residuo ( $[\theta]_{mrw}$ , de "mean residue molecular weight"), calculada según:

$$[\theta]_{mrw} = \frac{\theta \times M_{mrw}}{10 \times c \times l}$$

Donde  $\theta$  es la elipticidad medida,  $M_{mrw}$  es el peso molecular de la proteína normalizado por número de residuos,  $c$  es la concentración en mg/mL y  $l$  el paso óptico en cm (Pain, 2005). Los espectros en el UV

cercano, por su parte, presentan directamente como la elipticidad medida por el equipo (en  $\text{deg}$  o  $\text{mdeg}$ ). Los espectros fueron deconvolucionados utilizando el programa CDSSTR (Sreerama and Woody, 2000) disponible en el sitio web DichroWeb (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) (Whitmore and Wallace, 2004) y suavizados mediante la aplicación de un filtro Savitzky-Golay de segundo grado con una ventana de 5 o 10 puntos en el programa Origin.

### 8.5.2. Cuantificación de proteínas

La dosificación de proteínas en mezclas complejas (por ejemplo en lisados celulares) se realizó mediante el método del ácido biccinconínico o de Bradford adaptados para lectura en microplaca según instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich), usando BSA como estándar. Se usaron placas de mínima adsorción (Greiner) y lector de microplacas con filtros (BioRad). Para las muestras de proteínas purificadas la concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) de la proteína determinado a partir de su secuencia aminoacídica o calculado experimentalmente según (Pace et al., 1995). Como control, en todos los casos se tomaron espectros de absorbancia en el rango de 250-600 nm para artefactos derivados de proteínas agregadas o partículas. Los valores de  $\epsilon$  usados en este trabajo fueron:  $12190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para *Tb1-C-Grx1* FL  $\Delta 76$ ,  $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para todas las versiones de *Tb1-C-Grx1* con cola de histidinas,  $10095 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para las formas FL $\Delta 76$  y C105S de *Tc1-C-Grx1*,  $36130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para TEVp y  $39700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para la cisteína desulfurasa de *E. coli* (Wu et al., 2008).

### 8.5.3. Reducción, alquilación, oxidación y cuantificación de tioles proteicos

Para la reducción de tioles proteicos las proteínas de interés se incuban con 5-10 mM DTT en el amortiguador adecuado durante 5-30 min a TA y el exceso de reductor se remueve mediante cambio de amortiguador usando ultrafiltración (filtros Millipore o Vivaspín), gel filtración por gravedad (columnas PD10) o permeación en gel por centrifugación (MicroSpin, GE). La alquilación de tioles se realizó mediante el agregado de IAA, IAM o NEM en exceso  $>20$  veces a la concentración molar de proteína a TA y durante al menos 30 min, generalmente en amortiguador de  $\text{pH} > 7.0$ . La oxidación controlada de tioles proteicos se realizó tratando las muestras con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cuantificado mediante su absorción a 240 nm,  $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) o GSSG (disuelto a 100 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  con 10% acético) en el amortiguador deseado y en ausencia de DTT, según se indica en cada caso. Los tioles libres se determinaron espectrofotométricamente mediante el método de Ellman (Ellman and Lysko, 1979), que se basa en la reacción del DTNB con los grupos tiol produciendo el anión coloreado 5-tio-3-nitrobenzoato cuantificable por su absorción en el visible ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en fosfato de sodio  $\text{pH} 7.4$ , NaCl 150 mM (Riener et al., 2002)) o mediante la reacción con DTDPy, que produce la liberación de 2-tiopiridona cuantificable a partir de su absorbancia a 324 nm ( $\epsilon_{324 \text{ nm}} = 21.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (Grasseti and Murray, 1967)).

En general, la reacción de desarrollo de color se realiza con 1-5  $\mu\text{M}$  proteína, dependiendo del número de cisteínas por cadena polipeptídica, y 200  $\mu\text{M}$  del reactivo (DTNB o DTDPy), durante 5-10 min a TA y protegida de la luz. El DTNB stock se prepara a 4 mM en amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH  $\leq 5$  y se almacena alicuotado y protegido de la luz a  $-20^\circ\text{C}$ . La solución stock de DTDPy se prepara a 500  $\mu\text{M}$  en fosfato de potasio 50 mM, pH  $\leq 5$  y se lleva a pH  $\sim 7$  con NaOH, previo a su almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **8.5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó en geles discontinuos (Laemmli, 1970) con 10-15 % de entrecruzamiento para el gel de resolución y 5 % para el gel concentrador. Los geles se prepararon en base a protocolos de GE usando sistemas de BioRad para los geles de 8 x 10 cm o GE para los geles de 10 x 10 cm. Las muestras a sembrar se preparan en amortiguador de carga (SB) preparado a 5X como Tris 62.5 mM pH 6.8, con 2 % (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS), 10 % (v/v), glicerol, 0.01 % (p/v) y azul de bromofenol, con o sin el agregado de 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\sim 710$  mM final). Los lisados celulares resuspendidos en 1X SB se calentaron a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 min previo a su siembra en el gel, mientras que las muestras de proteínas puras o mezclas simples fueron incubadas en SB 1X durante 1-6 hr previo a su resolución pero *no* calentadas. Los geles se resolvieron a corriente constante de 20-40 mA por gel, dependiendo del tamaño del mismo. En función de la sensibilidad necesaria, la tinción de los geles se realizó con Azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich, preparado al 0.3 % (p/v) en solución acuosa de 40 % etanol y 10 % HAc) o nitrato de plata. Los geles teñidos con Azul de Coomassie G-250 se destiñeron con solución de desteñido (40 % etanol y 7 % ácido acético en agua) y se almacenaron en una solución de 20% etanol y 3 % glicerol hasta su digitalización o descarte.

#### **8.5.5. Cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz**

El comportamiento hidrodinámico de las proteínas recombinantes purificadas se analizó rutinariamente por SEC en columnas Superdex 75 10/300 GL (GE, siembra de 50-200  $\mu\text{g}$  en 500  $\mu\text{L}$ ) o Superdex 75 5/150 GL (GE, siembra de  $\sim 5$   $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{L}$ ) acopladas al sistema ÄKTA con detección UV-visible en línea. Las columnas fueron calibradas usando estándares de peso molecular de 6.5-75 kDa (Gel Filtration Calibration Kit LMW, GE) en las mismas condiciones de amortiguador, flujo y temperatura en las cuales se realizaron las determinaciones. A su vez, las muestras se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) en equipo Malvern NanoS de la Unidad de Biofísica de Proteínas (UBP-IPM) a concentraciones de 0.1-10 mg/mL de proteína en amortiguador B o similar y a  $25^\circ\text{C}$ . Para el análisis del péptido aminoterminal de Tb1-C-Grx1 en solución se recurrió a una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE) equilibrada en amortiguador B a 0.5 mL/min (TA) con detección UV a 215 nm y calibrada con EcTrx (11806 Da, producida según (Manta et al., 2009)), aprotinina (6511 Da, GE), péptido 94-108 EcTrx (1649 Da, gentilmente cedido

por el Dr. J. Santos, (Santos et al., 2007)), riboflavina (376 Da, Sigma-Aldrich) y NaCl (evidenciable por pico en conductividad). Los cromatogramas fueron analizados mediante el software incluido en el paquete del ÄKTA (Explorer®, GE) o mediante la herramienta de ajuste no lineal del programa Origin usando funciones de distribución Gaussianas o Gaussiana modificada por una exponencial, de acuerdo a lo recomendado en (Nikitas et al., 2001).

### **8.5.6. Espectrometría de masas**

Todas las proteínas purificadas fueron analizadas por espectrometría de masa (MS) en un espectrómetro Analyser 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems), operado por personal de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UBYPA) del IPM. La masa de las proteínas enteras se determinó usando como matriz una solución saturada de ácido sinapínico en 0.2 % ácido trifluoroacético (TFA) y 50 % acetonitrilo operando el equipo en modo lineal positivo con un rango  $m/z = 5000-40000$ . Las muestras fueron sembradas directamente en la placa, previamente dializadas contra amortiguador bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,4 o desaladas usando microcolumnas caseras de fase reversa con resina POROS 10R2 (Applied Biosystems). Para la determinación del perfil de péptidos tripticos en muestras proteicas se realizó la digestión de 20-50  $\mu\text{g}$  de proteína con 0.15  $\mu\text{g}$  de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) en amortiguador bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.4 durante 2 hrs a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  de la muestra proteica y se mezclaron con el mismo volumen de una solución saturada de la matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma-Aldrich) en 0.1% TFA y 50% acetonitrilo. Las mezclas se colocaron directamente sobre la placa de muestra del espectrómetro de masa, se dejaron secar a TA y posteriormente se realizaron 1-3 lavados directamente sobre la placa con 0,1%. TFA En algunos experimentos donde la identificación y selección de los péptidos que poseen cisteínas (libres o modificadas) era el interés, previo o durante la digestión se incubó la proteína 30 min con 55 mM IAM en presencia o ausencia de 5 mM DTT. En todos los casos, los espectros de masa de péptidos fueron adquiridos en modo reflector ( $m/z = 500-5000$ ) usando CHCA como matriz y se calibraron de forma externa usando una mezcla comercial de péptidos de masa conocida (Applied Biosystems). Para la asignación de los péptidos y sus posibles modificaciones postraduccionales las masas medidas se compararon con masas teóricas de digestiones proteolíticas virtuales usando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) y las posibles modificaciones postraduccionales fueron evaluada consultando la base de datos "Delta Mass" de ABRF (<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>). Los experimento de MS con ionización por "electrospray" se realizaron en un espectrómetro de masa NanoESI LQT-Velos (Thermo-Fisher Scientific, Inc., EUA) acoplado a un cromatógrafo Easy Nano-HPLC (Proxeon, Thermo) equipado con una columna de fase reversa C18 (100 x 0.075 mm, Proxeon) con precolumna C18 (20 x 0.1 mm). Para la adquisición de los resultados se utilizó un protocolo automático de rápida adquisición de datos ( $\mu\text{s}$ ) y fragmentación  $\text{MS}^n$  de los iones seleccionados.

## 8.6. Ensayos de cristalogénesis

Con el objetivo de obtener cristales de proteína de calidad adecuada para difracción de rayos X se realizaron ensayos de cristalización con varias versiones de *Tb1-C-Grx1* en colaboración con PXF. En general, para estos ensayos la proteína recién purificada y con niveles de pureza  $\geq 95\%$  fue preparada en amortiguador Tris 20 mM pH 7.8 – 8.0 con o sin NaCl 150 mM, DTT 10 mM o GSH 10 mM y concentradas hasta 25-150 mg/mL por ultrafiltración. Inicialmente se realizaron pruebas de solubilidad con 2 o más concentraciones de proteínas tratadas con 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 con 15% y 30% de polietilenglicol 4000 ó 0.2 M de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  y 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 con 1 y 2 M sulfato de amonio. Luego de completadas las pruebas de solubilidad se realizaron cribados (“screenings”) de cientos de condiciones de cristalización usando un sistema robótico (Honeybee 963, Digilab) de “gota sentada” de pequeños volúmenes (típicamente 300 nL) y distintos kits comerciales como JCSG (Hampton Research, EUA) o pH-clear, AmSO4, PEG o Classical Suite 2 (Qiagen). Las placas fueron mantenidas a 20 ( $\pm 2$ )°C y observadas periódicamente usando un microscopio estereoscópico trinocular SZX-16 (Olympus). Aquellas condiciones de cristalización que otorgaron resultados promisorios fueron reproducidas manualmente en placas de 24 pocillos (Hampton Research, EUA) con el sistema de “gota colgante” sobre vidrios siliconados (Hampton Research, EUA). Durante la optimización se realizaron ajustes en la concentración de proteína, amortiguador (pH, fuerza iónica, presencia de aditivos), temperatura (20° o 4°C), volumen de reservorio, volumen total de gota o la relación volumen proteína:volumen de reservorio en la gota. En una de las condiciones promisorias se realizó microseeding usando fragmentos de microcristales obtenidos en una condición de cristalización exitosa de uno de los cribados. El registro, diseño y evaluación de las placas manuales se realizó con el programa X-track (Harris and Jones, 2002) instalado localmente en el servidor del IPM.

## 8.7. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

La resolución de la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* por NMR se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Massimo Bellanda (Universidad de Pádova, Italia) y fue realizada durante el trabajo de Tesis de Doctorado del Dr. Carlo Pavan (Pavan, 2012). Brevemente, los espectros de NMR para la asignación y cálculo de estructura fueron adquiridos en espectrómetros Bruker (Alemania) de 600 MHz del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de Pádova, Italia o espectrómetros Bruker de 500, 800 y 900 MHz del “Bruker Avance NMR Center” en Frankfurt, Alemania, a 298 K en todos los casos. En una primera instancia se probaron diferentes condiciones de pH del amortiguador, concentración y aditivos mediante experimentos 2D- $^{15}N$ -HSQC en espectrómetro de 600 MHz y se obtuvo una buena calidad y dispersión de las señales usando tubos Shigemi y *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* a 1 mM en amortiguador fosfato de sodio pH 7.0 con NaCl 150 mM con 10 mM DTT. El conjunto de experimentos realizados para la resolución de la estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* se detalla en (Manta et al., 2013a). El procesamiento de los datos y análisis de los espectros fue realizado usando los programas TOPSPIN 1.3 (Bruker BioSpin GmbH, Alemania) y CARI 1.9

(<http://cara.nmr.ch>), respectivamente. Las restricciones de distancia para la determinación de la estructura se obtuvieron a partir de espectros 3D NOESY-HSQC editados en  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$ , mientras que las restricciones para los ángulos diedros del esqueleto carbonado se obtuvieron a partir de los corrimientos químicos de  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}'$ ,  $^{13}\text{C}\alpha$ ,  $^{13}\text{C}\beta$  y H $\alpha$  usando TALOS+ (Shen and Bax, 2010). La identificación y asignación de los picos de NOESY se realizó de manera semiautomática en base a los algoritmos ATNOS/CANDID (Herrmann et al., 2002a, 2002b) implementado en el paquete UNIO'10 (Guerry and Herrmann, 2012) y fueron incorporados en el cálculo de la estructura usando CYANA 2.1 (Güntert et al., 1997). Para los cálculos de estructura se impuso una conformación *cis* del enlace peptídico anterior a la Pro146. Los 20 conformeros con menor valor de función residual ("residual target function") fueron subsecuentemente refinados por experimentos de dinámica molecular usando solvente explícito y el campo de fuerza AMBER implementado en el paquete AMPS-NMR (Bertini et al., 2011). Una vez completada la asignación del 2D-HSQC se realizaron experimentos de titulación con GSH y T(SH)<sub>2</sub> tanto sobre la forma FL como  $\Delta 76$  de Tb1-C-Grx1. Las soluciones stock de los ambos titulantes fue preparada en el mismo amortiguador que las proteínas a 100 y 50 mM, respectivamente, y adicionados en pequeñas alícuotas al tubo de NMR conteniendo la proteína a una concentración de 0.2 – 0.4 mM. Los experimentos de dinámica del esqueleto carbonado se adquirieron a partir de experimento de  $^{15}\text{N}$ -HSQC en un espectrómetro Bruker DMX 600 MHz. Los cálculos hidrodinámicos usados para predecir las propiedades de relajación se realizaron con el programa HYDRONMR (Bernadó et al., 2002) usando las condiciones por defecto. Las resonancias asignadas y la estructura ya completa de Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$  fueron depositadas en BioMagResBank ([www.bmrb.wisc.edu](http://www.bmrb.wisc.edu), ID 18485) y en Protein Data Bank (PDB ID 2LTK) respectivamente. La asignación de la estructura de la proteína completa (FL) se encuentra en proceso, sin embargo, se han realizado experimentos 2D- $^{15}\text{N}$ -HSQC, así como experimentos de titulación y dinámica, trabajando fundamentalmente en el espectrómetro de 600 MHz de la Universidad de Pádova y los espectrómetros de 800 MHz y 1 GHz del "Bruker Avance NMR Center" de Frankfurt y Lyon, respectivamente. Algunos de los resultados preliminares se discuten en este trabajo.

## 8.8. Reconstitución *in vitro* de centros ferrosulfurados

La reconstitución *in vitro* de centros ferrosulfurados (FeS) se realizó esencialmente como se describe en (Manta et al., 2013a) basado en el protocolo original propuesto por Berndt y colaboradores (Berndt et al., 2007). Si bien las condiciones particulares de cada experimento se detallan en las figuras correspondientes, en términos generales la reacción de reconstitución se realizó de la siguiente manera: *i*) la proteína recombinante purificada (50-200  $\mu\text{M}$ ) se incubó con 5 mM DTT y el tiol de bajo peso molecular a incorporar como cofactor (GSH, Gsp o T(SH)<sub>2</sub>) a una concentración de 2-10 veces la concentración de proteína en amortiguador A o B extensamente degaseado con Ar y usando tubos de polipropileno no autoclavados; *ii*) luego de 10 min a TA se agrega PLP (en general 2-5 veces la concentración de EclscS),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  y cisteína, ambos a 2 veces la concentración de Grx usada en el

experimento, *iii*) por último se agrega *EclscS* a una relación de concentraciones molares 10-20 veces menor que la concentración de *Grx*, *iv*) se cierra el tubo y la reacción se deja proceder por 1 hr en condiciones de anaerobiosis y *v*) cumplido este tiempo las muestras se centrifugan a 14000 g por 5 min a RT y el sobrenadante se recupera para su análisis (espectroscopía UV-visible, CD o SEC). A modo de ejemplo, las condiciones frecuentemente usadas en un ensayo suelen ser: 50  $\mu\text{M}$  *Grx*, 5 mM DTT, 10  $\mu\text{M}$  PLP, 500  $\mu\text{M}$  GSH/Gsp o 250  $\mu\text{M}$  T(SH)<sub>2</sub>, 100  $\mu\text{M}$  Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 100  $\mu\text{M}$  cisteína y 2.5  $\mu\text{M}$  *EclscS*. Es importante no excederse en la concentración final de Fe<sup>2+</sup> ya que éste inhibe la acción de la *EclscS* (Wu et al., 2008). Asimismo, el exceso de RSH puede servir como andamiaje para la formación de compuestos de hierro que no incluyan a la *Grx* (ver texto en la sección correspondiente), por lo cual su concentración también debe mantenerse dentro de los márgenes propuestos. Por último, es importante realizar varios controles en paralelo y de manera idéntica al experimento, siendo “-*Grx*” (ausencia de proteína “scaffold”), “-Fe<sup>2+</sup>” (ausencia de hierro) o “-*Eclsc*” (ausencia de sulfuro) los más frecuentes, pero no los únicos. Para realizar el análisis espectroscópico de los holocompuestos formados por esta técnica es imperioso remover los componentes de bajo peso molecular de la reacción de reconstitución ya sea por filtración o cambio de buffer, debido a que varios de ellos -o sus productos de reacción- son coloreados y pueden introducir error en el análisis de los espectros.

## 8.9. Determinación del pKa de cisteínas

La determinación del pKa de las cisteína de las diferentes proteínas estudiadas se realizó en colaboración con el Dr. Gerardo Ferrer-Sueta (Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República) mediante un procedimiento desarrollado en colaboración con su grupo (Sardi et al., 2013) basado en la reacción de alquilación de tioles por monobromobimano (Kosower and Kosower, 1995; Kosower et al., 1979). La reacción de alquilación se da entre la forma desprotonada del tiol (tiolato, (Ferrer-Sueta et al., 2011)) y el monobromobimano (mBBr), determinando que la velocidad de esta reacción posea una marcada dependencia con el pH. El reactivo alquilante absorbe en el visible ( $\epsilon_{396\text{ nm}} = 5.300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) pero no es fluorescente, mientras que el producto si lo es (mB-SR,  $\lambda_{\text{max}} = 385\text{-}390\text{ nm}$  y  $\epsilon = 4000\text{-}5300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , dependiendo de la naturaleza del tiol) con un máximo de emisión  $\sim 482\text{ nm}$  (Sardi et al., 2013). Sumado a esto, y dado que existe solapamiento entre la emisión de algunos triptófanos proteicos (W) y el espectro de absorción de mB-SR, es posible seguir esta reacción no solo en forma directa sino también por transferencia de energía por resonancia (FRET) entre W y mB-SR ( $\lambda_{\text{exc}}=295\text{ nm}/\lambda_{\text{em}}=482\text{ nm}$ ). Por lo tanto, la velocidad de reacción para los tioles proteicos se determina siguiendo la aparición de fluorescencia a 482 nm y/o la desaparición de la fluorescencia intrínseca a 340 nm a diferentes pH para condiciones controladas de temperatura y fuerza iónica (ver adelante). Si bien los detalles de cada experimento se indican en las sección correspondiente, en términos generales el procedimiento fue el siguiente: *i*) la proteína a estudiar ( $\sim 30\text{-}50\text{ }\mu\text{M}$ ) se reduce con un exceso de DTT de 2 veces en relación molar durante 30 min a RT, *ii*) mediante un paso de cromatografía en columna PD10 se

remueve el exceso de reductor y equilibra la proteína en amortiguador 2X-TMA pH 7.0 (ver a continuación), *iii*) la proteína y los tioles libres se cuantifican según se indicó previamente, *iv*) se colocan un volumen fijo de proteína considerando una concentración final de 2-4  $\mu\text{M}$  en una placa de 384 pocillos para fluorescencia (Fluotrack, Greiner BioOne), ocupando la mitad del volumen de reacción final, *v*) se completa parte del volumen restante con mezclas de agua y soluciones diluídas ( $\sim 15 \text{ mM}$ ) de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio base y se coloca la placa en el equipo para proceder a la termostatación (10 min), *vi*) la reacción se dispara con el agregado de 1-5  $\mu\text{M}$  (concentración final) de mBBr disuelto en agua usando el sistema de inyección automático del Varioskan y *vii*) los cambios temporales de fluorescencia se registran para 12-16 condiciones de pH por cuatruplicado a temperatura controlada de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . El mBBr se prepara en acetonitrilo a 10 mM y almacena a  $-20^\circ\text{C}$ . La solución de trabajo se prepara por dilución en agua a una concentración final de 10-20  $\mu\text{M}$  inmediatamente previo a su uso. El amortiguador de 3 componentes TMA (Ellis and Morrison, 1982) está compuesto por Tris 15 mM, MES 7.5 mM y ácido acético 7.5 mM con 135 mM NaCl pH 7.0 y se prepara al doble de su concentración de trabajo (2X). Su dilución con agua o soluciones diluidas de ácido o base permiten obtener un amortiguador eficiente entre pH 2.5 y 9.5 manteniendo una fuerza iónica constante de 0.15 M a lo largo de todo el intervalo de pH. En los experimentos con proteínas, el valor de pH exacto en cada condición es determinado luego del experimento mediante microelectrodos (Orion, EUA) acoplado a un potenciómetro de igual marca y calibrado a la misma temperatura del experimento con soluciones de pH conocido (Sigma-Aldrich). Para el procesamiento de los datos se asume que la pendiente inicial de los gráficos de intensidad de emisión a 340 o 482 nm en función del tiempo es proporcional a la velocidad inicial ( $v_0$ ) de la reacción, la cual depende linealmente de la disponibilidad de tiolato a cada pH. En consecuencia, las curvas de  $v_0$  en función de pH pueden ajustarse a ecuaciones de ionización más adecuadas para 1, 2 o 3 componentes mediante Origin (Sardi et al., 2013). Para convertir los valores de pendiente en valores absolutos de constante de reacción se determinó el valor de la constante bimolecular de reacción ( $k_2$ ) entre mBBr y la proteína de interés a pH 5.0 y 8.0 en condiciones de pseudoprimer orden (1-2  $\mu\text{M}$  proteína reducida vs. 20-200  $\mu\text{M}$  mBBr a partir de los gráficos secundarios de  $k_{obs}$  vs  $[\text{mBBr}]$ . Las curvas de intensidad de fluorescencia vs. tiempo ( $t$ ) se ajustaron a una ecuación de primer orden que también incluye un término lineal para dar cuenta de lenta descomposición básica de fluoróforo a los pH indicados

$$RFU = (RFU_0 - RFU_\infty) \times e^{-k_{obs}t} + RFU_\infty - bt$$

donde RFU es la intensidad de fluorescencia medida,  $k_{obs}$  es la constante de pseudo-primer orden de la reacción y  $b$  es la pendiente de la desaparición catalizada por  $\text{OH}^-$ , determinada en (Sardi et al., 2013). Uno de los controles necesarios es determinar si el pH afecta la absorción o fluorescencia de la proteína alquilada. Esto lo realizamos para Tb1-C-Grx1FL WT sin etiqueta de afinidad. Para ello, la proteína (30  $\mu\text{M}$ ) se redujo con DTT (exceso molar 2-5X) durante 1 hr a TA, el reductor se removió usando una HiTrap® acoplada a sistema ÄKTA y equilibrada en amortiguador TMA 1X pH 8.0. Los tioles libres post-SEC se cuantificaron con DTDPy, como se indicó y la proteína reducida se trató con mBBr en exceso molar 10X

sobre la concentración de tioles libres medidos durante 5 min a TA e inmediatamente se aplicó la muestra a la columna HiTrap® re-equilibrada en amortiguador TMA 1X pH 8.0 para recuperar la proteína alquilada y libre del exceso de reductor y alquilante. En estas condiciones experimentales se da mayoritariamente la alquilación de C181 y no se altera la conformación en solución de la proteína, lo cual fue determinado por MALDI-TOF MS y SEC, respectivamente (ver texto). La proteína monoalquilada se coloca a 0.6  $\mu$ M (placa) o 2  $\mu$ M (cubeta) final en amortiguador TMA pH 2.1 - 9.7 (16 condiciones, n=4) con 100  $\mu$ M DTPA y 500  $\mu$ M DTT y el espectro de emisión directa o vía FRET es registrado en el lector de placas Varioskan o espectrofluorímetro. A modo de control se toman los espectros de emisión de fluorescencia del amortiguador o de la misma cantidad de proteína *sin marcar* en 4 puntos de pH. Análogamente, para observar el efecto del pH en la estabilidad de la proteína se registró el espectro de absorción (250-500 nm) de 20  $\mu$ M Tb1-C-Grx1 monoalquilada luego de incubar la proteína 90 mins en el pH indicado, sustrayendo la absorción de amortiguador a pH 7,0 como control.

## 8.10. Cultivo de parásitos y caracterización de líneas transgénicas

La forma sanguínea (BSF, por "bloodstream form") de *T. brucei* cepa Lister 427 (línea parental 514-1313, denominada de ahora en más "TbWT") fue cultivada en medio HMI-9 (medio comercial IMDM con 136 mg/L hipoxantina, 28 mg/L bactocupreina, 39 mg/L timidina, 15 mg/L  $\beta$ -mercapoetanol, 182 mg/L cisteína y 3.020 mg/L NaHCO<sub>3</sub>) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos fleomicina (0.2  $\mu$ g/mL), gentamicina (2.5  $\mu$ g/mL) y, en el caso de las líneas transfectadas, higromicina B (5  $\mu$ g/mL). Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C con 5 % CO<sub>2</sub> y humedad controlada. La forma procíclica (PCF, por "procyclic form", línea celular 449) fue cultivada según (Comini et al., 2008). La preparación de la línea celular portadora de una copia ectópica inducible por tetraciclina (tet) de la forma silvestre de 1-C-Grx1 (línea "TbGrx1") fue descrita previamente (Comini et al., 2008) y las líneas sobrepresantes de las formas mutantes C104S (línea "TbC104S") y C181S (línea "TbC181S") fueron producidas por M.A. Comini y J. Rettig (Rettig, 2007). Para la producción de las líneas transgénicas 3 x 10<sup>7</sup> células de la línea parental 514-1313 fueron electroporadas con ~10  $\mu$ g del vector pH1700-Tb1-C-Grx1C104S(C181S)-*c-myc*<sub>2</sub> previamente linealizado con la enzima de restricción NotI. La electroporación y posterior selección con higromicina B se realizó como se indica en (Comini et al., 2008), según el siguiente protocolo: 2 x 10<sup>7</sup> parásitos BSF fueron cosechados por centrifugación (10 min a 2000 g, TA) y las células fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de la solución "human T cell nucleofector" disponible con el kit correspondiente de Amaxa™ Nucleofector (Lonza, Suiza) y mezcladas con 30  $\mu$ L de plásmido linealizado, previamente precipitado con etanol puro, secado por evaporación en condiciones estériles y resuspendido en un mínimo volumen de agua bidestilada estéril. La electroporación se realizó con el sistema Amaxa Nucleofector con el programa X-001. La recuperación y selección de clones se realizó de acuerdo a (Comini et al., 2004, 2008). La expresión regulada e inducible por (oxy)tetraciclina de la copia ectópica fue evaluada mediante Western-blot (WB, ver más adelante) usando anticuerpos contra la

etiqueta de afinidad (*c-myc*) o contra la proteína recombinante luego del agregado de 1 ó 10 µg/ml de tet u oxitet, respectivamente, al medio correspondiente durante diferentes tiempos (1-20 días). Análogamente, se generaron líneas transgénicas para sobreexpresión de 1-C-Grx2 (línea "TbGrx2"). Para ello, el gen fue clonado en el vector pHD1700 como se indicó anteriormente, el vector linealizado con *NotI* y la transfección y selección se realizó como se indica más arriba. La expresión regulada e inducible por tet de la copia ectópica fue evaluada por WB luego del agregado de 1 µg/ml tet o 10 µg/ml oxytet al medio de cultivo durante 24 hrs.

## **8.11. Análisis fenotípico de las formas infectivas de *T. brucei* sobreexpresantes de diferentes versiones de 1-C-Grx1**

### **8.11.1. Cultivo, recuento manual y cosecha**

El crecimiento en condiciones de cultivo celular de la línea parental (*TbWT*) y las 3 líneas transfectadas (*TbGrx1*, *TbC104S* y *TbC181S*) fue evaluado inoculando los parásitos en medio HMI-9 a una densidad celular fija (típicamente  $10^3$ - $10^5$  células/mL) con o sin el agregado de 1 µg/mL tet o 10 µg/mL oxytet. Se realizaron cultivos tanto en botellas de cultivo (Corning) como en placas de 6, 12 o 24 pocillos (Greiner). La densidad celular fue evaluada cada 24-72 hrs mediante recuento manual en cámara de Neubauer, contándose 16 campos para cada hemicámara y tomando como criterio de aceptación una diferencia máxima de 10% entre ambas hemicámaras. Se realizaron cultivos continuos a partir de inóculos de baja densidad celular o cultivos con resiembra durante períodos prolongados. En todos los casos, los experimentos se realizaron con 1 réplica biológica como mínimo. En los experimentos de inducción el antibiótico usado (tet u oxitet) fue agregado diariamente a la dosis final adecuada o cada dos días al doble de la dosis final y la expresión de la proteína se verificó por WB (ver próxima sección). La cosecha de las células se realizó por centrifugación a 2000 g durante 10 min a TA. El pellet celular se lavó 2 veces con un volumen de amortiguador fosfato salino (PBS) con 1% (p/v) de glucosa (PBS-G) equivalente al volumen inicial de cultivo, centrifugando en iguales condiciones entre lavados.

### **8.11.2. Recuento por citometría de flujo**

Para la evaluación del efecto de ciertos tratamientos (ver más adelante) sobre la proliferación de los parásitos en cultivo por citometría de flujo se utilizó un método desarrollado en nuestro laboratorio (Demoro et al., 2012). Para ello, inmediatamente antes de realizar la adquisición se tomaron 100 µL de cultivos de cada pocillo y se adicionan 100 µL de PBS-G filtrado a 0.22 µm así como un volumen adecuado de perlas fluorescentemente para recuento (Count Brigh<sup>TM</sup>, Invitrogen) para lograr una densidad final de 10 perlas/µL. Se agregó además yoduro de propidio (IP, preparado stock a 1 mg/mL en agua) a una concentración final de ~2µg/mL inmediatamente antes de la medición. La suspensión se

homogeneizó por vortex y se analizó en el flujo en citómetro Cyan ADP Flow-cytometer (Dako, EUA). El protocolo de adquisición del citómetro se ajusta de manera tal que se registren 200 eventos en el canal de fluorescencia correspondiente a las perlas marcadas ( $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$ , canal "verde") en simultáneo con la adquisición de los datos de dispersión de luz en las direcciones reversa ("back scattering") y directa ("forward scattering") en la región asignada como correspondientes a las células del parásito (ver a continuación). En base a un experimento "control" con parásitos en fase exponencial y densidad celular conocida determinada por recuento manual se ajustaron los marcos ("gates") de la región de interés así como los parámetros de adquisición. El número de eventos en este marco se relaciona directamente a la densidad celular a través del volumen que los contenía, determinado a partir de las perlas fluorescentes homogéneamente distribuidas en la suspensión celular. La fluorescencia del IP se utiliza como indicador de células senescentes o muertas y se registra en simultáneo en el canal correspondiente. Los resultados se analizan con el programa Summit v4.3 (Dako) incluido en el paquete del citómetro.

### **8.11.3. Tratamientos sobre células en cultivo**

El efecto del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o el quelante de hierro deferoxamina (DFX) sobre el crecimiento y/o la viabilidad de las líneas celulares en cultivos fue analizado por un protocolo adaptado de (Comini et al., 2008). Las líneas celulares fueron cultivadas por 24 hr a  $1 \times 10^5 \text{ cell/mL}$  en presencia o ausencia (control negativo) del inductor, contadas manualmente en cámara de Neubauer al cumplir este tiempo y sembradas a  $1 \times 10^5$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , preparado 4 mM en PBS estéril) o  $5 \times 10^5$  (DFX, preparada 10 mM en PBS estéril) células/mL en placas de 6 o 24 pocillos, en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DFX o PBS (control). El efecto de los tratamientos fue evaluado a las 24 hr mediante inspección por microscopía y recuento por citometría. Para los experimentos de cambio de suero las líneas celulares fueron inoculadas a  $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$  y crecidas 24 hr en presencia o ausencia de  $10 \mu\text{g/mL}$  oxitet. Cumplido este tiempo, fueron cosechadas por centrifugación a 2000 g durante 10 min a TA y lavadas 2 veces con un volumen de PBS-G equivalente al volumen de cultivo original y resembradas medio HMI-9 suplementado los mismos antibiótico pero con 10 % de suero de caballo o 10 % suero de ratón. El efecto del cambio de suero sobre la proliferación fue evaluado a las 24 hr mediante inspección por microscopía y recuento por citometría.

### **8.11.4. Consumo de glucosa**

El consumo de glucosa por las líneas (inducidas o no inducidas) fue analizado mediante el analizador automático YSI 2300 STAT Plus (UBC-IPM) directamente en el medio de cultivo obtenido luego de separar las células por centrifugación a 2000 g durante 10 min a RT. Los sobrenadantes fueron almacenados congelados hasta su análisis en simultáneo.

## 8.12. Western blot e inmunofluorescencia

Los cultivos de densidad celular conocida se cosecharon y lavaron como se indicó, conservando el menor volumen posible de líquido. El pellet celular se lisó en PBS con Tritón X-100 0.5 % (v/v) (PBS-X) a TA, agitando vigorosamente durante 30 sec. El volumen de PBS-X agregado se calculó de manera de conservar una densidad celular final de  $5 \times 10^5$  células/ $\mu$ L. Para controlar este procedimiento se determinó la concentraciones de proteínas por BCA en cultivos de igual densidad celular, obteniéndose resultados con una diferencia  $\leq 20\%$ . Los lisados celulares resuspendidos se prepararon para electroforesis según se indicó, usando SB con o sin reductor y se resolvieron en SDS-PAGE de 12-15% de entrecruzamiento. Generalmente, se cargaron  $1-8 \times 10^6$  células por carril, los geles se corrieron a 40 mA y fueron posteriormente electrotransferidos (200-400 mA durante 1 hr en baño de hielo) a membranas de PVDF (GE) y las membranas fueron bloqueadas en PBS con Tween-20 al 0.2% (v/v) (PBS-T) con 5 % (p/v) de leche en polvo descremada (PBS-TL) en cámara fría ON con agitación orbital a 90 rpm. Para la inmunodetección de las bandas se utilizaron anticuerpos policlonales realizados por nuestro grupo, a saber: anticuerpo contra *Tb1-C-Grx1* y *Tb1-C-Grx2* realizados en cobayo (Comini et al., 2008) anticuerpo contra *TbTXN* realizado en conejo (Comini et al., 2007) o anticuerpo contra *Tc1-C-Grx1* generado en ratón en nuestro grupo, según se detalla en (Fleitas, 2012). También se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-*c-myc* (clon 9E10, Roche, Alemania). En todos los casos los anticuerpos primarios se incubaron en PBS-TL a TA durante 1-2 hr con agitación orbital a 90 rpm y los lavados se realizaron con PBS-T (3 veces, 5 min, 300 rpm). Luego de ajustar las condiciones para nuestros experimentos, los anticuerpos para WB se usaron a una dilución de 1:500 (v/v) para  $\alpha$ -*Tb1-C-Grx1*, 1:200 para  $\alpha$ -*Tb1-C-Grx2*, 1:400 para  $\alpha$ -*Tc1-C-Grx1*, 1:2000 para  $\alpha$ -*TbTXN* y 1:400 para  $\alpha$ -*c-myc*, salvo excepciones. Los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) fueron adquiridos en GE (anti-conejo y anti-ratón) o Invitrogen (anti-cobayo) e incubados durante una hora en PBS-TL análogamente a los primarios, generalmente a una dilución de 1:8000 - 1:10000. Las bandas inmunoreactivas se revelaron por quimioluminiscencia mediante el reactivo ECL (GE) y detección con placa fotográfica (Hyperfilm, GE) por revelado manual o usando máquina reveladora automática HyperProcessor (GE). Para volver a revelar membranas ya bloqueadas y tratadas con anticuerpos, los mismos fueron removidos por "stripping" incubando la membrana durante 30 min en amortiguador Tris 62.5 mM pH 6.8 con 2% (p/v) SDS y 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol a 55°C. Las membranas tratadas fueron lavadas en PBS-T y rebloqueadas en PBS-TL ON previo a su reutilización. Cuando fuera necesario, los WB se digitalizaron (Scanner SnapScan 1236, Agfa, Alemania) y se cuantificaron por análisis densitométrico en ImageJ. Para el marcado de la mitocondria para su detección por inmunofluorescencia se utilizó el fluoróforo MitoTracker® RedCM-H<sub>2</sub>XRos (Molecular Probes, Invitrogen). Los parásitos ( $1 \times 10^7$  células) se cosecharon por centrifugación a 2000 g por 10 min a TA y se incubaron a 25 min a 37°C con 10 mL de medio fresco conteniendo 0.25  $\mu$ M del fluoróforo. Cumplido este tiempo se peletearon y lavaron 2 veces con PBS previo a ser fijados en 4 % (p/v) de paraformaldeído por 18 min a TA. Las células fijadas, ya sea pretratadas con MitoTracker® o no, fueron procesados para inmunofluorescencia esencialmente como se describe en (Comini et al., 2008), incubándolos 1 h con  $\alpha$ -*Tb1-C-Grx1* (1:500),  $\alpha$ -*Tb1-C-Grx2* (1:250)  $\alpha$ -*c-myc* monoclonal (1:250). Como

anticuerpos secundarios se utilizaron IgG de cabra anti-cobayo o anti-ratón marcadas con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) a una dilución de 1:1000. Los ácidos nucleicos fueron teñidos con los colorantes TOPRO o DAPI (Molecular Probes, Invitrogen), usado según instrucciones del fabricante. Los parásitos se visualizaron en el microscopio confocal Leica TC5 SP5 de UBC-IP o microscopio Carl Zeiss Axiovert 200 M equipado con una cámara digital AxioCam MRm (BHZ, Universidad de Heidelberg).

### 8.13. Infección de animales de laboratorio

Para los experimentos de infecciones se trabajó con hembras de la cepa BALBc/J de 6-8 semanas de edad las cuales fueron mantenidas en las instalaciones de UATE en cajas ventiladas con presión negativa de aire (Sealsafe rack, Tecniplast, Italia) en ambiente de temperatura ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad (40-60%) controladas, con agua y alimento *ad libitum*, en condiciones “libres de patógenos específicos” (SPF) con ciclos de día/noche de 14/10 horas. Los procedimientos experimentales se realizaron acorde a la reglamentación nacional (Ley 18611) y las normas de la “Federation of European Laboratory Animal Science Associations” (FELASA) y fueron previamente aprobados por la Comisión de Salud Animal del Institut Pasteur de Montevideo (N° de registro: 004-11 y 004-12). La salud de los animales y su sobrevivencia fue monitoreada diariamente por personal de la UATE y de nuestro laboratorio, mientras que la parasitemia fue evaluada regularmente por recuento manual (ver a continuación). Los animales que presentaran síntomas de dolor, salud muy deteriorada o niveles de parasitemia  $\geq 10^8$  células/mL fueron inmediatamente eutanasiados por dislocación cervical o cámara de  $\text{CO}_2$ . La infectividad de cada una de las líneas celulares (línea parental 514-1313, “TbWT”, y versiones transgénicas poseedoras de copias ectópicas inducibles “TbGrx1”, “TbC104S” y “TbC1815”) se estudió inoculando ratones intraperitonealmente con  $10^4$  parásitos provenientes de cultivos en fase exponencial, en un volumen de 0.3 mL de PBS o HMI-9, en condiciones estériles. Se trabajó con 2 grupos (n=6), uno de los cuales (+T) recibió agua *ad libitum* con 1 mg/mL de oxitet desde 3 días antes de la infección y con reposición cada 48 hr. La inducción *in vivo* de la proteína de interés fue validada usando parásitos transfectados con una versión modificada la proteína verde fluorescente clonada en el mismo vector (pHD1700-Grx2-GFP, Sardi y Comini, no publicado). Bajo las mismas condiciones de infección e inducción fue posible identificar la expresión de esta proteína por microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo en parásitos aislados de la sangre de los ratones infectados en los días 6 y 10, mientras que no se observa en los animales que no recibieron oxitet. Asimismo, en los experimentos de infección con TbGrx1 y TbC104S se realizó la purificación de parásitos de sangre con altos niveles de parasitemia mediante cromatografía de intercambio aniónico DEAE según (Lanham and Godfrey, 1970) con ligeras modificaciones (Medeiros, no publicado). Estos parásitos fueron preparados para inmunofluorescencias y WB, como se detalló más arriba, para identificar la sobreexpresión *in vivo* de la proteína de interés. El recuento de parásitos en sangre se realizó a partir de  $\sim 50$   $\mu\text{L}$  de sangre obtenida por punción del seno submandibular directamente en tubos con EDTA tripotasio (3K-EDTA, preparado por dilución de 70  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_3\text{-EDTA}$  comercial en PBS con 2 mM EDTA (PBS-E) hasta un volumen final de 1 mL) en una relación 1:7 de

anticoagulante:sangre. Previo al recuento en cámara de Neubauer la sangre anticoagulada se homogeniza por agitación suave y se diluye 20 veces en amortiguador de lisis de eritrocitos (preparado en agua como stock 10X, detallado como 0.8% (g/v)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.084% (g/v)  $\text{NaHCO}_3$  y 0.038% (g/v)  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , y filtrado a 0.22  $\mu\text{m}$ ), como se detalla en (Roldán et al., 2011). El efecto de la infección y el tratamiento sobre los reticulocitos fue evaluado al día 12 por citometría como en (Roldán et al., 2011). Para ello, 10  $\mu\text{L}$  de sangre extraída en condiciones de anticoagulación fueron diluídos hasta un volumen final de 100 o 200  $\mu\text{L}$  en PBS-E en placa de cultivo y luego se agregó el mismo volumen de tiazolorange preparado a 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en PBS-E. La solución se homogeneizó e incubó 30 min en oscuridad previo a ser medida por citometría con el laser de 488 nm. Generalmente se agregan perlas fluorescentes (Count Brigh<sup>TM</sup>, Invitrogen) previo al recuento para permitir la normalización de los resultados por número de células. Los resultados de modelos animales de infección se presentan como gráficos de supervivencia de Kaplan–Meier. La comparación estadística de los grupos se realizó mediante el test Long-rank (o Mantel-Cox) aplicado en el programa MedCalc.

## Referencias

- Abdulla, M.-H., O'Brien, T., Mackey, Z.B., Sajid, M., Grab, D.J., and McKerrow, J.H. (2008). RNA interference of *Trypanosoma brucei* cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e298.
- Abu-Elneel, K., Robinson, D.R., Drew, M.E., Englund, P.T., and Shlomai, J. (2001). Intramitochondrial localization of universal minicircle sequence-binding protein, a trypanosomatid protein that binds kinetoplast minicircle replication origins. *J. Cell Biol.* 153, 725–734.
- Acestor, N., Panigrahi, A.K., Ogata, Y., Anupama, A., and Stuart, K.D. (2009). Protein composition of *Trypanosoma brucei* mitochondrial membranes. *Proteomics* 9, 5497–5508.
- Achebach, S., Tran, Q.H., Vlamis-Gardikas, A., Müllner, M., Holmgren, A., and Udden, G. (2004). Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3 in vitro. *FEBS Lett.* 565, 203–206.
- Adak, S., and Pal, S. (2012). Ascorbate Peroxidase Acts As a Novel Determiner of Redox Homeostasis in *Leishmania*. *Antioxid. Redox Signal.*
- Adimora, N.J., Jones, D.P., and Kemp, M.L. (2010). A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 731–743.
- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., et al. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* 56, 684–689.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., et al. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.
- Ahmadinejad, N., Dagan, T., and Martin, W. (2007). Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. *Gene* 402, 35–39.
- Alfonzo, J.D., and Lukeš, J. (2011). Assembling Fe/S-clusters and modifying tRNAs: ancient co-factors meet ancient adaptors. *Trends Parasitol.* 27, 235–238.
- Alibu, V.P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., and Horn, D. (2005). A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139, 75–82.
- Alloatti, A., Gupta, S., Gualdrón-López, M., Igoillo-Esteve, M., Nguewa, P.A., Deumer, G., Wallemacq, P., Altabe, S.G., Michels, P.A.M., and Uttaro, A.D. (2010). Genetic and Chemical Evaluation of *Trypanosoma brucei* Oleate Desaturase as a Candidate Drug Target. *PLoS ONE* 5, e14239.
- Alon, A., Grossman, I., Gat, Y., Kodali, V.K., DiMaio, F., Mehlman, T., Haran, G., Baker, D., Thorpe, C., and Fass, D. (2012). The dynamic disulphide relay of quiescin sulphydryl oxidase. *Nature* 488, 414–418.
- Alphey, M.S., Bond, C.S., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., and Hunter, W.N. (2000). The structure of reduced tryparedoxin peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol.* 300, 903–916.
- Alphey, M.S., Gabrielsen, M., Micossi, E., Leonard, G.A., McSweeney, S.M., Ravelli, R.B.G., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., Bond, C.S., and Hunter, W.N. (2003). Tryparedoxins from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei*: photoreduction of the redox disulfide using synchrotron radiation and evidence for a conformational switch implicated in function. *J. Biol. Chem.* 278, 25919–25925.
- Alphey, M.S., König, J., and Fairlamb, A.H. (2008). Structural and mechanistic insights into type II trypanosomatid tryparedoxin-dependent peroxidases. *Biochem. J.* 414, 375–381.
- Alsford, S., Turner, D.J., Obado, S.O., Sanchez-Flores, A., Glover, L., Berriman, M., Hertz-Fowler, C., and Horn, D. (2011). High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* 21, 915–924.
- Alves, R., Herrero, E., and Sorribas, A. (2004). Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism. II. Role of glutaredoxin Grx5. *Proteins* 57, 481–492.
- Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (2009). Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins. *BMC Evol. Biol.* 9, 66.
- Ansorge, I., Steverding, D., Melville, S., Hartmann, C., and Clayton, C. (1999). Transcription of “inactive” expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptor RNAs in bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 101, 81–94.
- Antelmann, H., and Hamilton, C.J. (2012). Bacterial mechanisms of reversible protein S-thiolation: structural and mechanistic insights into mycoredoxins. *Mol. Microbiol.*
- Antoine-Moussiaux, N., Magez, S., and Desmecht, D. (2008). Contributions of experimental mouse models to the understanding of African trypanosomiasis. *Trends Parasitol.* 24, 411–418.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., et al. (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 32, D115–D119.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Arias, D.G., Cabeza, M.S., Erben, E.D., Carranza, P.G., Lujan, H.D., Téllez Iñón, M.T., Iglesias, A.A., and Guerrero, S.A. (2011). Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 37–46.
- Arias, D.G., Marquez, V.E., Chiribao, M.L., Gadelha, F.R., Robello, C., Iglesias, A.A., and Guerrero, S.A. (2013). Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radic. Biol. Med.* 63C, 65–77.
- Ariyanayagam, M.R., and Fairlamb, A.H. (1999). *Entamoeba histolytica* lacks trypanothione metabolism. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 61–69.
- Ariyanayagam, M.R., and Fairlamb, A.H. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115, 189–198.
- Askelöf, P., Axelsson, K., Eriksson, S., and Mannervik, B. (1974). Mechanism of action of enzymes catalyzing thiol-disulfide

- interchange. Thioltransferases rather than transhydrogenases. *FEBS Lett.* 38, 263–267.
- Atkinson, H.J., and Babbitt, P.C. (2009a). An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000541.
- Atkinson, H.J., and Babbitt, P.C. (2009b). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 11108–11116.
- Balk, J., and Pilon, M. (2011). Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.* 16, 218–226.
- Balmer, O., Beadell, J.S., Gibson, W., and Caccone, A. (2011). Phylogeography and taxonomy of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e961.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Manieri, W., Schürmann, P., Droux, M., et al. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2642–2647.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K., et al. (2008). Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J.* 27, 1122–1133.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., and Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* 362, 1469–1480.
- Barrett, M.P., Vincent, I.M., Burchmore, R.J.S., Kazibwe, A.J.N., and Matovu, E. (2011). Drug resistance in human African trypanosomiasis. *Future Microbiol* 6, 1037–1047.
- Basu, S., Leonard, J.C., Desai, N., Mavridou, D.A.I., Tang, K.H., Goddard, A.D., Ginger, M.L., Lukeš, J., and Allen, J.W.A. (2013). Divergence of Erv1-associated mitochondrial import and export pathways in trypanosomes and anaerobic protists. *Eukaryot. Cell* 12, 343–355.
- Batista, J.S., Oliveira, A.F., Rodrigues, C.M.F., Damasceno, C.A.R., Oliveira, I.R.S., Alves, H.M., Paiva, E.S., Brito, P.D., Medeiros, J.M.F., Rodrigues, A.C., et al. (2009). Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: from acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Vet. Parasitol.* 165, 131–135.
- Batista, J.S., Riet-Correa, F., Teixeira, M.M.G., Madruga, C.R., Simões, S.D.V., and Maia, T.F. (2007). Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet. Parasitol.* 143, 174–181.
- Batista, J.S., Rodrigues, C.M.F., Olinda, R.G., Silva, T.M.F., Vale, R.G., Câmara, A.C.L., Rebouças, R.E.S., Bezerra, F.S.B., García, H.A., and Teixeira, M.M.G. (2012). Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. *Parasitol. Res.* 110, 73–80.
- Bedhomme, M., Adamo, M., Marchand, C.H., Couturier, J., Rouhier, N., Lemaire, S.D., Zaffagnini, M., and Trost, P. (2012). Glutathionylation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the model plant *Arabidopsis thaliana* is reversed by both glutaredoxins and thioredoxins in vitro. *Biochem. J.* 445, 337–347.
- Beinert, H., Holm, R.H., and Münck, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653–659.
- Bellí, G., Molina, M.M., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E., and Herrero, E. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J. Biol. Chem.* 279, 12386–12395.
- Bellí, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M.A., Rodríguez-Manzanares, M.T., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J. Biol. Chem.* 277, 37590–37596.
- Ben Beard, C. (2009). Forgotten People, Forgotten Diseases: The Neglected Tropical Diseases and Their Impact on Global Health and Development. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 511–511.
- Benesch, R., and Benesch, R.E. (1958). Thiolation of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44, 848–853.
- Berjanskii, M.V., and Wishart, D.S. (2005). A Simple Method To Predict Protein Flexibility Using Secondary Chemical Shifts. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14970–14971.
- Bern, C., and Montgomery, S.P. (2009). An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 49, e52–e54.
- Bernadó, P., García de la Torre, J., and Pons, M. (2002). Interpretation of 15N NMR relaxation data of globular proteins using hydrodynamic calculations with HYDRONMR. *J. Biomol. NMR* 23, 139–150.
- Berndt, C., Hudemann, C., Hanschmann, E.-M., Axelsson, R., Holmgren, A., and Lillig, C.H. (2007). How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid. Redox Signal.* 9, 151–157.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., et al. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416–422.
- Bertini, I., Case, D.A., Ferella, L., Giachetti, A., and Rosato, A. (2011). A Grid-enabled web portal for NMR structure refinement with AMBER. *Bioinformatics* 27, 2384–2390.
- Bethony, J.M., Cole, R.N., Guo, X., Kamhawi, S., Lightowers, M.W., Loukas, A., Petri, W., Reed, S., Valenzuela, J.G., and Hotez, P.J. (2011). Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol. Rev.* 239, 237–270.
- Bethony, J.M., Cole, R.N., Guo, X., Kamhawi, S., Lightowers, M.W., Loukas, A., Petri, W., Reed, S., Valenzuela, J.G., and Hotez, P.J. (2011). Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol. Rev.* 239, 237–270.
- Bienen, E.J., Maturi, R.K., Pollakis, G., and Clarkson, A.B., Jr (1993). Non-cytochrome mediated mitochondrial ATP production in bloodstream form *Trypanosoma brucei brucei*. *Eur. J. Biochem.* 216, 75–80.
- Birk, J., Meyer, M., Aller, I., Hansen, H.G., Odermatt, A., Dick, T.P., Meyer, A.J., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Endoplasmic reticulum: Reduced and oxidized glutathione revisited. *J. Cell. Sci.*
- Björnberg, O., Østergaard, H., and Winther, J.R. (2006). Mechanistic insight provided by glutaredoxin within a fusion to redox-sensitive yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 45, 2362–2371.

- Blauuw, M., Knol, J.C., Kortholt, A., Roelofs, J., Ruchira, Postma, M., Visser, A.J.W.G., and Van Haastert, P.J.M. (2003). Phosducin-like proteins in *Dictyostelium discoideum*: implications for the phosducin family of proteins. *EMBO J.* 22, 5047–5057.
- Blackshields, G., Sievers, F., Shi, W., Wilm, A., and Higgins, D.G. (2010). Sequence embedding for fast construction of guide trees for multiple sequence alignment. *Algorithms Mol. Biol.* 5, 21.
- Blum, T., Briesemeister, S., and Kohlbacher, O. (2009). MultiLoc2: integrating phylogeny and Gene Ontology terms improves subcellular protein localization prediction. *BMC Bioinformatics* 10, 274.
- Bocedi, A., Dawood, K.F., Fabrini, R., Federici, G., Gradoni, L., Pedersen, J.Z., and Ricci, G. (2010). Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. *FASEB J.* 24, 1035–1042.
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T.L., Matten, W.T., McGinnis, S.D., Merezuk, Y., et al. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.*
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Ma, N., Madden, T.L., Matten, W.T., McGinnis, S.D., Merezuk, Y., et al. (2013). BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.*
- Boratyn, G.M., Schäffer, A.A., Agarwala, R., Altschul, S.F., Lipman, D.J., and Madden, T.L. (2012). Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. *Biol. Direct* 7, 12.
- Boutigny, S., Saini, A., Baidoo, E.E.K., Yeung, N., Keasling, J.D., and Butland, G. (2013). Physical and functional interactions of a monothiol glutaredoxin and an iron sulfur cluster carrier protein with the sulfur-donating radical S-adenosyl-L-methionine enzyme MiaB. *J. Biol. Chem.* 288, 14200–14211.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E.E., Docampo, R., Turrens, J.F., and Stoppani, A.O. (1980). Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188, 643–648.
- Bräutigam, L., Johansson, C., Kubsch, B., McDonough, M.A., Bill, E., Holmgren, A., and Berndt, C. (2013). An unusual mode of iron-sulfur-cluster coordination in a teleost glutaredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 491–496.
- Bräutigam, L., Schütte, L.D., Godoy, J.R., Prozorovski, T., Gellert, M., Hauptmann, G., Holmgren, A., Lillig, C.H., and Berndt, C. (2011). Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20532–20537.
- Breibach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R.L., and Steverding, D. (2002). Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int. J. Parasitol.* 32, 473–479.
- Bresell, A., Weinander, R., Lundqvist, G., Raza, H., Shimoji, M., Sun, T.-H., Balk, L., Wiklund, R., Eriksson, J., Jansson, C., et al. (2005). Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS J.* 272, 1688–1703.
- Bridges, D.J., Pitt, A.R., Hanrahan, O., Brennan, K., Voorheis, H.P., Herzyk, P., de Koning, H.P., and Burchmore, R.J.S. (2008). Characterisation of the plasma membrane subproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 8, 83–99.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., and Burri, C. (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375, 148–159.
- Brun, R., Don, R., Jacobs, R.T., Wang, M.Z., and Barrett, M.P. (2011). Development of novel drugs for human African trypanosomiasis. *Future Microbiol* 6, 677–691.
- Brun, R., Hecker, H., and Lun, Z.R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* 79, 95–107.
- Brun, R., Hecker, H., and Lun, Z.R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* 79, 95–107.
- Budde, H., Flohé, L., Hecht, H.-J., Hofmann, B., Stehr, M., Wissing, J., and Lünsdorf, H. (2003). Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol. Chem.* 384, 619–633.
- Bushweller, J.H., Billeter, M., Holmgren, A., and Wüthrich, K. (1994). The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin(C14S) and glutathione. *J. Mol. Biol.* 235, 1585–1597.
- Butter, F., Bucerius, F., Michel, M., Cicova, Z., Mann, M., and Janzen, C.J. (2013). Comparative Proteomics of Two Life Cycle Stages of Stable Isotope-labeled *Trypanosoma brucei* Reveals Novel Components of the Parasite's Host Adaptation Machinery. *Mol Cell Proteomics* 12, 172–179.
- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110, 1353–1358.
- Camaschella, C., Campanella, A., De Falco, L., Boschetto, L., Merlini, R., Silvestri, L., Levi, S., and Iolascon, A. (2007). The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110, 1353–1358.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C.M., Besteiro, S., et al. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207–212.
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., and Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9745–9749.
- Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., and Tomás, A.M. (2002a). Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1563–1574.
- Castro, H., Romao, S., Carvalho, S., Teixeira, F., Sousa, C., and Tomás, A.M. (2010). Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity. *PLoS ONE* 5, e12607.
- Castro, H., Romao, S., Carvalho, S., Teixeira, F., Sousa, C., and Tomás, A.M. (2010). Mitochondrial redox metabolism in trypanosomatids is independent of tryparedoxin activity. *PLoS ONE* 5, e12607.

- Castro, H., Romao, S., Gadelha, F.R., and Tomás, A.M. (2008). Leishmania infantum: provision of reducing equivalents to the mitochondrial trypanothione/trypanothione peroxidase system. *Exp. Parasitol.* 120, 421–423.
- Castro, H., Sousa, C., Novais, M., Santos, M., Budde, H., Cordeiro-da-Silva, A., Flohé, L., and Tomás, A.M. (2004). Two linked genes of Leishmania infantum encode trypanothione localised to cytosol and mitochondrion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136, 137–147.
- Castro, H., Sousa, C., Santos, M., Cordeiro-da-Silva, A., Flohé, L., and Tomás, A.M. (2002b). Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in Leishmania infantum. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1552–1562.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 297–354.
- Cavalier-Smith, T. (2012). Early evolution of eukaryote feeding modes, cell structural diversity, and classification of the protozoan phyla Loukozoa, Sulcozoa, and Choanozoa. *Eur. J. Protistol.*
- Cavalli, A., and Bolognesi, M.L. (2009). Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against Trypanosoma and Leishmania. *J. Med. Chem.* 52, 7339–7359.
- Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R.L. (2010). The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism. *J. Biol. Chem.* 285, 35224–35237.
- Chakrabarti, A., Srivastava, S., Swaminathan, C.P., Surolia, A., and Varadarajan, R. (1999). Thermodynamics of replacing an alpha-helical Pro residue in the P40S mutant of Escherichia coli thioredoxin. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 2455–2459.
- Changmai, P., Horáková, E., Long, S., Cernotíková-Stříbrná, E., McDonald, L.M., Bontempi, E.J., and Lukeš, J. (2013). Both human ferredoxins equally efficiently rescue ferredoxin deficiency in Trypanosoma brucei. *Mol. Microbiol.*
- Chaudhuri, M., Ott, R.D., and Hill, G.C. (2006). Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 22, 484–491.
- Chemes, L.B., Glavina, J., Faivovich, J., de Prat-Gay, G., and Sánchez, I.E. (2012). Evolution of linear motifs within the papillomavirus E7 oncoprotein. *J. Mol. Biol.* 422, 336–346.
- Chemes, L.B., Glavina, J., Faivovich, J., de Prat-Gay, G., and Sánchez, I.E. (2012). Evolution of linear motifs within the papillomavirus E7 oncoprotein. *J. Mol. Biol.* 422, 336–346.
- Cheng, N.-H. (2008). AtGRX4, an Arabidopsis chloroplastic monothiol glutaredoxin, is able to suppress yeast grx5 mutant phenotypes and respond to oxidative stress. *FEBS Lett* 582, 848–854.
- Cheng, N.-H., and Hirschi, K.D. (2003). Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1. *J. Biol. Chem.* 278, 6503–6509.
- Cheng, N.-H., Liu, J.-Z., Brock, A., Nelson, R.S., and Hirschi, K.D. (2006). AtGRXcp, an Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin, is critical for protection against protein oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 281, 26280–26288.
- Chi, B.K., Gronau, K., Mäder, U., Hessling, B., Becher, D., and Antelmann, H. (2011). S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in Bacillus subtilis as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 10, M111.009506.
- Chiang, B.-Y., Chen, T.-C., Pai, C.-H., Chou, C.-C., Chen, H.-H., Ko, T.-P., Hsu, W.-H., Chang, C.-Y., Wu, W.-F., Wang, A.H.-J., et al. (2010). Protein S-thiolation by Glutathionylspermidine (Gsp): the role of Escherichia coli Gsp synthetase/amidase in redox regulation. *J. Biol. Chem* 285, 25345–25353.
- Chibani, K., Couturier, J., Selles, B., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. (2010). The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosyn. Res.* 104, 75–99.
- Chibani, K., Wingsle, G., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., and Rouhier, N. (2009). Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on Populus trichocarpa. *Mol. Plant* 2, 308–322.
- Claes, F., Vodnala, S.K., van Reet, N., Boucher, N., Lunden-Miguel, H., Baltz, T., Goddeeris, B.M., Büscher, P., and Rottenberg, M.E. (2009). Bioluminescent Imaging of Trypanosoma brucei Shows Preferential Testis Dissemination Which May Hamper Drug Efficacy in Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e486.
- Clarkson, A.B., Jr, Bienen, E.J., Pollakis, G., and Grady, R.W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite Trypanosoma brucei brucei is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J. Biol. Chem.* 264, 17770–17776.
- Claros, M.G., and Vincens, P. (1996). Computational Method to Predict Mitochondrially Imported Proteins and their Targeting Sequences. *European Journal of Biochemistry* 241, 779–786.
- Collet, J.-F., and Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1205–1216.
- Collinson, E.J., and Grant, C.M. (2003). Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem* 278, 22492–22497.
- Collinson, E.J., and Grant, C.M. (2003). Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem* 278, 22492–22497.
- Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V., and Grant, C.M. (2002). The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem* 277, 16712–16717.
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J., and Flohé, L. (2005). Trypanothione synthesis in crithidia Crithidia revisited. *J. Biol. Chem.* 280, 6850–6860.
- Comini, M.A. and Flohé, L. (2012). The trypanothione-based redox metabolism of trypanosomatids. In *Drug Discovery in Trypanosomes and Leishmania*. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527670383.ch9/summary>
- Comini, M.A., Dirdjaja, N., Kaschel, M., and Krauth-Siegel, R.L. (2009). Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *Int. J. Parasitol.* 39, 1059–1062.
- Comini, M.A., Guerrero, S.A., Haile, S., Menge, U., Lünsdorf, H., and Flohé, L. (2004). Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1289–1302.

- Comini, M.A., Krauth-Siegel, R.L., and Bellanda, M. (2013). Mono- and Dithiol Glutaredoxins in the Trypanothione-Based Redox Metabolism of Pathogenic Trypanosomes. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 708–22.
- Comini, M.A., Krauth-Siegel, R.L., and Flohé, L. (2007). Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochem. J.* 402, 43–49.
- Comini, M.A., Medeiros, A., Manta, B. (2012). Stress response in *Trypanosoma brucei*, in "Stress Response in Microbiology" (2012). Ed. J.M. Requena, Horizon Scientific Press, Norwich-UK. ISBN 978-1-908230-04-1.
- Comini, M.A., Rettig, J., Dirdjaja, N., Hanschmann, E.-M., Berndt, C., and Krauth-Siegel, R.L. (2008). Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 283, 27785–27798.
- Copley, S.D., Novak, W.R.P., and Babbitt, P.C. (2004). Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 13981–13995.
- Couturier, J., Didierjean, C., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. (2010). Engineered mutated glutaredoxins mimicking peculiar plant class III glutaredoxins bind iron-sulfur centers and possess reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403, 435–441.
- Couturier, J., Jacquot, J.-P., and Rouhier, N. (2009). Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2539–2557.
- Couturier, J., Koh, C.S., Zaffagnini, M., Winger, A.M., Gualberto, J.M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J.-P., Lemaire, S.D., Didierjean, C., et al. (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J. Biol. Chem.* 284, 9299–9310.
- Couturier, J., Koh, C.S., Zaffagnini, M., Winger, A.M., Gualberto, J.M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J.-P., Lemaire, S.D., Didierjean, C., et al. (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J. Biol. Chem.* 284, 9299–9310.
- Couturier, J., Ströher, E., Albetel, A.-N., Roret, T., Muthuramalingam, M., Tarrago, L., Seidel, T., Tsan, P., Jacquot, J.-P., Johnson, M.K., et al. (2011). Arabidopsis chloroplastic glutaredoxin C5 as a model to explore molecular determinants for iron-sulfur cluster binding into glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 286, 27515–27527.
- Cristodero, M., Seebeck, T., and Schneider, A. (2010). Mitochondrial translation is essential in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 78, 757–769.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190.
- Da Silva, A.S., Garcia Perez, H.A., Costa, M.M., França, R.T., De Gasperi, D., Zquette, R.A., Amado, J.A., Lopes, S.T.A., Teixeira, M.M.G., and Monteiro, S.G. (2011). Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitol. Res.* 108, 23–30.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., and Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 34, 85–96.
- Dalziel, K., Dam, H., Moutschen-Dahmen, M., Noer, B., and Reio, L. (1957). Initial Steady State Velocities in the Evaluation of Enzyme-Coenzyme-Substrate Reaction Mechanisms. *Acta Chem. Scand.* 11, 1706–1723.
- Daniels, J.-P., Gull, K., and Wickstead, B. (2012). The trypanosomatid-specific N terminus of RPA2 is required for RNA polymerase I assembly, localization, and function. *Eukaryotic Cell* 11, 662–672.
- Dávila, A.M., and Silva, R.A. (2000). Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 199–212.
- Dekker, C., Willison, K.R., and Taylor, W.R. (2011). On the evolutionary origin of the chaperonins. *Proteins* 79, 1172–1192.
- Demoro, B., Sarniguet, C., Sánchez-Delgado, R., Rossi, M., Liebowitz, D., Caruso, F., Olea-Azar, C., Moreno, V., Medeiros, A., Comini, M.A., et al. (2012). New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Trans* 41, 1534–1543.
- Denton, H., McGregor, J.C., and Coombs, G.H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem. J* 381, 405–412.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3217–3266.
- Deponte, M., Becker, K., and Rahlfs, S. (2005). Plasmodium falciparum glutaredoxin-like proteins. *Biol. Chem.* 386, 33–40.
- Derewenda, U., Boczek, T., Gorres, K.L., Yu, M., Hung, L., Cooper, D., Joachimiak, A., Raines, R.T., and Derewenda, Z.S. (2009). Structure and function of Bacillus subtilis YphP, a prokaryotic disulfide isomerase with a CXC catalytic motif. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 8664–8671.
- Deschamps, P., Lara, E., Marande, W., López-García, P., Ekelund, F., and Moreira, D. (2011). Phylogenomic analysis of kinetoplasts supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol. Biol. Evol.* 28, 53–58.
- Desquesnes, M., and Dia, M.L. (2003). Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Exp. Parasitol.* 105, 226–231.
- Diechtierow, M., and Krauth-Siegel, R.L. (2011). A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 856–868.
- Dobrovolska, O., Shumilina, E., Gladyshev, V.N., and Dikiy, A. (2012). Structural Analysis of Glutaredoxin Domain of Mus musculus Thioredoxin Glutathione Reductase. *PLoS ONE* 7, e52914.
- Donner, A. (2012). Prodrug activation: Glutaredoxin family tree. *Nat Chem Biol* 8, 739.
- Dormeyer, M., Reckenfelderbäumer, N., Ludemann, H., and Krauth-Siegel, R.L. (2001). Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 276, 10602–10606.
- Dos Santos, C.R., Fessel, M.R., Vieira, L. de C., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Guimarães, B.G., Zanchin, N.I.T., and Barbosa, J.A.R.G. (2009). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Q4DV70 from *Trypanosoma cruzi*, a

- hypothetical protein with a putative thioredoxin domain. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 641–644.
- Draculic, T., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2000). A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 36, 1167–1174.
- Dubini, A., and Sargent, F. (2003). Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett.* 549, 141–146.
- Dufernez, F., Yernaux, C., Gerbod, D., Noël, C., Chauvenet, M., Wintjens, R., Edgcomb, V.P., Capron, M., Opperdoes, F.R., and Viscogliosi, E. (2006). The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 210–225.
- Dupuy, J., Volbeda, A., Carpentier, P., Darnault, C., Moulis, J.-M., and Fontecilla-Camps, J.C. (2006). Crystal structure of human iron regulatory protein 1 as cytosolic aconitase. *Struct. Lond. Engl.* 1993 14, 129–139.
- Eckers, E., Bien, M., Stroobant, V., Herrmann, J.M., and Deponte, M. (2009). Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry* 48, 1410–1423.
- Ehrensberger, K.M., and Bird, A.J. (2011). Hammering out details: regulating metal levels in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 36, 524–531.
- Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B.M., Holmgren, A., Jörnvall, H., Höög, J.O., and Brändén, C.I. (1984). Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* 3, 1443–1449.
- Ellis, K.J., and Morrison, J.F. (1982). Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Meth. Enzymol.* 87, 405–426.
- Ellman, G., and Lysko, H. (1979). A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 93, 98–102.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415.
- Emmer, B.T., Daniels, M.D., Taylor, J.M., Epting, C.L., and Engman, D.M. (2010). Calflagin Inhibition Prolongs Host Survival and Suppresses Parasitemia in *Trypanosoma brucei* Infection. *Eukaryot. Cell* 9, 934–942.
- Erben, E.D., Valguarnera, E., Nardelli, S., Chung, J., Daum, S., Potenza, M., Schenkman, S., and Téllez-Iñón, M.T. (2010). Identification of an atypical peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1028–1037.
- Eser, M., Masip, L., Kadokura, H., Georgiou, G., and Beckwith, J. (2009). Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the *E. coli* periplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1572–1577.
- Estévez, A.M., Haile, S., Steinbüchel, M., Quijada, L., and Clayton, C. (2004). Effects of depletion and overexpression of the *Trypanosoma brucei* ribonuclease L inhibitor homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 137–141.
- Fairlamb, A.H., and Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 695–729.
- Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T., and Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227, 1485–1487.
- Fairlamb, A.H., Henderson, G.B., and Cerami, A. (1986). The biosynthesis of trypanothione and N1-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 247–257.
- Fast, B., Kremp, K., Boshart, M., and Steverding, D. (1999). Iron-dependent regulation of transferrin receptor expression in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 342 Pt 3, 691–696.
- Feagin, J.E., Jasmer, D.P., and Stuart, K. (1986). Differential mitochondrial gene expression between slender and stumpy bloodforms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 207–214.
- Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.-P., Jin, C., and Xia, B. (2006). Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site. *Biochemistry* 45, 7998–8008.
- Fenn, K., and Matthews, K.R. (2007). The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 539–546.
- Fernandes, A.P., and Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 63–74.
- Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andréson, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A., and Vlamis-Gardikas, A. (2005). A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 280, 24544–24552.
- Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011). Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 434–450.
- Fetrow, J.S. (1995). Omega loops: nonregular secondary structures significant in protein function and stability. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 708–717.
- Fèvre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C., and Maudlin, I. (2006). Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 61, 167–221.
- Figueiredo, L.M., Cross, G.A.M., and Janzen, C.J. (2009). Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 504–513.
- Filser, M., Comini, M.A., Molina-Navarro, M.M., Dirdjaja, N., Herrero, E., and Krauth-Siegel, R.L. (2008). Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biol. Chem.* 389, 21–32.
- Findlay, V.J., Townsend, D.M., Morris, T.E., Fraser, J.P., He, L., and Tew, K.D. (2006). A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res.* 66, 6800–6806.
- Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., et al. (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34, D247–251.

- Fladvad, M., Bellanda, M., Fernandes, A.P., Mammi, S., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., and Sunnerhagen, M. (2005). Molecular mapping of functionalities in the solution structure of reduced Grx4, a monothiol glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 24553–24561.
- Flegontov, P., Votýpka, J., Skalický, T., Logacheva, M.D., Penin, A.A., Tanifuji, G., Onodera, N.T., Kondrashov, A.S., Volf, P., Archibald, J.M., et al. (2013). Paratrypanosoma Is a Novel Early-Branching Trypanosomatid. *Curr. Biol.* (en prensa)
- Fleitas, L. (2012). Análisis funcional de glutaredoxina monotiólica 1 de *Trypanosoma cruzi*. Bachelor Thesis, Biochemistry. Universidad de la República.
- Flohé, L. (2012a). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Flohé, L. (2012b). The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol. Adv.* 30, 294–301.
- Flohé, L., Hecht, H.J., and Steinert, P. (1999). Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 966–984.
- Floppe, N., and Nilsson, L. (2004). The glutaredoxin -C-P-Y-C-motif: influence of peripheral residues. *Struct. Lond. Engl.* 1993 12, 289–300.
- Floppe, N., and Nilsson, L. (2007). Stabilization of the catalytic thiolate in a mammalian glutaredoxin: structure, dynamics and electrostatics of reduced pig glutaredoxin and its mutants. *J. Mol. Biol.* 372, 798–816.
- Fomenko, D.E., and Gladyshev, V.N. (2002). CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Sci.* 11, 2285–2296.
- Fomenko, D.E., and Gladyshev, V.N. (2012). Comparative genomics of thiol oxidoreductases reveals widespread and essential functions of thiol-based redox control of cellular processes. *Antioxidants Redox Signal.* 16, 193–201.
- Fomenko, D.E., Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2008). Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. *Mol. Cells* 26, 228–235.
- Fomenko, D.E., Xing, W., Adair, B.M., Thomas, D.J., and Gladyshev, V.N. (2007). High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues. *Science* 315, 387–389.
- Fraczkiewicz, R., and Braun, W. (1998). Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *J. Comput. Chem.* 19, 319–333.
- Friemann, R., Schmidt, H., Ramaswamy, S., Forstner, M., Krauth-Siegel, R.L., and Eklund, H. (2003). Structure of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *FEBS Lett.* 554, 301–305.
- Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredes, A., Chapman, J., Pham, J., et al. (2010). The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* 140, 631–642.
- Funato, Y., and Miki, H. (2007). Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1035–1057.
- Fyfe, P.K., Westrop, G.D., Silva, A.M., Coombs, G.H., and Hunter, W.N. (2012). Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11693–11698.
- Gallagly, M.M., and Mieyal, J.J. (2007). Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol* 7, 381–391.
- Gallagly, M.M., Starke, D.W., and Mieyal, J.J. (2009). Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1059–1081.
- Gallagly, M.M., Starke, D.W., Leonberg, A.K., Ospina, S.M.E., and Mieyal, J.J. (2008). Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: implications for intracellular roles. *Biochemistry* 47, 11144–11157.
- Gao, X.-H., Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Michelet, L., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P., and Lemaire, S.D. (2010). Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*: kinetics and specificity in deglutathionylation reactions. *FEBS Lett.* 584, 2242–2248.
- Garcia-Pino, A., Martinez-Rodriguez, S., Wahni, K., Wyns, L., Loris, R., and Messens, J. (2009). Coupling of domain swapping to kinetic stability in a thioredoxin mutant. *J. Mol. Biol.* 385, 1590–1599.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., et al. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419, 498–511.
- Garg, R., Jhanwar, S., Tyagi, A.K., and Jain, M. (2010). Genome-wide survey and expression analysis suggest diverse roles of glutaredoxin gene family members during development and response to various stimuli in rice. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Reports Genes Genomes* 17, 353–367.
- Garzón, E., Borges, M.C., Cordeiro-da-Silva, A., Nacife, V., Meirelles, M. de N., Guilvard, E., Bosseno, M.F., Guevara, A.G., Brenière, S.F., and Ouaisi, A. (2003). *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. *Immunol. Lett.* 89, 67–80.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784–3788.
- Gerdes, S.Y., Scholle, M.D., Campbell, J.W., Balázs, G., Ravasz, E., Daugherty, M.D., Somera, A.L., Kyrpides, N.C., Anderson, I., Gelfand, M.S., et al. (2003). Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* 185, 5673–5684.
- Gerlt, J.A., and Babbitt, P.C. (2000). Can sequence determine function? *Genome Biol.* 1, REVIEWS0005.
- Gerrits, H., Mussmann, R., Bitter, W., Kieft, R., and Borst, P. (2002). The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 237–247.
- Ghezzi, P. (2005). Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic. Res.* 39, 573–580.
- Gibson, W. (2007). Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int. J. Parasitol.* 37, 829–838.

- Gibson, W., and Bailey, M. (2003). The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2, 1.
- Gilbert, H.F. (1990). Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 63, 69–172.
- Gladyshev, V.N., Liu, A., Novoselov, S.V., Krysan, K., Sun, Q.A., Kryukov, V.M., Kryukov, G.V., and Lou, M.F. (2001). Identification and characterization of a new mammalian glutaredoxin (thioltransferase), Grx2. *J. Biol. Chem.* 276, 30374–30380.
- Gladysheva, T.B., Oden, K.L., and Rosen, B.P. (1994). Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 33, 7288–7293.
- Gluezn, E., Sharma, R., Carrington, M., and Gull, K. (2008). Functional characterization of cohesin subunit SCC1 in *Trypanosoma brucei* and dissection of mutant phenotypes in two life cycle stages. *Mol. Microbiol.* 69, 666–680.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.
- Gould, M.K., Bachmaier, S., Ali, J.A.M., Alsford, S., Tagoe, D.N.A., Munday, J.C., Schnauffer, A.C., Horn, D., Boshart, M., and Koning, H.P. de (2013). Cyclic AMP Effectors in African Trypanosomes Revealed by Genome-Scale RNA Interference Library Screening for Resistance to the Phosphodiesterase Inhibitor CpdA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4882–4893.
- Grab, D.J., Shaw, M.K., Wells, C.W., Verjee, Y., Russo, D.C., Webster, P., Naessens, J., and Fish, W.R. (1993). The transferrin receptor in African trypanosomes: identification, partial characterization and subcellular localization. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 114–126.
- Grant, K.M., Hassan, P., Anderson, J.S., and Mottram, J.C. (1998). The crk3 gene of *Leishmania mexicana* encodes a stage-regulated cdc2-related histone H1 kinase that associates with p12. *J. Biol. Chem.* 273, 10153–10159.
- Grassetti, D.R., and Murray, J.F., Jr (1967). Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 41–49.
- Greetham, D., Vickerstaff, J., Shenton, D., Perrone, G.G., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2010). Thioredoxins function as deglutathionylase enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochem.* 11, 3.
- Gribskov, M., McLachlan, A.D., and Eisenberg, D. (1987). Profile analysis: detection of distantly related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4355–4358.
- Gronenborn, A.M. (2009). Protein acrobatics in pairs - Dimerization via Domain Swapping. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19, 39–49.
- Guerry, P., and Herrmann, T. (2012). Comprehensive automation for NMR structure determination of proteins. *Methods Mol. Biol.* 831, 429–451.
- Gunasekera, K., Wüthrich, D., Braga-Lagache, S., Heller, M., and Ochsenreiter, T. (2012). Proteome remodelling during development from blood to insect-form *Trypanosoma brucei* quantified by SILAC and mass spectrometry. *BMC Genomics* 13, 556.
- Güntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283–298.
- Gustafsson, T.N., Sahlin, M., Lu, J., Sjöberg, B.-M., and Holmgren, A. (2012). *Bacillus anthracis* thioredoxin systems, characterization and role as electron donors for ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 287, 39686–39697.
- Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L., and Büscher, P. (2010). *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Vet. Parasitol.* 174, 26–29.
- Hall, A., Karplus, P.A., and Poole, L.B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins—structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* 276, 2469–2477.
- Hamilton, P.B., Teixeira, M.M.G., and Stevens, J.R. (2012). The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol.* 28, 136–141.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., and Michels, P.A. (2003b). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11.
- Hannaert, V., Saavedra, E., Duffieux, F., Szikora, J.-P., Rigden, D.J., Michels, P.A.M., and Opperdoes, F.R. (2003a). Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1067–1071.
- Harding, S.E. (1994). Determination of diffusion coefficients of biological macromolecules by dynamic light scattering. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 22, 97–108.
- Harris, M., and Jones, T.A. (2002). Xtrack - a web-based crystallographic notebook. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1889–1891.
- Harsman, A., Niemann, M., Pusnik, M., Schmidt, O., Burmann, B.M., Hiller, S., Meisinger, C., Schneider, A., and Wagner, R. (2012). Bacterial origin of a mitochondrial outer membrane protein translocase: new perspectives from comparative single channel electrophysiology. *J. Biol. Chem.* 287, 31437–31445.
- Hashemy, S.I., Johansson, C., Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2007). Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity. *J. Biol. Chem.* 282, 14428–14436.
- Hashemy, S.I., Johansson, C., Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2007). Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity. *J. Biol. Chem.* 282, 14428–14436.
- Haunhorst, P., Berndt, C., Eitner, S., Godoy, J.R., and Lillig, C.H. (2010). Characterization of the human monothiol glutaredoxin 3 (PICOT) as iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 394, 372–376.
- Helfert, S., Estévez, A.M., Bakker, B., Michels, P., and Clayton, C. (2001). Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 357, 117–125.
- Helmann, J.D. (2011). Bacillithiol, a new player in bacterial redox homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 123–133.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Camaschella, C. (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142, 24–38.

- Herald, V.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A., and Millar, A.H. (2003). Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 537, 96–100.
- Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2007). Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1518–1530.
- Herrero, E., Bellí, G., and Casa, C. (2010). Structural and functional diversity of glutaredoxins in yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 659–668.
- Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002a). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* 24, 171–189.
- Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002b). Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* 319, 209–227.
- Hillebrand, H., Schmidt, A., and Krauth-Siegel, R.L. (2003). A second class of peroxidases linked to the trypanothione metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 6809–6815.
- Hoff, K.G., Culler, S.J., Nguyen, P.Q., McGuire, R.M., Silberg, J.J., and Smolke, C.D. (2009). In vivo fluorescent detection of Fe-S clusters coordinated by human GRX2. *Chem. Biol.* 16, 1299–1308.
- Hoffmann, B., Uzarska, M.A., Berndt, C., Godoy, J.R., Haunhorst, P., Lillig, C.H., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2011). The Multidomain Thioredoxin-Monothiol Glutaredoxins Represent a Distinct Functional Group. *Antioxid Redox Signal.*
- Hofmann, B., Budde, H., Bruns, K., Guerrero, S.A., Kalisz, H.M., Menge, U., Montemartini, M., Nogoceke, E., Steinert, P., Wissing, J.B., et al. (2001). Structures of tryparedoxins revealing interaction with trypanothione. *Biol. Chem.* 382, 459–471.
- Holm, L., and Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 38, W545–W549.
- Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P., and Schenkel, A. (2008). Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24, 2780–2781.
- Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2275–2279.
- Holmgren, A. (1979). Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* 254, 3672–3678.
- Holmgren, A., Söderberg, B.O., Eklund, H., and Brändén, C.I. (1975). Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2305–2309.
- Höög, J.O., Jörnvall, H., Holmgren, A., Carlquist, M., and Persson, M. (1983). The primary structure of Escherichia coli glutaredoxin. Distant homology with thioredoxins in a superfamily of small proteins with a redox-active cystine disulfide/cysteine dithiol. *Eur. J. Biochem.* 136, 223–232.
- Höög, J.O., von Bahr-Lindström, H., Jörnvall, H., and Holmgren, A. (1986). Cloning and expression of the glutaredoxin (grx) gene of Escherichia coli. *Gene* 43, 13–21.
- Horn, D., and McCulloch, R. (2010). Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 700–705.
- Hotez, P.J., and Kamath, A. (2009). Neglected Tropical Diseases in Sub-Saharan Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Disease Burden. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e412.
- Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L.E.S., Alvarez, B., Radi, R., and Trujillo, M. (2009). Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 9416–9426.
- Igoillo-Esteve, M., and Cazzulo, J.J. (2006). The glucose-6-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149, 170–181.
- Ikeuchi, Y., Shigi, N., Kato, J., Nishimura, A., and Suzuki, T. (2006). Mechanistic Insights into Sulfur Relay by Multiple Sulfur Mediators Involved in Thiouridine Biosynthesis at tRNA Wobble Positions. *Molecular Cell* 21, 97–108.
- Ingles-Prieto, A., Ibarra-Molero, B., Delgado-Delgado, A., Perez-Jimenez, R., Fernandez, J.M., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M., and Gavira, J.A. (2013). Conservation of Protein Structure over Four Billion Years. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 1690–1697.
- Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M.A., Wilkinson, S.R., Flohé, L., and Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 733–742.
- Isakov, N., Witte, S., and Altman, A. (2000). PICOT-HD: a highly conserved protein domain that is often associated with thioredoxin and glutaredoxin modules. *Trends Biochem. Sci.* 25, 537–539.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. *Science* 309, 436–442.
- Iversen, R., Andersen, P.A., Jensen, K.S., Winther, J.R., and Sigurskjold, B.W. (2010). Thiol-disulfide exchange between glutaredoxin and glutathione. *Biochemistry* 49, 810–820.
- Iwasaki, T., Kappl, R., Bracic, G., Shimizu, N., Ohmori, D., and Kumasaka, T. (2011). ISC-like [2Fe-2S] ferredoxin (FdxB) dimer from Pseudomonas putida JCM 20004: structural and electron-nuclear double resonance characterization. *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* 16, 923–935.
- Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A.K., Ferrer, J.-L., Chauvat, F., and Jacquamet, L. (2009). Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin. *Biochemistry* 48, 6041–6043.
- Izquierdo, A., Casas, C., Mühlenhoff, U., Lillig, C.H., and Herrero, E. (2008). Saccharomyces cerevisiae Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryotic Cell* 7, 1415–1426.
- Jackson, A.P., Quail, M.A., and Berriman, M. (2008). Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: Bodo saltans (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC Genomics* 9, 594.
- Jacobs, R.T., Nare, B., and Phillips, M.A. (2011a). State of the art in African trypanosome drug discovery. *Curr Top Med Chem* 11, 1255–1274.

- Jacobs, R.T., Nare, B., Wring, S.A., Orr, M.D., Chen, D., Sligar, J.M., Jenks, M.X., Noe, R.A., Bowling, T.S., Mercer, L.T., et al. (2011b). SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1151.
- Jaeger, T., and Flohé, L. (2006). The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. *Biofactors* 27, 109–120.
- Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 8, 689–692.
- Jamonneau, V., Ilboudo, H., Kaboré, J., Kaba, D., Koffi, M., Solano, P., Garcia, A., Courtin, D., Laveissière, C., Lingue, K., et al. (2012). Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei gambiense* Are Not 100% Fatal. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1691.
- Jensen, E.V. (1959). Sulfhydryl-disulfide interchange. *Science* 130, 1319–1323.
- Jensen, K.S., Hansen, R.E., and Winther, J.R. (2009). Kinetic and thermodynamic aspects of cellular thiol-disulfide redox regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1047–1058.
- Jensen, K.S., Winther, J.R., and Teilum, K. (2011). Millisecond dynamics in glutaredoxin during catalytic turnover is dependent on substrate binding and absent in the resting states. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3034–3042.
- Jensen, R.E., and Englund, P.T. (2012). Network news: the replication of kinetoplast DNA. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 473–491.
- Jensen, R.E., Simpson, L., and Englund, P.T. (2008). What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends Parasitol.* 24, 428–431.
- Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O., and Oppermann, U. (2007). Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 3077–3082.
- Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O., and Oppermann, U. (2007). Reversible sequestration of active site
- Johansson, C., Roos, A.K., Montano, S.J., Sengupta, R., Filippakopoulos, P., Guo, K., von Delft, F., Holmgren, A., Oppermann, U., and Kavanagh, K.L. (2011). The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem. J.* 433, 303–311.
- Jones, S., and Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13–20.
- Jortzik, E., Wang, L., and Becker, K. (2012). Thiol-based posttranslational modifications in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 657–673.
- Jung, J.-W., Yee, A., Wu, B., Arrowsmith, C.H., and Lee, W. (2005). Solution structure of YKR049C, a putative redox protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 550–554.
- Kabani, S., Fenn, K., Ross, A., Ivans, A., Smith, T.K., Ghazal, P., and Matthews, K. (2009). Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10, 427.
- Kaplan, C.D., and Kaplan, J. (2005). Regulatory oversight of the iron trade: posttranscriptional regulation in yeast. *Cell Metab.* 2, 4–6.
- Kelley, J.J., 3rd, Caputo, T.M., Eaton, S.F., Laue, T.M., and Bushweller, J.H. (1997). Comparison of backbone dynamics of reduced and oxidized *Escherichia coli* glutaredoxin-1 using 15N NMR relaxation measurements. *Biochemistry* 36, 5029–5044.
- Kennedy, P.G. (2012). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.*
- Kim, K.-D., Kim, H.-J., Lee, K.-C., and Roe, J.-H. (2011). Multi-domain CGFS-type glutaredoxin Grx4 regulates iron homeostasis via direct interaction with a repressor Fep1 in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 609–614.
- Kim, S.J., Woo, J.R., Hwang, Y.S., Jeong, D.G., Shin, D.H., Kim, K., and Ryu, S.E. (2003). The tetrameric structure of *Haemophilus influenzae* hybrid Prx5 reveals interactions between electron donor and acceptor proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 10790–10798.
- Kodali, V.K., and Thorpe, C. (2010). Quiescin sulfhydryl oxidase from *Trypanosoma brucei*: catalytic activity and mechanism of a QSOX family member with a single thioredoxin domain. *Biochemistry* 49, 2075–2085.
- Kohl, L., and Bastin, P. (2005). The flagellum of trypanosomes. *Int. Rev. Cytol.* 244, 227–285.
- Kolev, N.G., Franklin, J.B., Carmi, S., Shi, H., Michaeli, S., and Tschudi, C. (2010). The Transcriptome of the Human Pathogen *Trypanosoma brucei* at Single-Nucleotide Resolution. *PLoS Pathog* 6, e1001090.
- Kosloff, M., and Kolodny, R. (2008). Sequence-similar, structure-dissimilar protein pairs in the PDB. *Proteins* 71, 891–902.
- Krauth-Siegel, L.R., Comini, M.A., and Schlecker, T. (2007). The trypanothione system. *Subcell. Biochem.* 44, 231–251.
- Krauth-Siegel, R.L., and Comini, M.A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1236–1248.
- Krauth-Siegel, R.L., and Leroux, A.E. (2012). Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 583–607.
- Krauth-Siegel, R.L., and Lüdemann, H. (1996). Reduction of dehydroascorbate by trypanothione. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 203–208.
- Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H., and Schirmer, R.H. (2005). Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 690–715.
- Krauth-Siegel, R.L., Enders, B., Henderson, G.B., Fairlamb, A.H., and Schirmer, R.H. (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur. J. Biochem.* 164, 123–128.
- Krauth-Siegel, R.L., Meiering, S.K., and Schmidt, H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biol. Chem.* 384, 539–549.

- Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, M.R., Fairlamb, A.H., Krauth-Siegel, R.L., and Clayton, C. (2000). Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* 35, 542–552.
- Krnáčová, K., Vesteg, M., Hampl, V., Vlček, Č., and Horváth, A. (2012). *Euglena gracilis* and trypanosomatids possess common patterns in predicted mitochondrial targeting presequences. *J. Mol. Evol.* 75, 119–129.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lagna, G., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Use of dominant negative constructs to modulate gene expression. *Curr. Top. Dev. Biol.* 36, 75–98.
- Lai, D.-H., Hashimi, H., Lun, Z.-R., Ayala, F.J., and Lukes, J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1999–2004.
- Lakowicz, J.R. (2006). Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (Springer US), pp. 27–61.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Lanham, S.M., and Godfrey, D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28, 521–534.
- Laporte, D., Olate, E., Salinas, P., Salazar, M., Jordana, X., and Holuigue, L. (2012). Glutaredoxin GRXS13 plays a key role in protection against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 63, 503–515.
- Lash, L.H. (2006). Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications. *Chem. Biol. Interact.* 163, 54–67.
- Leander, B.S. (2004). Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends Microbiol.* 12, 251–258.
- Lee, D.W., Kaur, D., Chinta, S.J., Rajagopalan, S., and Andersen, J.K. (2009). A disruption in iron-sulfur center biogenesis via inhibition of mitochondrial dithiol glutaredoxin 2 may contribute to mitochondrial and cellular iron dysregulation in mammalian glutathione-depleted dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2083–2094.
- Lee, S., Kim, S.M., and Lee, R.T. (2012). Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.*
- Lemaire, S.D. (2004). The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosyn. Res.* 79, 305–318.
- Leszczynski, J.F., and Rose, G.D. (1986). Loops in globular proteins: a novel category of secondary structure. *Science* 234, 849–855.
- Letunic, I., and Bork, P. (2011). Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.* 39, W475–W478.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.* 40, D302–305.
- Levick, M.P., Tetaud, E., Fairlamb, A.H., and Blackwell, J.M. (1998). Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96, 125–137.
- Li, H., Mapolelo, D.T., Dingra, N.N., Naik, S.G., Lees, N.S., Hoffman, B.M., Riggs-Gelasco, P.J., Huynh, B.H., Johnson, M.K., and Outten, C.E. (2009). The yeast iron regulatory proteins Grx3/4 and Fra2 form heterodimeric complexes containing a [2Fe-2S] cluster with cysteinyl and histidyl ligation. *Biochemistry* 48, 9569–9581.
- Li, L., Cheng, N., Hirschi, K.D., and Wang, X. (2010a). Structure of *Arabidopsis* chloroplastic monothiol glutaredoxin AtGRXcp. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 725–732.
- Li, W.-F., Yu, J., Ma, X.-X., Teng, Y.-B., Luo, M., Tang, Y.-J., and Zhou, C.-Z. (2010). Structural basis for the different activities of yeast Grx1 and Grx2. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1542–1547.
- Liepinsh, E., Baryshev, M., Sharipo, A., Ingelman-Sundberg, M., Otting, G., and Mkrtchian, S. (2001). Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer. *Struct. Lond. Engl.* 1993 9, 457–471.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 457–486.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669–700.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlhoff, U. (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1491–1508.
- Lillig, C.H., and Berndt, C. (2012). Glutaredoxins in Thiol/Disulfide Exchange. *Antioxid. Redox Signal.*
- Lillig, C.H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1304–1317.
- Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M.E., Hudemann, C., Bill, E., and Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8168–8173.
- Limor-Waisberg, K., Ben-Dor, S., and Fass, D. (2013). Diversification of quiescin sulfhydryl oxidase in a preserved framework for redox relay. *BMC Evol. Biol.* 13, 70.
- Lindahl, P.A., and Holmes-Hampton, G.P. (2011). Biophysical probes of iron metabolism in cells and organelles. *Curr Opin Chem Biol* 15, 342–346.
- Linding, R., Jensen, L.J., Diella, F., Bork, P., Gibson, T.J., and Russell, R.B. (2003a). Protein Disorder Prediction. *Structure* 11, 1453–1459.
- Linding, R., Russell, R.B., Neduva, V., and Gibson, T.J. (2003b). GlobPlot: exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucl. Acids Res.* 31, 3701–3708.
- Liu, J., Wetzel, L., Zhang, Y., Nagayasu, E., Ems-McClung, S., Florens, L., and Hu, K. (2013a). Novel thioredoxin-like proteins

- are components of a protein complex coating the cortical microtubules of *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot. Cell*.
- Liu, P., Tarnowski, M.A., O'Mara, B.W., Wu, W., Zhang, H., Tamura, J.K., Ackerman, M.S., Tao, L., Grace, M.J., and Russell, R.J. (2009). Characterization of S-thiolation on secreted proteins from *E. coli* by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 3343–3349.
- Liu, X., Liu, S., Feng, Y., Liu, J.-Z., Chen, Y., Pham, K., Deng, H., Hirschi, K.D., Wang, X., and Cheng, N. (2013b). Structural insights into the N-terminal GIY-YIG endonuclease activity of *Arabidopsis* glutaredoxin AtGRXS16 in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9565–9570.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U.C.M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R.P., Mann, B.J., et al. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433, 865–868.
- Long, S., Changmai, P., Tsaousis, A.D., Skalický, T., Verner, Z., Wen, Y.-Z., Roger, A.J., and Lukeš, J. (2011). Stage-specific requirement for Isa1 and Isa2 proteins in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei* and heterologous rescue by human and *Blastocystis* orthologues. *Mol. Microbiol.* 81, 1403–1418.
- Long, S., Jirku, M., Ayala, F.J., and Lukes, J. (2008a). Mitochondrial localization of human frataxin is necessary but processing is not for rescuing frataxin deficiency in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13468–13473.
- Long, S., Jirků, M., Mach, J., Ginger, M.L., Sutak, R., Richardson, D., Tachezy, J., and Lukes, J. (2008b). Ancestral roles of eukaryotic frataxin: mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. *Mol. Microbiol.* 69, 94–109.
- Lopez, J.A., Carvalho, T.U., de Souza, W., Flohé, L., Guerrero, S.A., Montemartini, M., Kalisz, H.M., Nogoceke, E., Singh, M., Alves, M.J., et al. (2000). Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 767–772.
- Lüdemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H., and Krauth-Siegel, R.L. (1998). *Trypanosoma brucei* tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *FEBS Lett.* 431, 381–385.
- Lun, Z.-R., Lai, D.-H., Li, F.-J., Lukes, J., and Ayala, F.J. (2010). *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends Parasitol.* 26, 424–427.
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., and Holmgren, A. (2001). Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *J. Biol. Chem.* 276, 26269–26275.
- Luo, M., Jiang, Y.-L., Ma, X.-X., Tang, Y.-J., He, Y.-X., Yu, J., Zhang, R.-G., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2010). Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J. Mol. Biol.* 398, 614–622.
- Luo, M., Jiang, Y.-L., Ma, X.-X., Tang, Y.-J., He, Y.-X., Yu, J., Zhang, R.-G., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2010). Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. *J. Mol. Biol.* 398, 614–622.
- Macgregor, P., Rojas, F., Dean, S., and Matthews, K.R. (2013). Stable transformation of pleomorphic bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 190, 60–62.
- MacGregor, P., Szöör, B., Savill, N.J., and Matthews, K.R. (2012). Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 431–438.
- Mach, J., Poliak, P., Matušková, A., Žárský, V., Janata, J., Lukeš, J., and Tachezy, J. (2013). An Advanced System of the Mitochondrial Processing Peptidase and Core Protein Family in *Trypanosoma brucei* and Multiple Origins of the Core I Subunit in Eukaryotes. *Genome Biol Evol* 5, 860–875.
- Macleod, E.T., Darby, A.C., Maudlin, I., and Welburn, S.C. (2007). Factors Affecting Trypanosome Maturation in Tsetse Flies. *PLoS ONE* 2, e239.
- Madera, M., and Gough, J. (2002). A comparison of profile hidden Markov model procedures for remote homology detection. *Nucleic Acids Res.* 30, 4321–4328.
- Magez, S., and Caljon, G. (2011). Mouse models for pathogenic African trypanosomes: unravelling the immunology of host-parasite-vector interactions. *Parasite Immunol.* 33, 423–429.
- Maity, H., Rumbley, J.N., and Englander, S.W. (2006). Functional role of a protein foldon—an Omega-loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome c. *Proteins* 63, 349–355.
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., and Radi, R. (2013b). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1830, 3199–3216.
- Manta, B., Fleitas, B., Comini, M.A. (2012). Iron Metabolism in Pathogenic Trypanosomes. In *Iron Metabolism*, (In Tech Press). <http://www.intechopen.com/books/iron-metabolism/iron-metabolism-in-pathogenic-trypanosomes>
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009). The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 146–154.
- Manta, B., Obal, G., Ricciardi, A., Pritsch, O., and Denicola, A. (2011). Tools to evaluate the conformation of protein products. *Biotechnol. J.* 6, 731–741.
- Manta, B., Pavan, C., Sturlese, M., Medeiros, A., Crispo, M., Berndt, C., Krauth-Siegel, R.L., Bellanda, M., and Comini, M.A. (2013a). Iron-Sulfur Cluster Binding by Mitochondrial Monothiol Glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: Molecular Basis of Iron-Sulfur Cluster Coordination and Relevance for Parasite Infectivity. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 665–682.
- Mapolelo, D., Zhang, B., Randeniya, S., Albetel, A.-N., Li, H., Couturier, J., Rouhier, N., Outten, C., and Johnson, M. (2012). Monothiol glutaredoxins and A-type proteins: Partners in Fe-S cluster trafficking. *Dalton Trans.*
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., et al. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucl. Acids Res.* 39, D225–D229.
- Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2009). A structure-based approach for detection of thiol oxidoreductases and their catalytic redox-active cysteine residues. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000383.
- Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2010). Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *J. Mol. Biol.* 404, 902–916.

- Marino, S.M., and Gladyshev, V.N. (2011). Redox biology: computational approaches to the investigation of functional cysteine residues. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 135–146.
- Marino, S.M., Li, Y., Fomenko, D.E., Agisheva, N., Cerny, R.L., and Gladyshev, V.N. (2010). Characterization of surface-exposed reactive cysteine residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 49, 7709–7721.
- Mariotti, M., Ridge, P.G., Zhang, Y., Lobanov, A.V., Pringle, T.H., Guigo, R., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2012). Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. *PLoS One* 7, e33066.
- Martin, J.L. (1995). Thioredoxin—a fold for all reasons. *Struct. Lond. Engl.* 1993 3, 245–250.
- Maruyama, S., Suzuki, T., Weber, A.P.M., Archibald, J.M., and Nozaki, H. (2011). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC Evol. Biol.* 11, 105.
- Masip, L., Pan, J.L., Haldar, S., Penner-Hahn, J.E., DeLisa, M.P., Georgiou, G., Bardwell, J.C.A., and Collet, J.-F. (2004). An engineered pathway for the formation of protein disulfide bonds. *Science* 303, 1185–1189.
- Maslov, D.A., Votýpka, J., Yurchenko, V., and Lukeš, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends Parasitol.* 29, 43–52.
- Matovu, E., Seebeck, T., Enyaru, J.C., and Kaminsky, R. (2001). Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. *Microbes Infect.* 3, 763–770.
- Matthews, K.R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.* 118, 283–290.
- Maudlin, I. (2006). African trypanosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 100, 679–701.
- Maurice, J. (2013). New WHO plan targets the demise of sleeping sickness. *Lancet* 381, 13–14.
- Mazzocco, M., Arrigo, P., Egeo, A., Maffei, M., Vergano, A., Di Lisi, R., Ghiotto, F., Ciccone, E., Cinti, R., Ravazzolo, R., et al. (2001). A novel human homologue of the SH3BGR gene encodes a small protein similar to Glutaredoxin 1 of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 540–545.
- Mazzocco, M., Maffei, M., Egeo, A., Vergano, A., Arrigo, P., Di Lisi, R., Ghiotto, F., and Scartezzini, P. (2002). The identification of a novel human homologue of the SH3 binding glutamic acid-rich (SH3BGR) gene establishes a new family of highly conserved small proteins related to Thioredoxin Superfamily. *Gene* 291, 233–239.
- McCulloch, R., Vassella, E., Burton, P., Boshart, M., and Barry, J.D. (2004). Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol. Biol.* 262, 53–86.
- McDonnell, A.V., Jiang, T., Keating, A.E., and Berger, B. (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics* 22, 356–358.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 16, 404–405.
- Melchers, J., Diechtierow, M., Fehér, K., Sinning, I., Tews, I., Krauth-Siegel, R.L., and Muhle-Goll, C. (2008). Structural basis for a distinct catalytic mechanism in *Trypanosoma brucei* tryparedoxin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 283, 30401–30411.
- Melchers, J., Dirdjaja, N., Ruppert, T., and Krauth-Siegel, R.L. (2007). Glutathionylation of trypanosomal thiol redox proteins. *J. Biol. Chem.* 282, 8678–8694.
- Meng, E.C., and Babbitt, P.C. (2011). Topological variation in the evolution of new reactions in functionally diverse enzyme superfamilies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 391–397.
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J.M., and Deponte, M. (2008a). Two novel monothiol glutaredoxins from *Saccharomyces cerevisiae* provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins. *Biochemistry* 47, 1452–1463.
- Mesecke, N., Spang, A., Deponte, M., and Herrmann, J.M. (2008b). A novel group of glutaredoxins in the cis-Golgi critical for oxidative stress resistance. *Mol. Biol. Cell* 19, 2673–2680.
- Meyer, A.J., and Dick, T.P. (2010). Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 621–650.
- Meyer, Verdoucq, and Vignols (1999). Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* 4, 388–394.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F., and Reichheld, J.-P. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annu. Rev. Genet.* 43, 335–367.
- Meyer, Y., Riondet, C., Constans, L., Abdelgawwad, M.R., Reichheld, J.P., and Vignols, F. (2006). Evolution of redoxin genes in the green lineage. *Photosynth. Res.* 89, 179–192.
- Michels, P.A.M., Bringaud, F., Herman, M., and Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1463–1477.
- Mieyal, J.J., and Chock, P.B. (2012). Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: Focus on s-glutathionylation. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 471–475.
- Mieyal, J.J., Starke, D.W., Gravina, S.A., and Hocevar, B.A. (1991). Thioltransferase in human red blood cells: kinetics and equilibrium. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 8883–8891.
- Mi-ichi, F., Abu Yousuf, M., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009). Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 21731–21736.
- Mitra, S., and Elliott, S.J. (2009). Oxidative disassembly of the [2Fe-2S] cluster of human Grx2 and redox regulation in the mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 3813–3815.
- Mohan, A., Sullivan, W.J., Jr, Radivojac, P., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2008). Intrinsic disorder in pathogenic and non-pathogenic microbes: discovering and analyzing the unfoldomes of early-branching eukaryotes. *Mol. Biosyst.* 4, 328–340.
- Mohan, A., Sullivan, W.J., Jr, Radivojac, P., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. (2008). Intrinsic disorder in pathogenic and non-pathogenic microbes: discovering and analyzing the unfoldomes of early-branching eukaryotes. *Mol Biosyst* 4, 328–340.
- Molina, M.M., Bellí, G., de la Torre, M.A., Rodríguez-Manzanique, M.T., and Herrero, E. (2004). Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as

- mitochondrial glutaredoxins. *J. Biol. Chem.* 279, 51923–51930.
- Molina-Navarro, M.M., Casas, C., Piedrafitra, L., Bellí, G., and Herrero, E. (2006). Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett.* 580, 2273–2280.
- Montagnes, D., Roberts, E., Lukeš, J., and Lowe, C. (2012). The rise of model protozoa. *Trends Microbiol.* 20, 184–191.
- Montemartini, M., Kalisz, H.M., Kiess, M., Nogoceke, E., Singh, M., Steinert, P., and Flohé, L. (1998). Sequence, heterologous expression and functional characterization of a novel trypanothione from *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* 379, 1137–1142.
- Montrichard, F., Le Guen, F., Laval-Martin, D.L., and Davioud-Charvet, E. (1999). Evidence for the co-existence of glutathione reductase and trypanothione reductase in the non-trypanosomatid Euglenozoa: *Euglena gracilis*. *Z. FEBS Lett.* 442, 29–33.
- Morgan, B., Ezerija, D., Amoako, T.N.E., Riemer, J., Seedorf, M., and Dick, T.P. (2012). Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 119–125.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., et al. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317, 1921–1926.
- Moutiez, M., Mezaine-Cherif, D., Aumercier, M., Sergheraert, C., and Tartar, A. (1994). Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 42, 2641–2644.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., and Lill, R. (2003). Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 22, 4815–4825.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., et al. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab* 12, 373–385.
- Müller, S., Liebau, E., Walter, R.D., and Krauth-Siegel, R.L. (2003). Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 19, 320–328.
- Muñoz, V., and Serrano, L. (1994). Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat Struct Mol Biol* 1, 399–409.
- Namangala, B. (2012). Contribution of innate immune responses towards resistance to African trypanosome infections. *Scand. J. Immunol.* 75, 5–15.
- Nardini, M., Mazzocco, M., Massaro, A., Maffei, M., Vergano, A., Donadini, A., Scartezzini, P., and Bolognesi, M. (2004). Crystal structure of the glutaredoxin-like protein SH3BGRL3 at 1.6 Ångstrom resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 470–476.
- Nikitas, P., Pappa-Louisi, A., and Papageorgiou, A. (2001). On the equations describing chromatographic peaks and the problem of the deconvolution of overlapped peaks. *J Chromatogr A* 912, 13–29.
- Nilsson, D., Gunasekera, K., Mani, J., Osteras, M., Farinelli, L., Baerlocher, L., Roditi, I., and Ochsenreiter, T. (2010). Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.* 6, e1001037.
- Nogoceke, E., Gommel, D.U., Kiess, M., Kalisz, H.M., and Flohé, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* 378, 827–836.
- Noguera, V., Walker, O., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Krimm, I., and Lancelin, J.-M. (2005). NMR reveals a novel glutaredoxin-glutaredoxin interaction interface. *J. Mol. Biol.* 353, 629–641.
- Nolan, D.P., Rolin, S., Rodriguez, J.R., Van Den Abbeele, J., and Pays, E. (2000). Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 18–27.
- Nordstrand, K., Aslund, F., Meunier, S., Holmgren, A., Otting, G., and Berndt, K.D. (1999). Direct NMR observation of the Cys-14 thiol proton of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin-3 supports the presence of an active site thiol-thiolate hydrogen bond. *FEBS Lett* 449, 196–200.
- Nürenberg, E., and Tampé, R. (2013). Tying up loose ends: ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Trends Biochem. Sci.* 38, 64–74.
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab. Rev.* 43, 138–151.
- Oberholzer, M., Langousis, G., Nguyen, H.T., Saada, E.A., Shimogawa, M.M., Jonsson, Z.O., Nguyen, S.M., Wohlschlegel, J.A., and Hill, K.L. (2011). Independent analysis of the flagellum surface and matrix proteomes provides insight into flagellum signaling in mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10, M111.010538.
- Ondarza, R.N., Hurtado, G., Iturbe, A., Hernández, E., Tamayo, E., and Woolery, M. (2005). Identification of trypanothione from the human pathogen *Entamoeba histolytica* by mass spectrometry and chemical analysis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 42, 175–181.
- Ondarza, R.N., Hurtado, G., Tamayo, E., Iturbe, A., and Hernández, E. (2006). *Naegleria fowleri*: a free-living highly pathogenic amoeba contains trypanothione/trypanothione reductase and glutathione/glutathione reductase systems. *Exp. Parasitol.* 114, 141–146.
- Ondarza, R.N., Iturbe, A., Hurtado, G., Tamayo, E., Ondarza, M., and Hernandez, E. (1999). *Entamoeba histolytica*: a eukaryote with trypanothione metabolism instead of glutathione metabolism. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 ( Pt 1), 47–52.
- Ondarza, R.N., Tamayo, E.M., Hurtado, G., Hernández, E., and Iturbe, A. (1997). Isolation and purification of glutathionyl-spermidine and trypanothione from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Med. Res.* 28 Spec No, 73–75.
- Ortiz, C., Larrieux, N., Medeiros, A., Botti, H., Comini, M., and Buschiazzo, A. (2011). Expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* in complex with substrate. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 67, 1457–1461.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411–2423.
- Pain, R. (2005). Determining the CD spectrum of a protein. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 7, Unit 7.6.*

- Pal, M., and Dasgupta, S. (2003). The nature of the turn in omega loops of proteins. *Proteins* 51, 591–606.
- Panca, R., and Tompa, P. (2012). Structural disorder in eukaryotes. *PLoS ONE* 7, e34687.
- Panigrahi, A.K., Ogata, Y., Zíková, A., Anupama, A., Dalley, R.A., Acestor, N., Myler, P.J., and Stuart, K.D. (2009). A comprehensive analysis of *Trypanosoma brucei* mitochondrial proteome. *Proteomics* 9, 434–450.
- Paris, Z., Changmai, P., Rubio, M.A.T., Zíková, A., Stuart, K.D., Alfonzo, J.D., and Lukes, J. (2010). The Fe/S cluster assembly protein Isd11 is essential for tRNA thiolation in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 285, 22394–22402.
- Park, J.W., Mieyal, J.J., Rhee, S.G., and Chock, P.B. (2009). Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* 284, 23364–23374.
- Park, J.W., Mieyal, J.J., Rhee, S.G., and Chock, P.B. (2009). Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* 284, 23364–23374.
- Pavan, C. (2012). Solution structure determination of two glutaredoxins of *Trypanosoma brucei*. Thesis, PhD in Chemistry. University of Padova.
- Pays, E., and Vanhollebeke, B. (2009). Human innate immunity against African trypanosomes. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 493–498.
- Pedone, E., Limauro, D., D'Ambrosio, K., De Simone, G., and Bartolucci, S. (2010). Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 3797–3814.
- Pellé, R., McOdimba, F., Chuma, F., Wasawo, D., Pearson, T.W., and Murphy, N.B. (2002). The African trypanosome cyclophilin A homologue contains unusual conserved central and N-terminal domains and is developmentally regulated. *Gene* 290, 181–191.
- Peltoniemi, M.J., Karala, A.-R., Jurvansuu, J.K., Kinnula, V.L., and Ruddock, L.W. (2006). Insights into deglutathionylation reactions. Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the gamma-linkage present in glutathione. *J. Biol. Chem.* 281, 33107–33114.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Martínez, A., and Radi, R. (2012). *Trypanosoma cruzi* Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Piccicocchi, A., Saguez, C., Boussac, A., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2007). CGFS-type monothiol glutaredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 and other evolutionary distant model organisms possess a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry* 46, 15018–15026.
- Pimentel, D., Haeussler, D.J., Matsui, R., Burgoyne, J.R., Cohen, R.A., and Bachschmid, M.M. (2012). Regulation of Cell Physiology and Pathology by Protein S-Glutathionylation: Lessons Learned from the Cardiovascular System. *Antioxidants & Redox Signaling* 16, 524–542.
- Piñeyro, M.D., Arcari, T., Robello, C., Radi, R., and Trujillo, M. (2011a). Tryparedoxin peroxidases from *Trypanosoma cruzi*: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507, 287–295.
- Piñeyro, M.D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., and Robello, C. (2008). Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408, 45–50.
- Piñeyro, M.D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., and Robello, C. (2008). Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408, 45–50.
- Piñeyro, M.D., Parodi-Talice, A., Portela, M., Arias, D.G., Guerrero, S.A., and Robello, C. (2011b). Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin 1. *J. Proteomics* 74, 1683–1692.
- Piñeyro, M.D., Pizarro, J.C., Lema, F., Pritsch, O., Cayota, A., Bentley, G.A., and Robello, C. (2005). Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Struct. Biol.* 150, 11–22.
- Priest, J.W., and Hajduk, S.L. (1994). Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 179–191.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661–15667.
- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Nguama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., et al. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet* 374, 56–64.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 119, 4554–4564.
- Pullen, T.J., Ginger, M.L., Gaskell, S.J., and Gull, K. (2004). Protein targeting of an unusual, evolutionarily conserved adenylate kinase to a eukaryotic flagellum. *Mol. Biol. Cell* 15, 3257–3265.
- Pusnik, M., Charrière, F., Mäser, P., Waller, R.F., Dagley, M.J., Lithgow, T., and Schneider, A. (2009). The single mitochondrial porin of *Trypanosoma brucei* is the main metabolite transporter in the outer mitochondrial membrane. *Mol. Biol. Evol.* 26, 671–680.
- Pusnik, M., Schmidt, O., Perry, A.J., Oeljeklaus, S., Niemann, M., Warscheid, B., Lithgow, T., Meisinger, C., and Schneider, A. (2011). Mitochondrial preprotein translocase of trypanosomatids has a bacterial origin. *Curr. Biol.* 21, 1738–1743.
- Putonti, C., Quach, B., Kooistra, R.L., and Kanzok, S.M. (2013). The evolution and putative function of phosphatidylinositol-like proteins in the malaria parasite *Plasmodium*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 13, 49–55.
- Qi, W., Li, J., Chain, C.Y., Pasquevich, G.A., Pasquevich, A.F., and Cowan, J.A. (2012). Glutathione complexed Fe-S centers. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 10745–10748.
- Qi, W., Li, J., Chain, C.Y., Pasquevich, G.A., Pasquevich, A.F., and Cowan, J.A. (2013). Glutathione-complexed iron-sulfur clusters. Reaction intermediates and evidence for a template

- effect promoting assembly and stability. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 49, 6313–6315.
- Qi, Y., and Grishin, N.V. (2005). Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins* 58, 376–388.
- Rabinovitch, I., Yanku, M., Yehekel, A., Cohen, G., Borovok, I., and Aharonowitz, Y. (2010). Staphylococcus aureus NrdH redoxin is a reductant of the class Ib ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* 192, 4963–4972.
- Racker, E. (1955). Glutathione-homocystine transhydrogenase. *J. Biol. Chem.* 217, 867–874.
- Rada, P., Smíd, O., Sutak, R., Dolezal, P., Pyrih, J., Zársky, V., Montagne, J.-J., Hrdy, I., Camadro, J.-M., and Tachezy, J. (2009). The monothiol single-domain glutaredoxin is conserved in the highly reduced mitochondria of *Giardia intestinalis*. *Eukaryotic Cell* 8, 1584–1591.
- Rahfs, S., Fischer, M., and Becker, K. (2001). Plasmodium falciparum possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J. Biol. Chem.* 276, 37133–37140.
- Rastrojo, A., Carrasco-Ramiro, F., Martín, D., Crespillo, A., Reguera, R.M., Aguado, B., and Requena, J.M. (2013). The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC Genomics* 14, 223.
- Reckenfelderbäumer, N., Lüdemann, H., Schmidt, H., Steverding, D., and Krauth-Siegel, R.L. (2000). Identification and functional characterization of thioredoxin from *Trypanosoma brucei brucei*. *J. Biol. Chem.* 275, 7547–7552.
- Reichert, D., Zinkevich, T., Saalwächter, K., and Krushelnitsky, A. (2012). The relation of the X-ray B-factor to protein dynamics: insights from recent dynamic solid-state NMR data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 30, 617–627.
- Ren, G., Stephan, D., Xu, Z., Zheng, Y., Tang, D., Harrison, R.S., Kurz, M., Jarrott, R., Shouldice, S.R., Hiniker, A., et al. (2009). Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* 284, 10150–10159.
- Rettig, J. (2007). Zelluläre Charakterisierung von 1-Cys-Glutaredoxin-1 in *Trypanosoma brucei brucei*. Diplomarbeit. University of Heidelberg.
- Reutimann, H., Straub, B., Luisi, P.L., and Holmgren, A. (1981). A conformational study of thioredoxin and its tryptic fragments. *J. Biol. Chem.* 256, 6796–6803.
- Richardson, D.R., Lane, D.J.R., Becker, E.M., Huang, M.L.-H., Whitnall, M., Suryo Rahmanto, Y., Sheftel, A.D., and Ponka, P. (2010). Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 10775–10782.
- Richardson, J.S., Getzoff, E.D., and Richardson, D.C. (1978). The beta bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2574–2578.
- Riener, C.K., Kada, G., and Gruber, H.J. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 373, 266–276.
- Riondet, C., Desouris, J.P., Montoya, J.G., Chartier, Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.-P. (2012). A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2. *Plant Cell Environ.* 35, 360–373.
- Roche, B., Aussel, L., Ezraty, B., Mandin, P., Py, B., and Barras, F. (2013). Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 455–469.
- Roditi, I., and Clayton, C. (1999). An unambiguous nomenclature for the major surface glycoproteins of the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 103, 99–100.
- Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., and Barros, C.S.L. (2009). Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Vet. Pathol.* 46, 251–258.
- Rodríguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A., and Herrero, E. (1999). Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 8180–8190.
- Rodríguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* 13, 1109–1121.
- Røhr, Å.K., Hammerstad, M., and Andersson, K.K. (2013). Tuning of Thioredoxin Redox Properties by Intramolecular Hydrogen Bonds. *PLoS ONE* 8, e69411.
- Roldán, A., Comini, M.A., Crispo, M., and Krauth-Siegel, R.L. (2011). Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 81, 623–639.
- Romao, S., Castro, H., Sousa, C., Carvalho, S., and Tomás, A.M. (2009). The cytosolic tryparedoxin of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int. J. Parasitol.* 39, 703–711.
- Roos, G., and Messens, J. (2011). Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 314–326.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng.* 12, 85–94.
- Rouhier, N. (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol.* 186, 365–372.
- Rouhier, N., Couturier, J., and Jacquot, J.-P. (2006). Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J. Exp. Bot.* 57, 1685–1696.
- Rouhier, N., Couturier, J., Johnson, M.K., and Jacquot, J.-P. (2010). Glutaredoxins: roles in iron homeostasis. *Trends Biochem. Sci.* 35, 43–52.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J.P. (2002). Glutaredoxin-dependent peroxidoreductase from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 277, 13609–13614.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J.-P. (2004). Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell. Mol. Life Sci* 61, 1266–1277.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., and Jacquot, J.-P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* 59, 143–166.
- Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.-K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B., et al. (2007). Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in

- poplar glutaredoxin C1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 7379–7384.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5, 725–738.
- Roy, A., Yang, J., and Zhang, Y. (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res.* 40, W471–477.
- Rubotham, J., Woods, K., Garcia-Salcedo, J.A., Pays, E., and Nolan, D.P. (2005). Characterization of two protein disulfide isomerases from the endocytic pathway of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 280, 10410–10418.
- Rudresh, Jain, R., Dani, V., Mitra, A., Srivastava, S., Sarma, S.P., Varadarajan, R., and Ramakumar, S. (2002). Structural consequences of replacement of an alpha-helical Pro residue in *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Eng.* 15, 627–633.
- Ruoppolo, M., Lundström-Ljung, J., Talamo, F., Pucci, P., and Marino, G. (1997). Effect of glutaredoxin and protein disulfide isomerase on the glutathione-dependent folding of ribonuclease A. *Biochemistry* 36, 12259–12267.
- Sagemark, J., Elgán, T.H., Bürglin, T.R., Johansson, C., Holmgren, A., and Berndt, K.D. (2007). Redox properties and evolution of human glutaredoxins. *Proteins* 68, 879–892.
- Sakai, J., Li, J., Subramanian, K.K., Mondal, S., Bajrami, B., Hattori, H., Jia, Y., Dickinson, B.C., Zhong, J., Ye, K., et al. (2012). Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. *Immunity* 37, 1037–1049.
- Salmon, D., Geuskens, M., Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., Nolan, D., Ruben, L., and Pays, E. (1994). A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. *Cell* 78, 75–86.
- Salmon, D., Vanwalleghem, G., Morias, Y., Denoëud, J., Krumbholz, C., Lhommé, F., Bachmaier, S., Kador, M., Gossmann, J., Dias, F.B.S., et al. (2012). Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science* 337, 463–466.
- Sandberg, V.A., Kren, B., Fuchs, J.A., and Woodward, C. (1991). *Escherichia coli* glutaredoxin: cloning and overexpression, thermodynamic stability of the oxidized and reduced forms, and report of an N-terminal extended species. *Biochemistry* 30, 5475–5484.
- Santos, J., Marino-Buslje, C., Kleinman, C., Ermácora, M.R., and Delfino, J.M. (2007). Consolidation of the thioredoxin fold by peptide recognition: interaction between *E. coli* thioredoxin fragments 1-93 and 94-108. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 5148–5159.
- Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M.A., and Ferrer-Sueta, G. (2013). Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 435, 74–82.
- Schad, E., Tompa, P., and Hegyi, H. (2011). The relationship between proteome size, structural disorder and organism complexity. *Genome Biol.* 12, R120.
- Schlecker, T., Comini, M.A., Melchers, J., Ruppert, T., and Krauth-Siegel, R.L. (2007). Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 405, 445–454.
- Schlecker, T., Schmidt, A., Dirdjaja, N., Voncken, F., Clayton, C., and Krauth-Siegel, R.L. (2005). Substrate specificity, localization, and essential role of the glutathione peroxidase-type tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 280, 14385–14394.
- Schmidt, A., Clayton, C.E., and Krauth-Siegel, R.L. (2002). Silencing of the thioredoxin gene in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 207–210.
- Schmidt, H., and Krauth-Siegel, R.L. (2003). Functional and physicochemical characterization of the thioredoxin system in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 278, 46329–46336.
- Schneider, A. (2001). Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int. J. Parasitol.* 31, 1403–1415.
- Schwartz, K.J., Peck, R.F., and Bangs, J.D. (2013). Intracellular trafficking and glycobiology of TbPDI2, a stage-specific protein disulfide isomerase in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* 12, 132–141.
- Schwarzländer, M., Murphy, M.P., Duchon, M.R., Logan, D.C., Fricker, M.D., Halestrap, A.P., Müller, F.L., Rizzuto, R., Dick, T.P., Meyer, A.J., et al. (2012). Mitochondrial “flashes”: a radical concept repHined. *Trends Cell Biol.* 22, 503–508.
- Seed, J.R., and Wenck, M.A. (2003). Role of the long slender to short stumpy transition in the life cycle of the african trypanosomes. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 3.
- Shakamuri, P., Zhang, B., and Johnson, M.K. (2012). Monothiol glutaredoxins function in storing and transporting [Fe2S2] clusters assembled on IscU scaffold proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 15213–15216.
- Shannon, R.D. (1976). Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. Sect. B* 32, 751–767.
- Sharma, A.K., Pallesen, L.J., Spang, R.J., and Walden, W.E. (2010). Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 26745–26751.
- Sharma, R., Gluenz, E., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., and Carrington, M. (2009). The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends Parasitol.* 25, 517–524.
- Shen, Y., and Bax, A. (2010). Prediction of Xaa-Pro peptide bond conformation from sequence and chemical shifts. *J. Biomol. NMR* 46, 199–204.
- Shenton, D., Perrone, G., Quinn, K.A., Dawes, I.W., and Grant, C.M. (2002). Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 16853–16859.
- Shi, J., Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Holmgren, A., and Rosen, B.P. (1999). Reactivity of glutaredoxins 1, 2, and 3 from *Escherichia coli* shows that glutaredoxin 2 is the primary hydrogen donor to ArsC-catalyzed arsenate reduction. *J. Biol. Chem.* 274, 36039–36042.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Wang, X., Dewell, S., and Cross, G.A.M. (2010). Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res.* 38, 4946–4957.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011).

- Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7.
- Sigrist, C.J.A., de Castro, E., Cerutti, L., Cucho, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., and Xenarios, I. (2012). New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41, D344–D347.
- Silva, G.M., Netto, L.E.S., Discola, K.F., Piassa-Filho, G.M., Pimenta, D.C., Bárcena, J.A., and Demasi, M. (2008). Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. *FEBS J.* 275, 2942–2955.
- Simarro, P.P., Cecchi, G., Franco, J.R., Paone, M., Diarra, A., Ruiz-Postigo, J.A., Fèvre, E.M., Mattioli, R.C., and Jannin, J.G. (2012). Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1859.
- Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., and Jannin, J.G. (2011). The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1007.
- Simpson, A.G.B., Lukes, J., and Roger, A.J. (2002). The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.* 19, 2071–2083.
- Simpson, A.G.B., Stevens, J.R., and Lukes, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22, 168–174.
- Singha, U.K., Peprah, E., Williams, S., Walker, R., Saha, L., and Chaudhuri, M. (2008). Characterization of the mitochondrial inner membrane protein translocator Tim17 from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159, 30–43.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *PROTEOMICS* 4, 1581–1590.
- Smíd, O., Horáková, E., Vilímová, V., Hrdy, I., Cammack, R., Horváth, A., Lukes, J., and Tachezy, J. (2006). Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 281, 28679–28686.
- Smith, D.K., Radivojac, P., Obradovic, Z., Dunker, A.K., and Zhu, G. (2003). Improved amino acid flexibility parameters. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 12, 1060–1072.
- Sodano, P., Chary, K.V., Björnberg, O., Holmgren, A., Kren, B., Fuchs, J.A., and Wüthrich, K. (1991a). Nuclear magnetic resonance studies of recombinant *Escherichia coli* glutaredoxin. Sequence-specific assignments and secondary structure determination of the oxidized form. *Eur. J. Biochem.* 200, 369–377.
- Sodano, P., Xia, T.H., Bushweller, J.H., Björnberg, O., Holmgren, A., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1991b). Sequence-specific <sup>1</sup>H n.m.r. assignments and determination of the three-dimensional structure of reduced *Escherichia coli* glutaredoxin. *J. Mol. Biol.* 221, 1311–1324.
- Söderberg, B.O., Sjöberg, B.M., Sonnerstam, U., and Brändén, C.I. (1978). Three-dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5827–5830.
- Sokolova, A.Y., Wyllie, S., Patterson, S., Oza, S.L., Read, K.D., and Fairlamb, A.H. (2010). Cross-resistance to nitro drugs and implications for treatment of human African trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2893–2900.
- Sreerama, N., and Woody, R.W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287, 252–260.
- Srinivasan, U., Mieyal, P.A., and Mieyal, J.J. (1997). pH profiles indicative of rate-limiting nucleophilic displacement in thioltransferase catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 3199–3206.
- Steenkamp, D.J. (2002). Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 105–121.
- Stehr, M., and Lindqvist, Y. (2004). NrdH-redoxin of *Corynebacterium ammoniagenes* forms a domain-swapped dimer. *Proteins* 55, 613–619.
- Stehr, M., Schneider, G., Aslund, F., Holmgren, A., and Lindqvist, Y. (2001). Structural basis for the thioredoxin-like activity profile of the glutaredoxin-like NrdH-redoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 35836–35841.
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Dover, G.A., and Gibson, W.C. (1999). The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118 ( Pt 1), 107–116.
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J., and Gibson, W. (2001). The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 48, 1–56.
- Steverding, D. (1998). Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* require only small amounts of iron for growth. *Parasitol. Res.* 84, 59–62.
- Steverding, D. (2008). The history of African trypanosomiasis. *Parasit Vectors* 1, 3.
- Steverding, D. (2010). The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasit Vectors* 3, 15.
- Steverding, D., Sexton, D.W., Wang, X., Gehrke, S.S., Wagner, G.K., and Caffrey, C.R. (2012). *Trypanosoma brucei*: chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. *Int. J. Parasitol.* 42, 481–488.
- Steverding, D., Stierhof, Y.D., Fuchs, H., Tauber, R., and Overath, P. (1995). Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.* 131, 1173–1182.
- Ströher, E., and Millar, A.H. (2012). The biological roles of glutaredoxins. *Biochem. J.* 446, 333–348.
- Su, D., Berndt, C., Fomenko, D.E., Holmgren, A., and Gladyshev, V.N. (2007). A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins. *Biochemistry* 46, 6903–6910.
- Su, D., Novoselov, S.V., Sun, Q.-A., Moustafa, M.E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J. Biol. Chem.* 280, 26491–26498.
- Subramanian, P., Rodrigues, A.V., Ghimire-Rijal, S., and Stemmler, T.L. (2011). Iron chaperones for mitochondrial Fe-S

- cluster biosynthesis and ferritin iron storage. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 312–318.
- Suhara, K., Kanayama, K., Takemori, S., and Katagiri, M. (1974). Bovine adrenal steroid hydroxylase system III. Reconstitution of adrenal iron-sulfur protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* 336, 309–317.
- Sutak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J., and Richardson, D.R. (2008). Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* 16, 261–268.
- Tabor, C.W., and Tabor, H. (1970). The complete conversion of spermidine to a peptide derivative in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 232–238.
- Takusagawa, F. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES2) is a glutathione-dependent heme protein, and dithiothreitol dissociates the bound heme to produce active prostaglandin E2 synthase in vitro. *J. Biol. Chem.* 288, 10166–10175.
- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E., and Ros, J. (2003). Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 25745–25751.
- Tang, G.W., and Altman, R.B. (2011). Remote thioredoxin recognition using evolutionary conservation and structural dynamics. *Struct. Lond. Engl.* 19, 461–470.
- Taylor, M.C., and Kelly, J.M. (2010). Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection. *Parasitology* 137, 899–917.
- Taylor, M.C., McLatchie, A.P., and Kelly, J.M. (2013). Evidence that transport of iron from the lysosome to the cytosol in African trypanosomes is mediated by a mucolipin orthologue. *Mol. Microbiol. (en prensa)*.
- Tetaud, E., and Fairlamb, A.H. (1998). Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 96, 111–123.
- Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, A.R., Parkin, D.W., Baltz, D., Biteau, N., Baltz, T., and Fairlamb, A.H. (2001). Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent trypanothione peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 171–183.
- Thomson, L., Denicola, A., and Radi, R. (2003). The trypanothione-thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 55–64.
- Tomás, A.M., and Castro, H. (2012). Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. *Antioxid. Redox Signal.*
- Tompa, P. (2009). Bioinformatics Approaches to the Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins. In *From Protein Structure to Function with Bioinformatics*, D.J. Rigden, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 113–140.
- Tompa, P. (2011). Unstructural biology coming of age. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 419–425.
- Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1486–1500.
- Torreele, E., Bourdin Trunz, B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G., Bray, M.A., and Pécou, B. (2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4.
- Torrie, L.S., Wyllie, S., Spinks, D., Oza, S.L., Thompson, S., Harrison, J.R., Gilbert, I.H., Wyatt, P.G., Fairlamb, A.H., and Fearson, J.A. (2009). Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *J. Biol. Chem.* 284, 36137–36145.
- Tran, Q.H., Arras, T., Becker, S., Holighaus, G., Ohlberger, G., and Uden, G. (2000). Role of glutathione in the formation of the active form of the oxygen sensor FNR ([4Fe-4S]FNR) and in the control of FNR function. *Eur. J. Biochem.* 267, 4817–4824.
- Tripathi, T., Rahlfs, S., Becker, K., and Bhakuni, V. (2008). Structural and stability characteristics of a monothiol glutaredoxin: glutaredoxin-like protein 1 from *Plasmodium falciparum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 946–952.
- Trujillo, M., Budde, H., Piñeyro, M.D., Stehr, M., Robello, C., Flohé, L., and Radi, R. (2004). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* 279, 34175–34182.
- Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.-P., Knoop, B., and Radi, R. (2007). Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 95–106.
- Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Thomson, L., Flohé, L., and Radi, R. (2007). Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. *Subcell. Biochem.* 44, 83–113.
- Tuntasuvan, D., Jarabrum, W., Viseshakul, N., Mohkaew, K., Borisutsuwan, S., Theeraphan, A., and Kongkanjana, N. (2003). Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. *Vet. Parasitol.* 110, 227–233.
- Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R., and Alvarez, B. (2009). Sulfenic acid—a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 3384–3392.
- Turnbull, W.B., and Daranas, A.H. (2003). On the Value of *c*: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14859–14866.
- Tuskan, G.A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313, 1596–1604.
- Tyler, K.M., Matthews, K.R., and Gull, K. (1997). The bloodstream differentiation-division of *Trypanosoma brucei* studied using mitochondrial markers. *Proc. Biol. Sci.* 264, 1481–1490.
- Urbaniak, M.D., Guther, M.L.S., and Ferguson, M.A.J. (2012). Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS ONE* 7, e36619.
- Urbaniak, M.D., Guther, M.L.S., and Ferguson, M.A.J. (2012). Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS ONE* 7, e36619.
- Uversky, V.N. (2012). Size-exclusion chromatography in structural analysis of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 896, 179–194.

- Uversky, V.N. (2012). Size-exclusion chromatography in structural analysis of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 896, 179–194.
- Uversky, V.N. (2013). A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics. *Protein Sci.*
- Uzarska, M.A., Dutkiewicz, R., Freibert, S.-A., Lill, R., and Mühlhoff, U. (2013). The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1830–1841.
- Uzureau, P., Uzureau, S., Lecordier, L., Fontaine, F., Tebabi, P., Homblé, F., Grélard, A., Zhendre, V., Nolan, D.P., Lins, L., et al. (2013). Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense resistance to human serum. *Nature.*
- Van den Berg, S., Löfdahl, P.-A., Härd, T., and Berglund, H. (2006). Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J. Biotechnol.* 121, 291–298.
- Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., and Tielens, A.G.M. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 967–971.
- Van Laer, K., Buts, L., Foloppe, N., Vertommen, D., Van Belle, K., Wahni, K., Roos, G., Nilsson, L., Mateos, L.M., Rawat, M., et al. (2012). Mycoeredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of *Mycobacteria*. *Mol. Microbiol.* 86, 787–804.
- Van Laer, K., Dziewulska, A.M., Fislage, M., Wahni, K., Hbeddou, A., Collet, J.-F., Versées, W., Mateos, L.M., Tamu Dufe, V., and Messens, J. (2013). NrdH-redoxin of *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium glutamicum* dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase. *J. Biol. Chem.* 288, 7942–7955.
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., and Boshart, M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J. Cell. Sci.* 110 ( Pt 21), 2661–2671.
- Velez, N., Brautigam, C.A., and Phillips, M.A. (2013). *Trypanosoma brucei* S-adenosylmethionine decarboxylase N terminus is essential for allosteric activation by the regulatory subunit prozyme. *J. Biol. Chem.* 288, 5232–5240.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304–1351.
- Vickerman, K. (1969). On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J. Cell. Sci.* 5, 163–193.
- Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* 41, 105–114.
- Vickers, T.J., and Fairlamb, A.H. (2004). Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J. Biol. Chem.* 279, 27246–27256.
- Vickers, T.J., and Fairlamb, A.H. (2004). Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J. Biol. Chem.* 279, 27246–27256.
- Vickers, T.J., Wyllie, S., and Fairlamb, A.H. (2004). Leishmania major elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 279, 49003–49009.
- Vilella, F., Alves, R., Rodríguez-Manzaneque, M.T., Bellí, G., Swaminathan, S., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2004). Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron-sulphur cluster assembly. *Comp. Funct. Genomics* 5, 328–341.
- Vincendeau, P., and Bouteille, B. (2006). Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An. Acad. Bras. Ciências* 78, 645–665.
- Wang, C., Member, S., Scott, S.D., Zhang, J., Tao, Q., Fomenko, D.E., and Gladyshev, V.N. (2004). A study in modeling low-conservation protein superfamilies (Dept. of Comp. Sci., Univ. of Nebr.).
- Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.* 434, 365–381.
- Wang, L., Ouyang, B., Li, Y., Feng, Y., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., and Xia, B. (2012). Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin. *Protein Cell* 3, 714–721.
- Wang, L., Ouyang, B., Li, Y., Feng, Y., Jacquot, J.-P., Rouhier, N., and Xia, B. (2012). Glutathione regulates the transfer of iron-sulfur cluster from monothiol and dithiol glutaredoxins to apo ferredoxin. *Protein Cell* 3, 714–721.
- Wang, L., Ren, X., Li, Y., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Jin, C., and Xia, B. (2011). <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>15</sup>N resonance assignments of reduced GrxS14 from *Populus tremula* × *tremuloides*. *Biomol. NMR Assignments* 5, 121–124.
- Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., and Kang, C.H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat. Struct. Biol.* 5, 476–483.
- Wang, W., and Ballatori, N. (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.* 50, 335–356.
- Wang, Y., He, Y.X., Yu, J., and Zhou, C.Z. (2009). Cloning, overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of yeast glutaredoxin Grx5. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun* 65, 651–653.
- Wang, Y., He, Y.X., Yu, J., and Zhou, C.Z. (2009). Cloning, overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of yeast glutaredoxin Grx5. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun* 65, 651–653.
- Welburn, S., and Maudlin, I. (1999). Tsetse–Trypanosome Interactions: Rites of Passage. *Parasitology Today* 15, 399–403.
- Welburn, S.C., and Maudlin, I. (2012). Priorities for the elimination of sleeping sickness. *Adv. Parasitol.* 79, 299–337.
- Welburn, S.C., Macleod, E., Figarella, K., and Duzensko, M. (2006). Programmed cell death in African trypanosomes. *Parasitology* 132 Suppl, S7–S18.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–673.
- Wickstead, B., Ersfeld, K., and Gull, K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 211–216.
- Wiedemann, N., Urzica, E., Guiard, B., Müller, H., Lohaus, C., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Meisinger, C., Mühlhoff, U., Lill, R.,

- et al. (2006). Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J.* 25, 184–195.
- Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J.A., and Smith, L.J. (1999). Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 16424–16431.
- Wilkinson, S.R., Horn, D., Prathalingam, S.R., and Kelly, J.M. (2003). RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *J. Biol. Chem.* 278, 31640–31646.
- Wilkinson, S.R., Meyer, D.J., Taylor, M.C., Bromley, E.V., Miles, M.A., and Kelly, J.M. (2002). The Trypanosoma cruzi enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* 277, 17062–17071.
- Wilkinson, S.R., Prathalingam, S.R., Taylor, M.C., Ahmed, A., Horn, D., and Kelly, J.M. (2006). Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in Trypanosoma brucei. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 198–209.
- Williams, D.L., Bonilla, M., Gladyshev, V.N., and Salinas, G. (2012). Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. *Antioxid. Redox Signal.*
- Wilson, J.M., Bayer, R.J., and Hupe, D.J. (1977). Structure-reactivity correlations for the thiol-disulfide interchange reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 7922–7926.
- Wingert, R.A., Galloway, J.L., Barut, B., Foott, H., Fraenkel, P., Axe, J.L., Weber, G.J., Dooley, K., Davidson, A.J., Schmid, B., et al. (2005). Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436, 1035–1039.
- Witt, A.C., Lakshminarasimhan, M., Remington, B.C., Hasim, S., Pozharski, E., and Wilson, M.A. (2008). Cysteine pKa depression by a protonated glutamic acid in human DJ-1. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 7430–7440.
- Witt, A.C., Lakshminarasimhan, M., Remington, B.C., Hasim, S., Pozharski, E., and Wilson, M.A. (2008). Cysteine pKa depression by a protonated glutamic acid in human DJ-1. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 7430–7440.
- Wolf, Y.I., Brenner, S.E., Bash, P.A., and Koonin, E.V. (1999). Distribution of protein folds in the three superkingdoms of life. *Genome Res.* 9, 17–26.
- Wu, G., Li, P., and Wu, X. (2008). Regulation of Escherichia coli IscS desulfurase activity by ferrous iron and cysteine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 399–404.
- Wyllie, S., Vickers, T.J., and Fairlamb, A.H. (2008). Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1359–1365.
- Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (2001). Solution structure of Escherichia coli glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione-S-transferases. *J. Mol. Biol.* 310, 907–918.
- Xia, T.H., Bushweller, J.H., Sodano, P., Billeter, M., Björnberg, O., Holmgren, A., and Wüthrich, K. (1992). NMR structure of oxidized Escherichia coli glutaredoxin: comparison with reduced E. coli glutaredoxin and functionally related proteins. *Protein Sci.* 1, 310–321.
- Xing, S., and Zachgo, S. (2008). ROXY1 and ROXY2, two Arabidopsis glutaredoxin genes, are required for anther development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 53, 790–801.
- Xing, S., Rosso, M.G., and Zachgo, S. (2005). ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in Arabidopsis thaliana. *Development* 132, 1555–1565.
- Xiong, Y., Uys, J.D., Tew, K.D., and Townsend, D.M. (2011). S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling* 15, 233–270.
- Xu, X.M., and Møller, S.G. (2008). Iron-sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *ChemBiochem* 9, 2355–2362.
- Yamada, T., Komoto, J., Watanabe, K., Ohmiya, Y., and Takusagawa, F. (2005). Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J. Mol. Biol.* 348, 1163–1176.
- Yang, Y.F., and Wells, W.W. (1991). Catalytic mechanism of thioltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 12766–12771.
- Ye, H., and Rouault, T.A. (2010). Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 4945–4956.
- Ye, H., Jeong, S.Y., Ghosh, M.C., Kovtunovych, G., Silvestri, L., Ortillo, D., Uchida, N., Tisdale, J., Camaschella, C., and Rouault, T.A. (2010). Glutaredoxin 5 deficiency causes sideroblastic anemia by specifically impairing heme biosynthesis and depleting cytosolic iron in human erythroblasts. *J. Clin. Invest.* 120, 1749–1761.
- Yeh, A.P., Chatelet, C., Soltis, S.M., Kuhn, P., Meyer, J., and Rees, D.C. (2000). Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from Aquifex aeolicus. *J. Mol. Biol.* 300, 587–595.
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Willams, E.R., and Butland, G. (2011). The E. coli monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 8957–8969.
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K., and Hisabori, T. (2013). Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 54, 875–892.
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K., and Hisabori, T. (2013). Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 54, 875–892.
- Yu, J., Zhang, N.-N., Yin, P.-D., Cui, P.-X., and Zhou, C.-Z. (2008). Glutathionylation-triggered conformational changes of glutaredoxin Grx1 from the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proteins* 72, 1077–1083.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Couturier, J.R.M., Gao, X.-H., Rouhier, N., Trost, P., and Lemaire, S.P.D. (2012). Glutaredoxin s12: unique properties for redox signaling. *Antioxidants Redox Signal.* 16, 17–32.
- Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P., and Lemaire, S.D. (2008). Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *J. Biol. Chem.* 283, 8868–8876.
- Zarsky, V., Tachezy, J., and Dolezal, P. (2012). Tom40 is likely common to all mitochondria. *Curr. Biol.* 22, R479–481; author reply R481–482.
- Zhang, B., Bandyopadhyay, S., Shakamuri, P., Naik, S.G., Huynh, B.H., Couturier, J., Rouhier, N., and Johnson, M.K.

(2013). Monothiol Glutaredoxins Can Bind Linear  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^+$  and  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  Clusters in Addition to  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$  Clusters: Spectroscopic Characterization and Functional Implications. *J. Am. Chem. Soc.* (en prensa)

Zhang, X., Cui, J., Nilsson, D., Gunasekera, K., Chanfon, A., Song, X., Wang, H., Xu, Y., and Ochsenreiter, T. (2010). The *Trypanosoma brucei* MitoCarta and its regulation and splicing pattern during development. *Nucleic Acids Res.* 38, 7378–7387.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40.

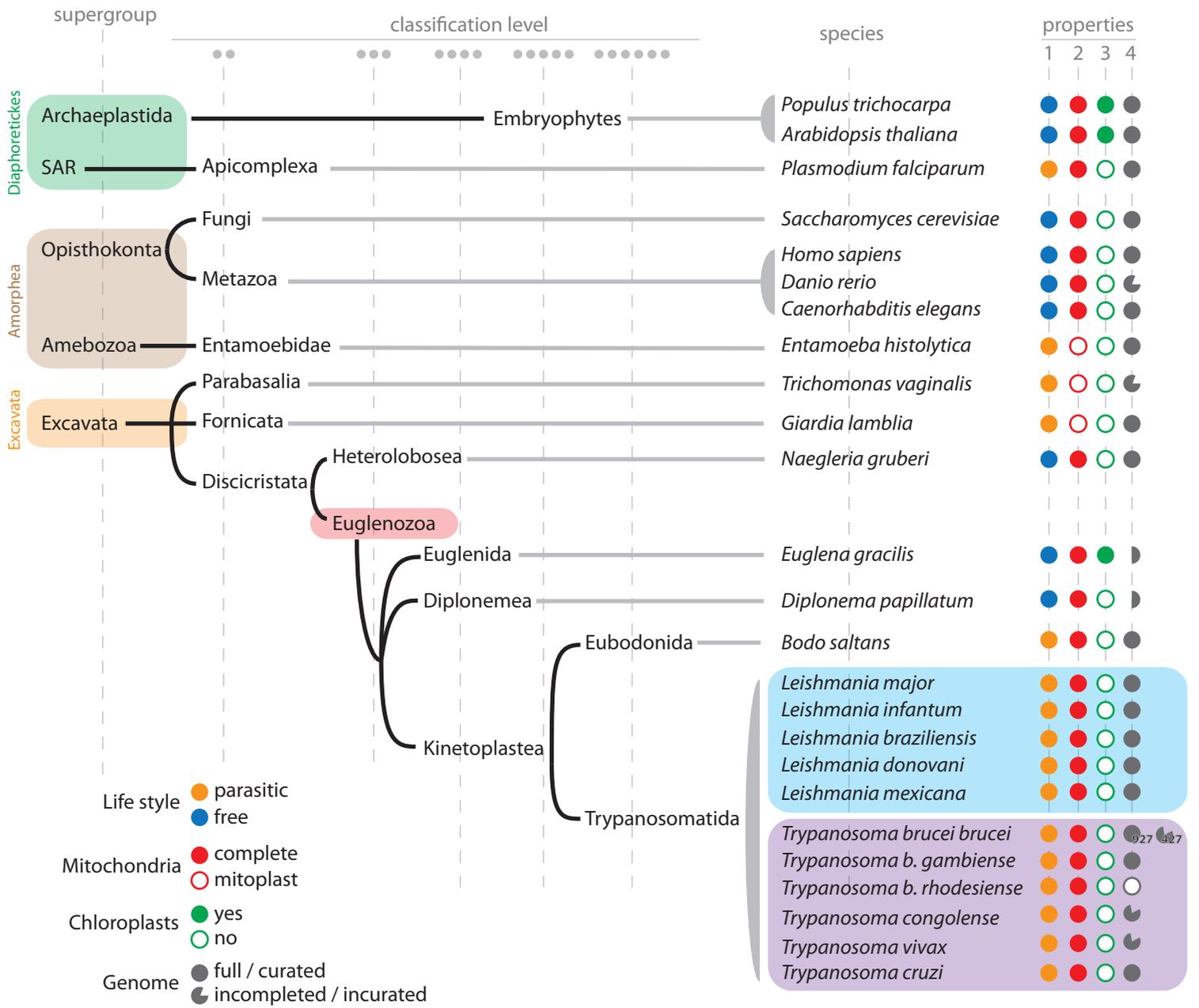
Ziemann, M., Bhave, M., and Zachgo, S. (2009). Origin and diversification of land plant CC-type glutaredoxins. *Genome Biol Evol* 1, 265–277.

# **Figuras**

**Tesis Doctorado Bruno Manta**

## Figura 1.1. Clasificación y relaciones evolutivas entre eucariotas

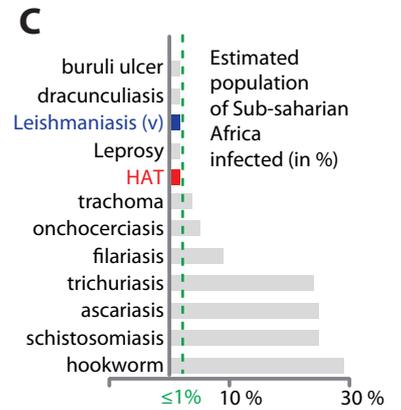
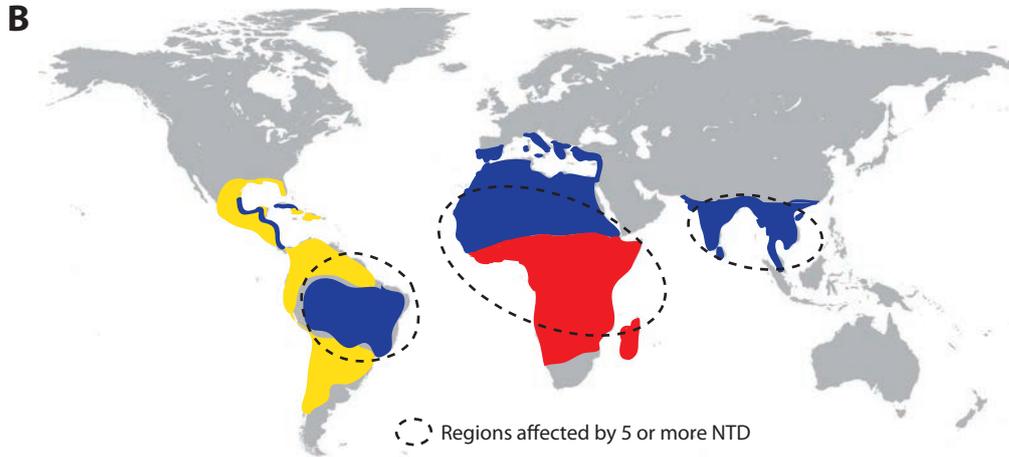
En la figura se muestra una versión simplificada y actualizada del árbol de relaciones filogenéticas entre organismos del dominio "Eukarya" con particular atención a los grupos de protozoarios que contienen y están emparentados con los tripanosomátidos, basado en (Adl et al., 2012). Los supergrupos se indican a la izquierda, coloreados por clado y las restantes columnas se codifican con círculos como en (Adl et al., 2012) para permitir una identificación adecuada en las tablas correspondientes. En todos los casos se omiten niveles, indicando solo la clasificación más conocida o necesaria para este trabajo. SAR es la sigla para el supergrupo "Stramenopiles, Alveolates y Rhizaria". La línea que va hacia la especie se identifica en gris y la que identifica clasificaciones superiores en negro. En la **columna 1** se indica si la especie seleccionada para representar al grupo es de vida libre (azul) o parásita (naranja); en la **columna 2** se indica la presencia (círculo lleno) o ausencia (círculo vacío) de una mitocondria completa y funcional en al menos una etapa de la vida del organismo; en la **columna 3** se indica la presencia (círculo lleno) o ausencia (círculo vacío) de cloroplastos, asumiendo que los organismos que poseen plástidos son al menos parcialmente fototróficos. En la **columna 4** se indica si el genoma de la especie representativa está disponible y la completitud del mismo. Las columnas 1 - 4 refieren a la especie representativa indicada y no necesariamente al grupo en cuestión. Las referencias para los genomas son las siguientes: *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006), *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), *Homo sapiens* (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), *Danio rerio* (información parcial en [http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)), *Caenorhabditis elegans* (C. elegans Sequencing Consortium, 1998), *Entamoeba histolytica* (Loftus et al., 2005), *Plasmodium falciparum* (Gardner et al., 2002), *Trichomonas vaginalis* (Carlton et al., 2007), *Giardia lamblia* (Morrison et al., 2007) y *Naegleria gruberi* (Fritz-Laylin et al., 2010). En la parte inferior se desarrollan las relaciones filogenéticas dentro del grupo *Euglenozoa* hasta los tripanosomátidos. Las especies de *Leishmania* spp. (celeste) y *Trypanosoma* spp. (violeta) se indican con el nombre de uso habitual en la literatura el cual no necesariamente coincide con su clasificación taxonómica más aceptada en la actualidad (ver (Simpson et al., 2006; Stevens et al., 1999) y referencias allí citadas). Los genomas de tripanosomas y leishmanias están accesibles en GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), así como el de *Bodo saltans* (Jackson et al., 2008). Los números 427 y 927 para *T. b. brucei* refieren a cepas distintas. *T. b. rhodesiense* se considera una variable fenotípica de *T. b. brucei* (Balmer et al., 2011). Para los demás organismos existe información parcial no publicada a la cual accedimos gracias a la generosa colaboración de Michael W. Gray (Dalhousie University, Canada; *E. gracilis*), Gertraud Burger (University of Montreal, Canadá, *D. papillatus*) y Mark C. Field (University of Cambridge, UK; *E. gracilis*).



## Figura 1.2. Enfermedades tropicales desatendidas

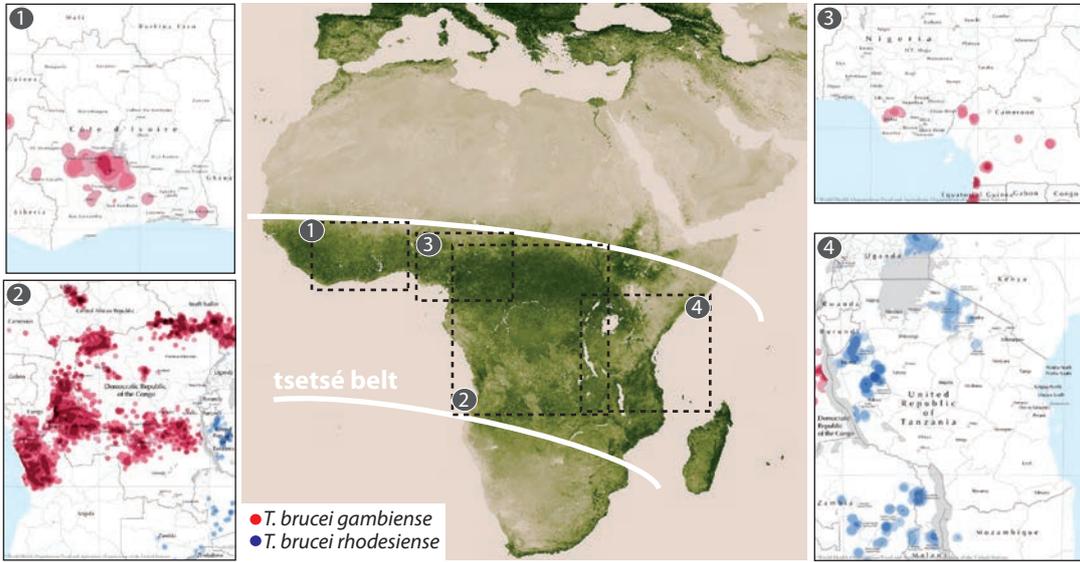
En la tabla (A) se listan las 17 NTD reconocidas por la OMS y el CDC, indicando su nombre médico, su nombre común, los agentes etiológicos más importantes, su prevalencia (número de personas infectadas) y la población viviendo en zonas endémicas, con las cifras expresadas en millones, basado en información extraída de OMS ([http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en)), CDC (<http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd>) y (Ben Beard, 2009; Hotez and Kamath, 2009). Las enfermedades causadas por protozoarios, helmitos, virus y bacterias se indican sobre fondo violeta, celeste, naranja y verde, respectivamente. Las leishmaniasis (2<sup>da</sup> fila) se separan en visceral (“v”) o cutánea (“c”). B. Regiones del mundo endémicas para leishmaniasis (azul), tripanosomiasis africana (rojo) y tripanosomiasis americana (amarillo), adaptado de (Cavalli and Bolognesi, 2009). En línea punteada se indican las zonas donde coexisten 5 o más NTD (adaptado de <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>). C. Estimado de la población del África subsahariana infectada con diferentes NTD, en base a (Hotez and Kamath, 2009). Las enfermedades transmitidas por “helmintos del suelo” (STH) se disgregan por agente infeccioso y la barra indicada como “hookworm” refiere a las infecciones causadas por *Necator americanus* y/o *Ancylostoma duodenale*. La leishmaniasis presente en esta región es exclusivamente visceral (enfermedad de “Kala-azar”).

A	Disease name	Common name	Causative agent	Prevalence	People at risk
				(in millions)	(in millions)
Protozoa	Human African trypanosomiasis	Sleeping sickness	<i>Trypanosoma brucei</i> spp.	0.3	60
	Leishmaniasis	Kala-azar (v), Lahore sore (c)	<i>Leishmania</i> spp.	12	35
	American trypanosomiasis	Chagas' disease	<i>Trypanosoma cruzi</i>	8-9	25
Helmint	Dracunculiasis	Guinea-worm disease	<i>Dracunculus medinensis</i>	0.01	unknown
	Echinococcosis	Hydatid disease	<i>Echinococcus granulosus</i> <i>E. multilocularis</i>	unknown	unknown
	Foodborne trematodiasis	Distomatosis	<i>Clonorchis sinensis</i> <i>Fasciola hepatica</i> <i>Opisthorchis viverrini</i> <i>Paragonimus westermani</i>	2.4	180
	Lymphatic filariasis	Elephantiasis	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malayi</i> <i>B. timori</i>	120	1300
	Onchocerciasis	River blindness, Robles' disease	<i>Onchocerca volvulus</i>	37	90
	Schistosomiasis	Bilharzia, Snail fever	<i>Schistosoma guineensis</i> <i>S. intercalatum</i> <i>S. mansoni</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. mekongi</i>	207	779
	Soil transmitted helminthiasis	STH, Hookworm disease	<i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Trichuris trichiura</i> <i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma duodenale</i>	~2000	~5000
	Cysticercosis	Taeniasis	<i>Taenia solium</i> <i>T. saginata</i>	50	unknown
Virus	Dengue fever	Dengue	<i>dengue virus</i>	>50	unknown
	Rabies	Rabies	<i>rabie virus</i>	>0.05	unknown
Bacteria	Buruli ulcer	Buruli ulcer	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	0.05	unknown
	Leprosy	Leprosy	<i>Mycobacterium leprae</i>	0.4	unknown
	Trachoma	Granular conjunctivitis	<i>Chlamydia trachomatis</i>	84	590
	Yaws (Frambresia tropica)	Trepanematosis	<i>Treponema pallidum</i>	unknown	unknown



### **Figura 1.3. Región endémica y focos activos para tripanosomiasis africana**

En el centro de la figura se muestra una reconstrucción satelital de la vegetación en África donde contrasta la zona arable con las regiones desérticas (adaptada de <http://www.nvnl.noaa.gov/Green.html>). Las líneas blancas delimitan la zona conocida como "cinturón tsetse". En los recuadros se muestran ampliaciones de las zonas enmarcadas en la imagen central, donde se destacan los focos activos de HAT y sus áreas de riesgo circundantes, actualizadas al año 2012. Las marcas rojas refieren a infecciones por *T. b. gambiense* y las azules a *T. b. rhodesiense* (adaptado de (Simarro et al., 2012)).



#### **Figura 1.4. Drogas usadas en el tratamiento de HAT**

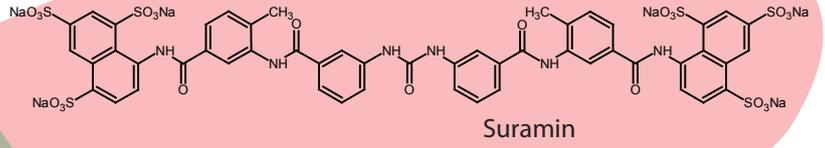
Estructuras de las drogas para el tratamiento de HAT. Las drogas usadas para el tratamiento de *T. b. gambiense* se indican sobre fondo verde y las usadas para el tratamiento de *T. b. rhodesiense* se indican en fondo rosado. El tratamiento combinado de Nifurtimox y eflornitina se indica sobre fondo celeste. Las nuevas drogas en fase de estudio clínico (ver texto) se muestran sin color de fondo. Figuras realizadas con ChemSketch en base a las estructuras reportadas en (Cavalli and Bolognesi, 2009; Jacobs et al., 2011a, 2011b; Steverding, 2010; Torreele et al., 2010).

first stage

*T. brucei gambiense*

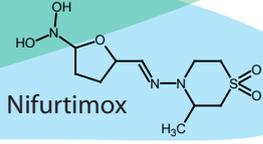
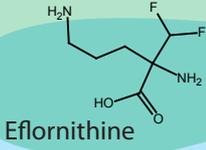
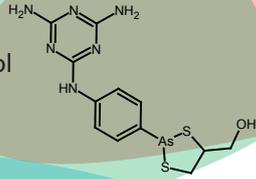


*T. brucei rhodesiense*

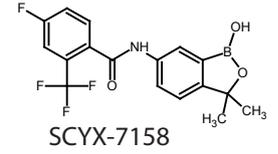
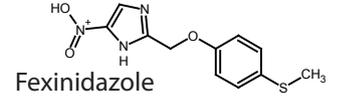
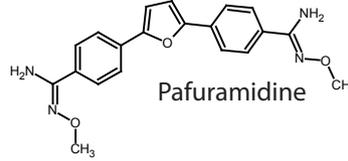


second stage

Melarsoprol



only in combination with eflornithine

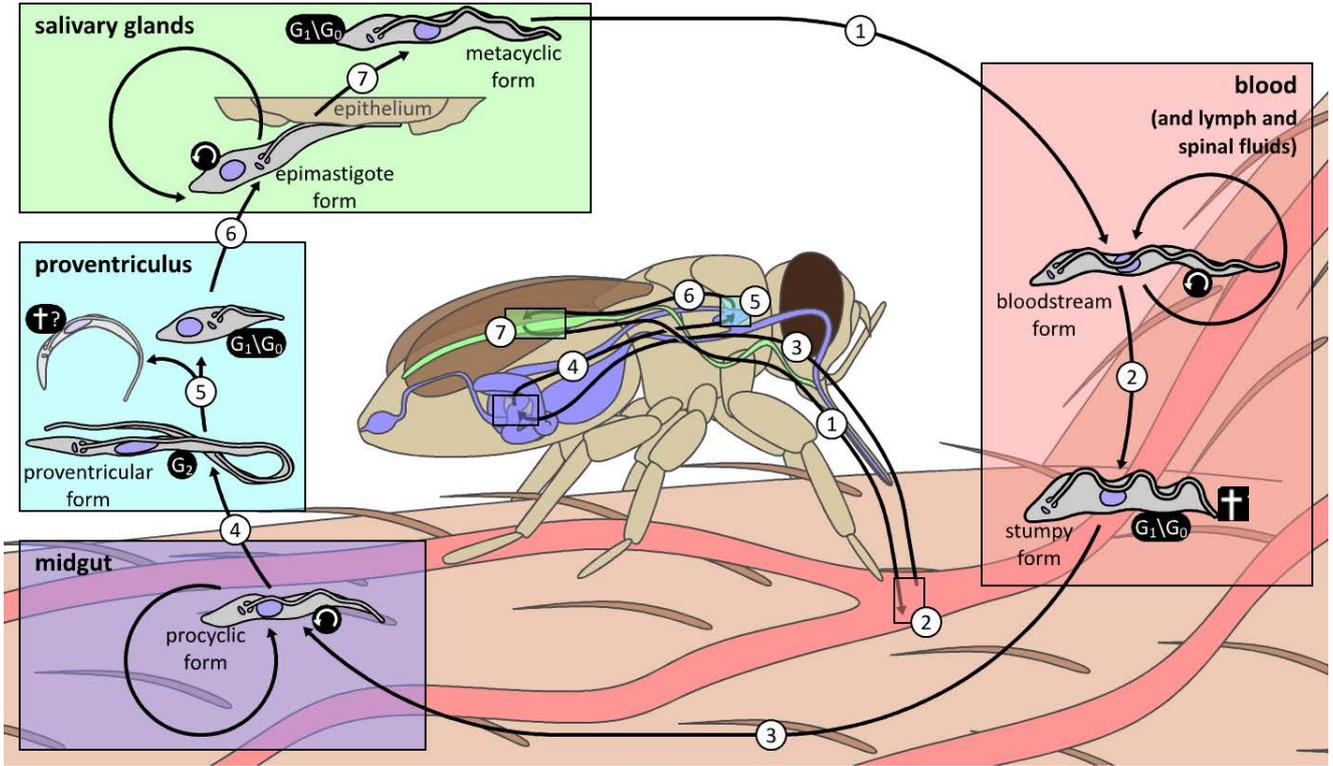


### Figura 1.5. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

El parásito es inyectado en el torrente sanguíneo del mamífero por la picadura de una *mosca* (*Glossina spp.*) infectada durante su alimentación (1). Una vez en el torrente sanguíneo el parásito prolifera indefinidamente en su forma "long-slender" (LS) produciendo cíclicamente una población de parásitos "short-stumpy" (SS, 2) incapaces de replicarse en el mamífero. Cuando una mosca se alimenta de un hospedero infectado los parásitos SS colonizan el intestino medio del invertebrado (3) y comienzan a dividirse y migran posteroanteriormente hacia las glándulas salivales, mientras se suceden distintas etapas de diferenciación (pasos 4-6). En las glándulas salivales ocurre la diferenciación final a la forma metacíclica infectiva para el mamífero (7). Para los diferentes estadios se señala la capacidad proliferativa (flecha en sentido antihorario), el arresto en determinadas etapas del ciclo celular ( $G_1$ ,  $G_0$ ,  $G_2$ ) o la capacidad de muerte celular programada (⊥). Adaptada de figura cedida gentilmente por el Dr. Richard Wheeler (<http://www.richardwheeler.net>).

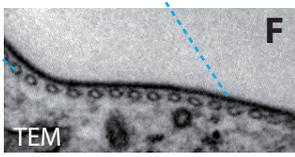
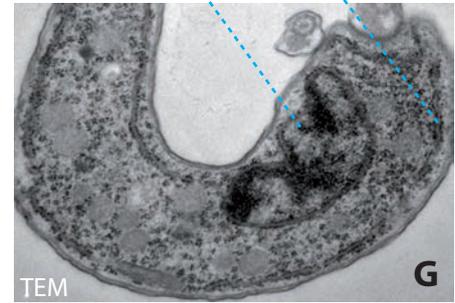
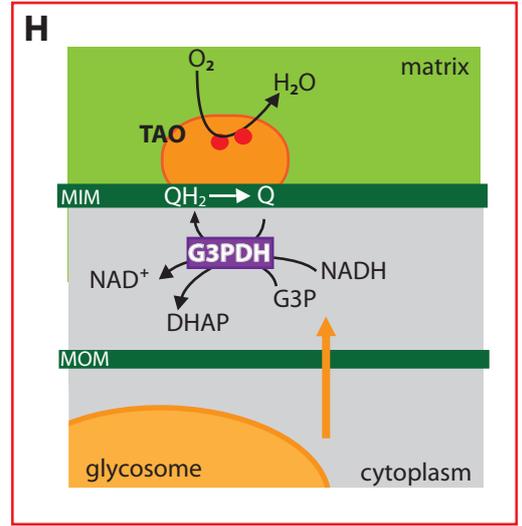
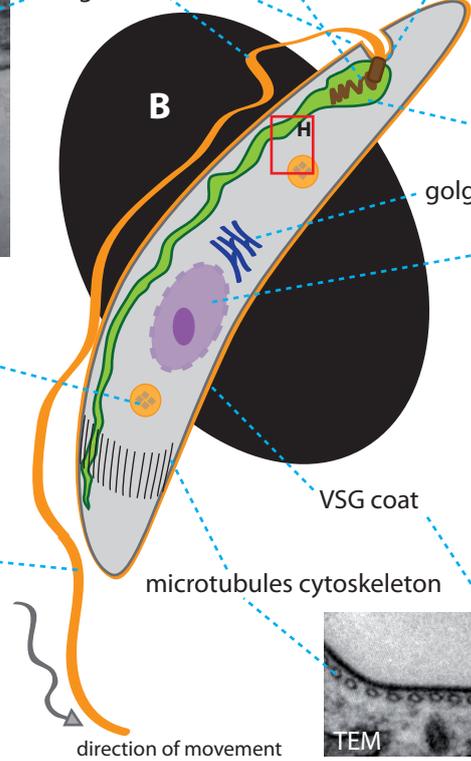
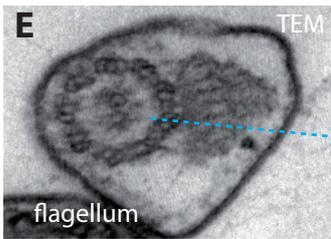
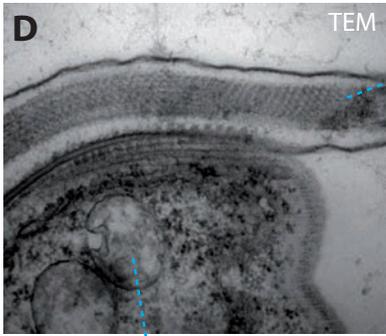
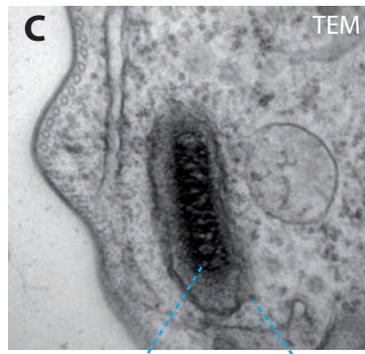
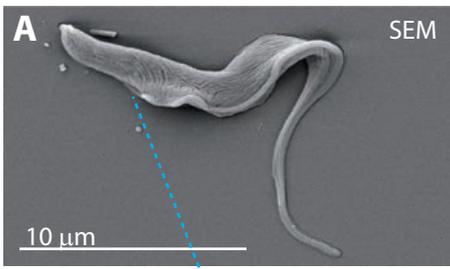
# Fly Host

# Mammal Host



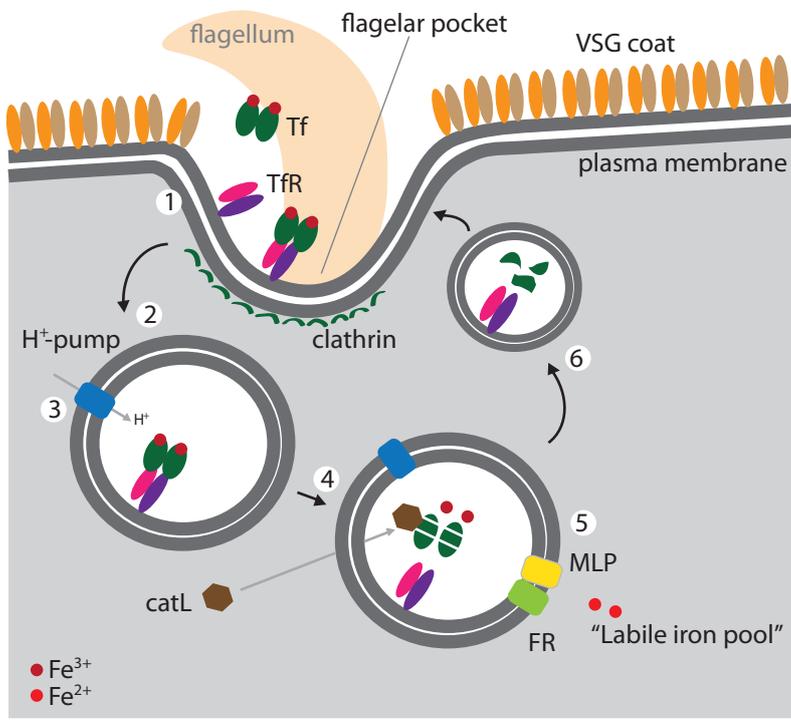
### **Figura 1.6. Esquema de la arquitectura celular de la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei***

En la figura se esquematizan los principales componentes subcelulares de la forma infectiva del parásito. **A.** Imagen de microscopía electrónica de escaneo (SEM) donde se aprecia la morfología del parásito y sus dimensiones. **B.** Esquema de algunos componentes subcelulares, detallados en las próximas partes. **C-G.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) representativas donde se aprecian los componentes indicados en B. La escala en las imágenes no es uniforme. El recuadro central (**H**), ampliado en el ángulo superior derecho, esquematiza la respiración basada en la oxidasa alternativa (TAO), la cual reduce  $O_2$  a expensas de electrones del ubiquinol ( $QH_2$ ) rindiendo ubiquinona (Q) y agua. La ubiquinona es subsecuentemente reducida a  $QH_2$  por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) en un proceso que consume glicerol-3-fosfato (G3P) proveniente de la vía glicolítica (flecha amarilla) y NADH, resultando en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y en la regeneración del  $NAD^+$  necesario para sostener el catabolismo de la glucosa. Se omiten los transportadores específicos que conectan ambos compartimentos (mitocondria y glicosoma). MOM y MIM indican membrana mitocondrial externa e interna, respectivamente. Las imágenes de SEM y TEM provienen de material no publicado autoría de M. Comini.



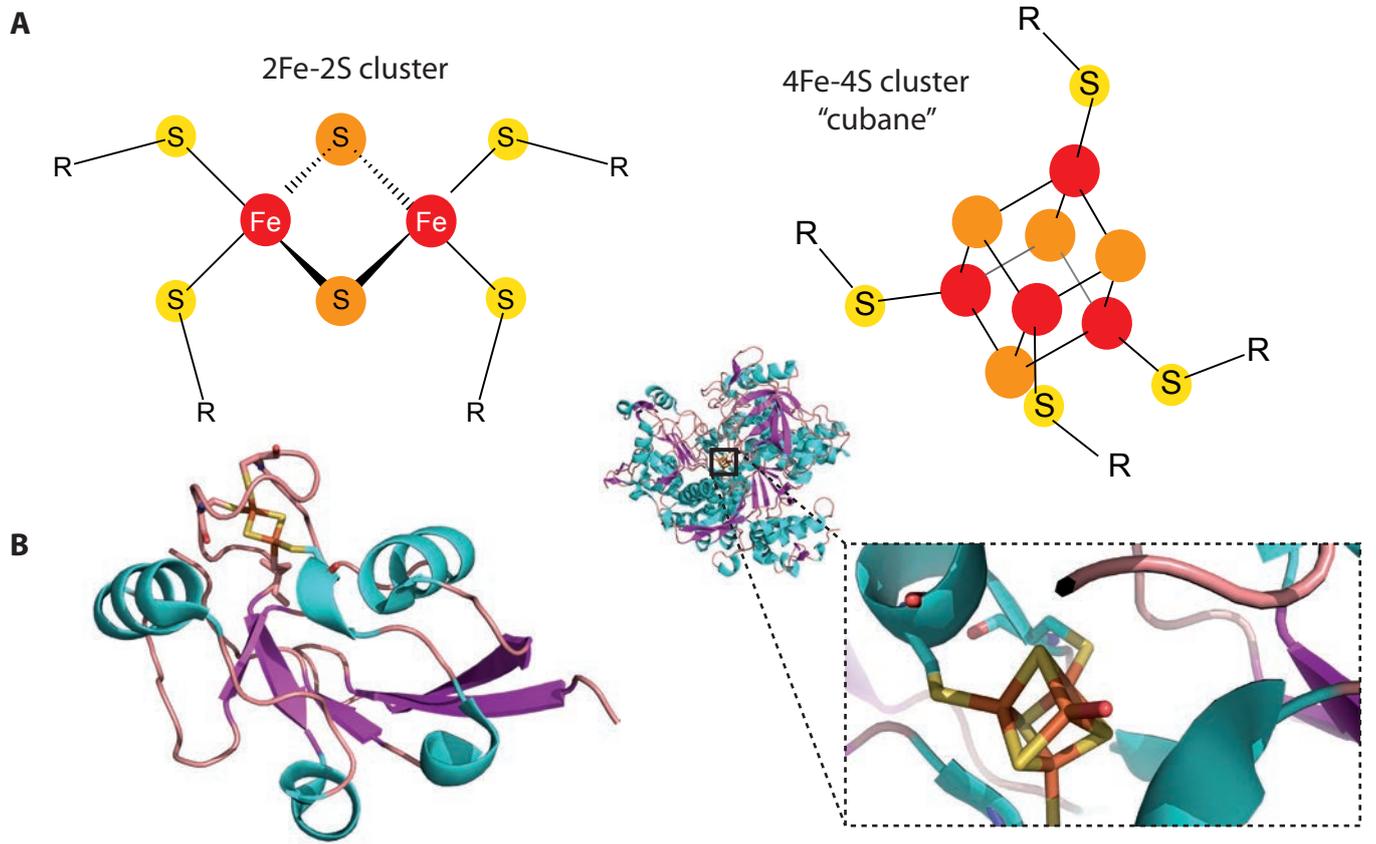
### **Figura 1.7. Adquisición de hierro por la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei***

En la figura se esquematiza la región correspondiente al bolsillo flagelar así como la vía endocítica que determina la incorporación de hierro por estos parásitos. La transferrina del hospedero (Tf) "cargada" (portando 2 átomos de hierro  $3^+$  por dímero) es unida por el receptor específico (TfR) (1) e internalizada en una vía dependiente de clatrina (2) que da lugar a la formación de un endolisosoma (3). La Tf es proteolizada por acción de la catepsina L (4) y el hierro liberado es transportado al citosol por acción de ferredoxinas (FR) y una proteína similar a mucopolisacárida (MLP) (5). Finalmente, el receptor es reciclado hacia la membrana plasmática (6) para ser usado nuevamente. Figura realizada en base a (Steverding et al., 2012; Taylor and Kelly, 2010; Taylor et al., 2013).



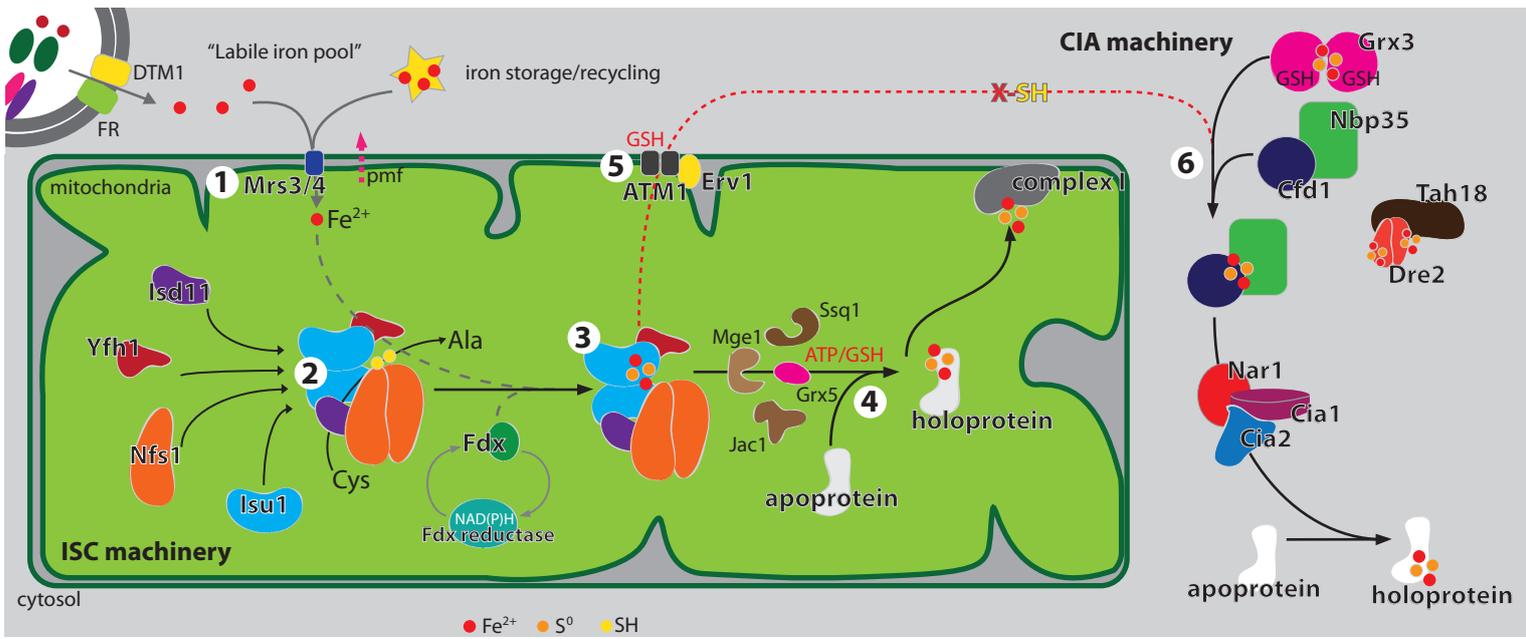
### Figura 1.8. Estructura de centros ferrosulfurados más comunes en proteínas

**A.** Representación bidimensional de centros ferrosulfurados [2Fe-2S] (*izquierda*) y [4Fe-4S] (*derecha*). Los átomos de azufre inorgánico se indican en naranja y los átomos de hierro en rojo. Los azufres de los grupos tiol ligantes se indican en amarillo. Se omiten las cargas formales para una mejor visualización. Figuras generadas con Chems sketch. **B.** Estructuras representativas de proteínas con centros ferrosulfurados como los mostrados en *A*; *izquierda*: estructura y detalle del centro ferrosulfurado [2Fe-2S] en ferredoxina humana (PDB 2YC5, Lill y colaboradores, no publicado); *derecha*: estructura y detalle (en inserto) del centro ferrosulfurado [4Fe-4S] en aconitasa citosólica humana (PDB 2B3X, (Dupuy et al., 2006)). La estructura se colorearon por estructura secundaria (turquesa para hélices  $\alpha$  y violeta para hebras  $\beta$  y marrón claro para *loops*) y se visualizan los residuos de cisteína que coordinan el centro ferrosulfurado.



### Figura 1.9. Biogénesis de centros ferrosulfurados en eucariotas

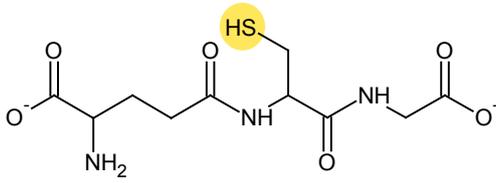
En la figura se esquematizan los pasos en la biogénesis de centros ferrosulfurados a nivel mitocondrial ("ISC machinery") y citosólico ("CIA machinery") en base a la información disponible proveniente, fundamentalmente, de *S. cerevisiae* (Lill et al., 2012) y mamíferos (Xu and Møller, 2011). El hierro es obtenido a partir de la transferrina por vía endocítica mediante la acción de transportadores de cationes divalentes (ej. DTM1) y ferrireductasas (FR) o a partir de reservorios intracelulares (ej. ferritina, ausente en levaduras) y transportado a la mitocondria por acción de transportadores específicos (ej. Msr2/3) **(1)**, donde es consumido en la biosíntesis de hemo (no mostrado) o de centros ferrosulfurados. El primer paso de esta vía depende de la acción concertada de la desulfurasa de cisteína (Nsf1) y la proteína accesoria Isd11 sobre la proteína de andamiaje Isu1. La frataxina (Yfh1) participa en el movilización/aporte de hierro y la ferredoxina (Fdx) aporta electrones para reducir el persulfuro formado sobre Nsf1 a expensas de Cys **(2)**. Fdx es reducida por su reductasa específica a expensas de NAD(P)H. El primer centro ferrosulfurado se forma sobre Isu1 **(3)** y es transferido hacia etapas posteriores de la maduración a expensas de chaperonas (Ssq1, Jac1), intercambiadores de nucleótidos (Mge1) y la glutarredoxina 5 (Grx5) **(4)**. Un producto de esta vía (indicado como X-SH) es exportado hacia el citosol a través del transportador ATM1 (en levaduras) a expensas de GSH, ATP y la proteína Erv1 **(5)**. Una vez en el citosol, este componente es usado por la maquinaria de síntesis constituida por la glutarredoxina 3 (Grx3 en levaduras) y las demás proteínas indicadas en la figura **(6)**.



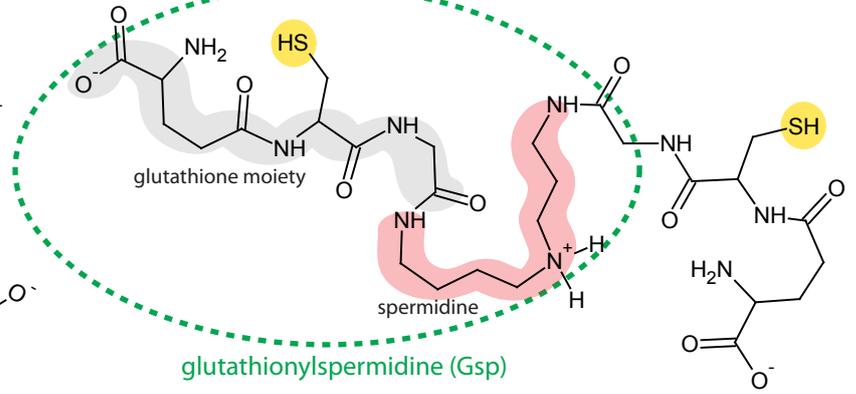
### **Figura 1.10. Tioles de bajo peso molecular de relevancia en sistemas biológicos**

En la figura se muestran las estructuras del glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), así como del tripanotión en su forma reducida (T(SH)<sub>2</sub>) y oxidada (TS<sub>2</sub>). El residuo de GSH y espermidina del T(SH)<sub>2</sub> se indican sobre fondo gris y rojo, respectivamente. Estas moléculas forman la glutationilespermidina, la cual se indica con un recuadro verde. A modo de comparación se muestran los glucotioles basados en cisteína (fondo celeste) micotiol (MSH) y baciltiol (BSH) en su forma reducida. Los grupos tiol se indican en amarillo. Las estructuras fueron realizadas con Chems sketch.

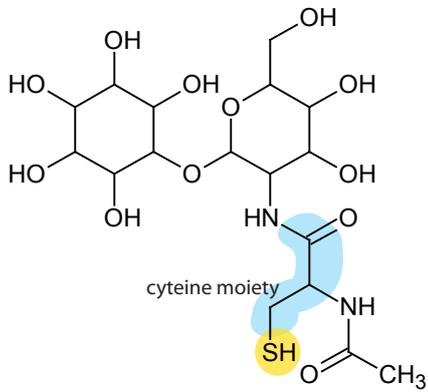
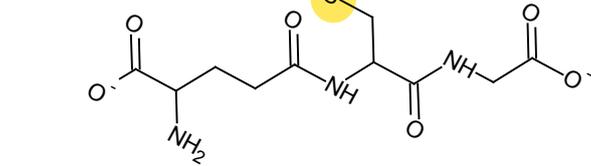
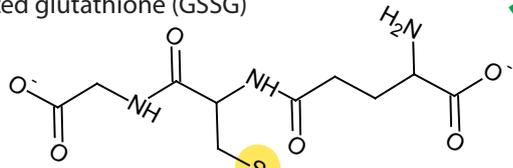
reduced glutathione (GSH)



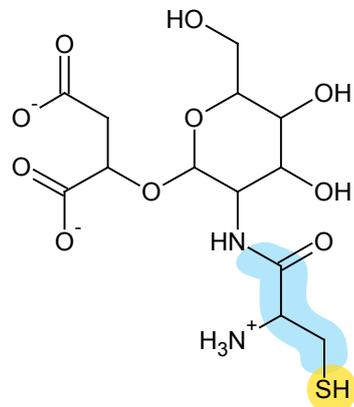
reduced trypanothione (TSH<sub>2</sub>)



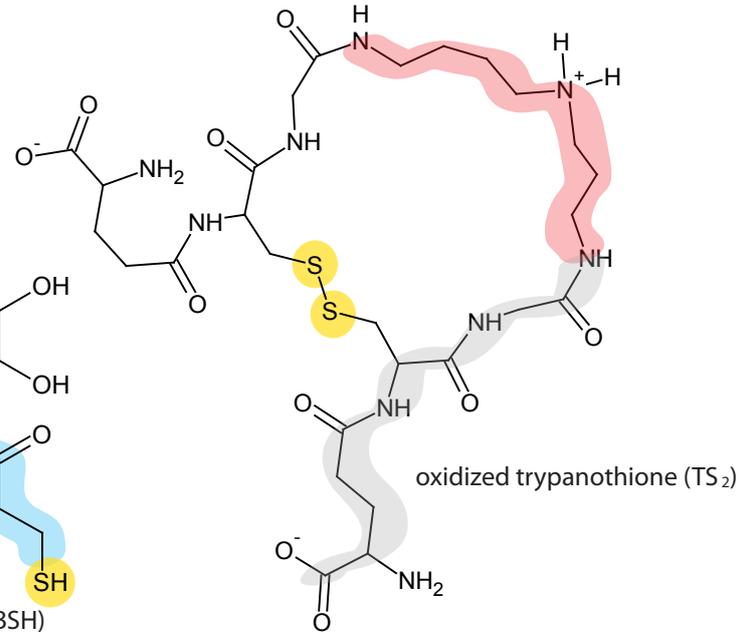
oxidized glutathione (GSSG)



reduced mycothiol (MSH)



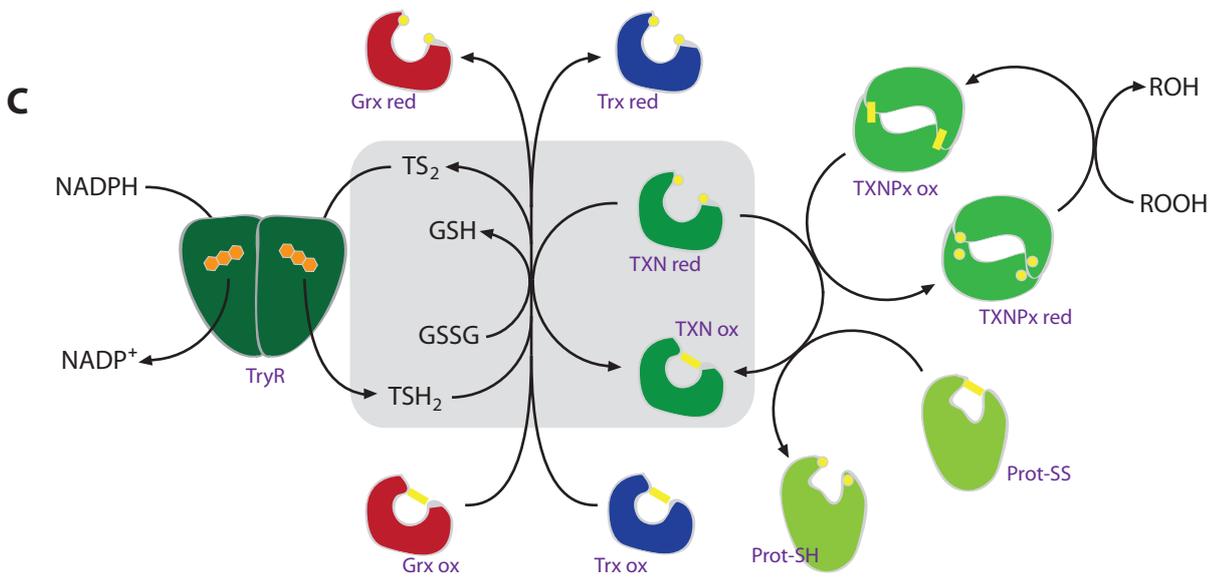
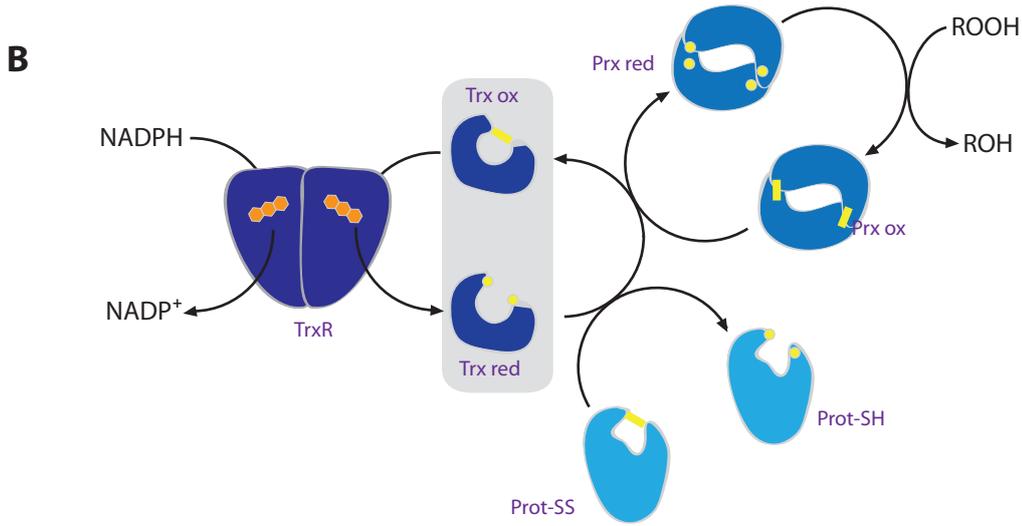
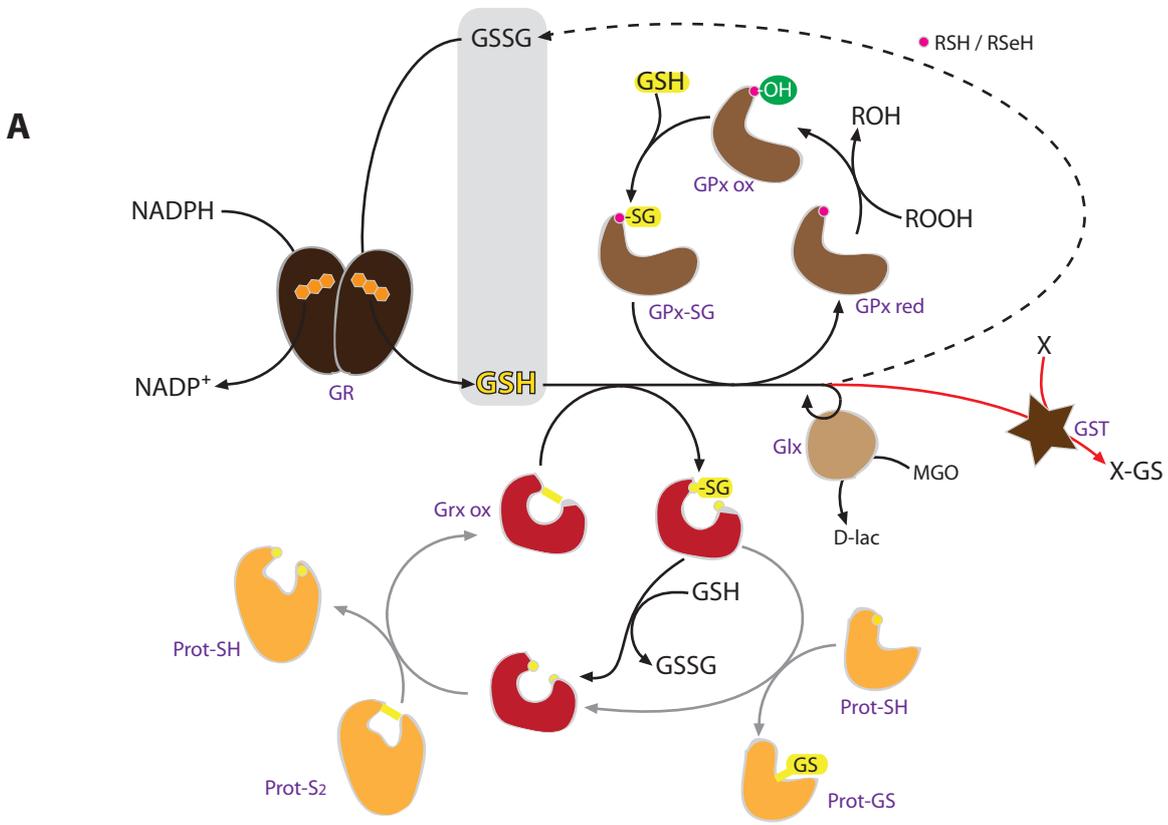
reduced bacillithiol (BSH)



oxidized trypanothione (TS<sub>2</sub>)

### **Figura 1.11. Sistemas redox dependientes de tioles**

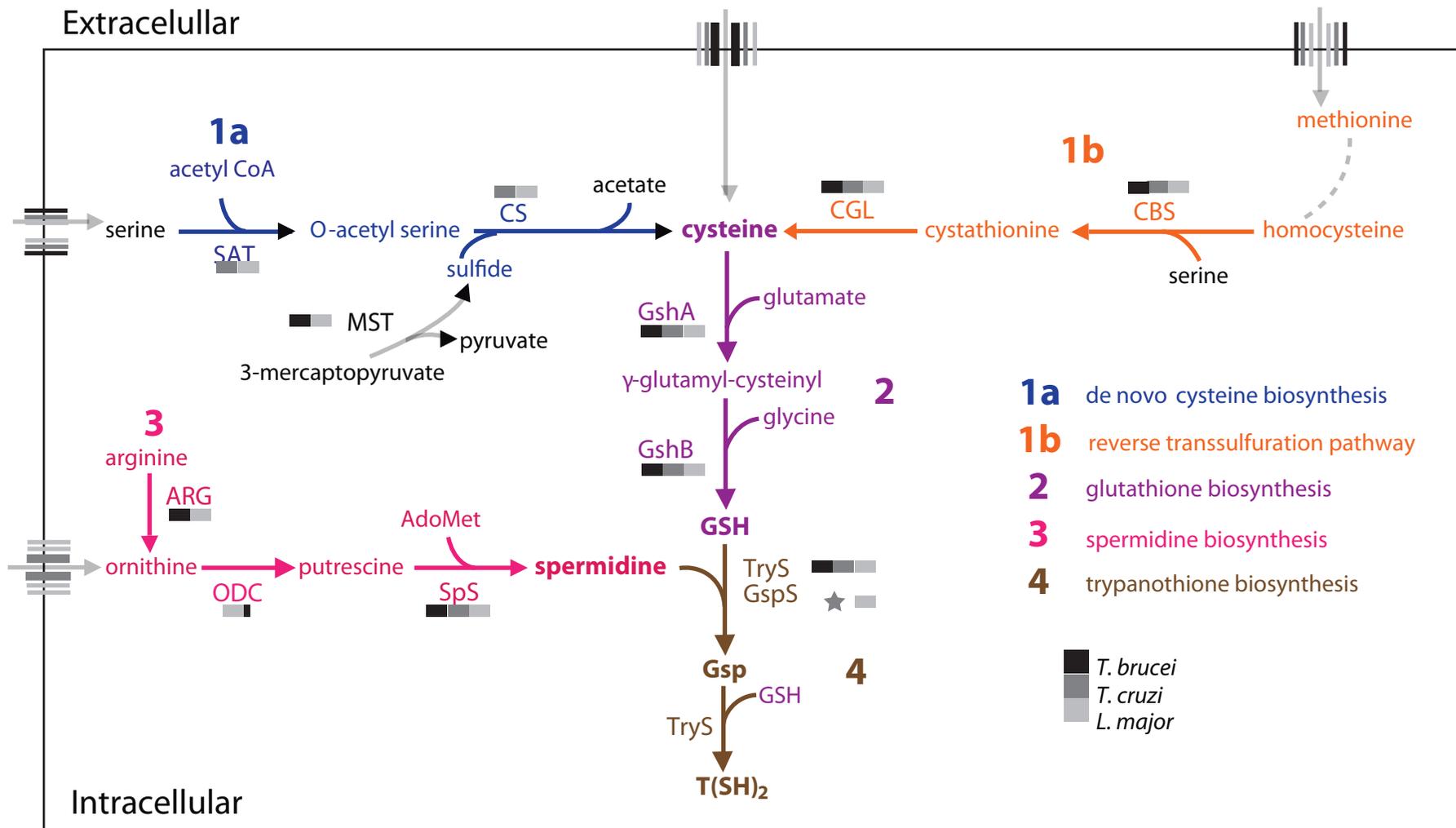
En la figura se esquematiza el transporte de electrones provenientes del NADPH hacia blancos específicos en los sistemas dependientes de GSH (**A**), Trx (**B**) o T(SH)<sub>2</sub> (**C**). En todos los casos se muestra a la izquierda la proteína encargada de oxidar el NADPH y transferir los electrones corriente abajo. El par redox central en cada sistema se indica sobre fondo gris y los componentes se indican con el acrónimo correspondiente (ver texto).



## Figura 1.12. Biosíntesis de tripanotión

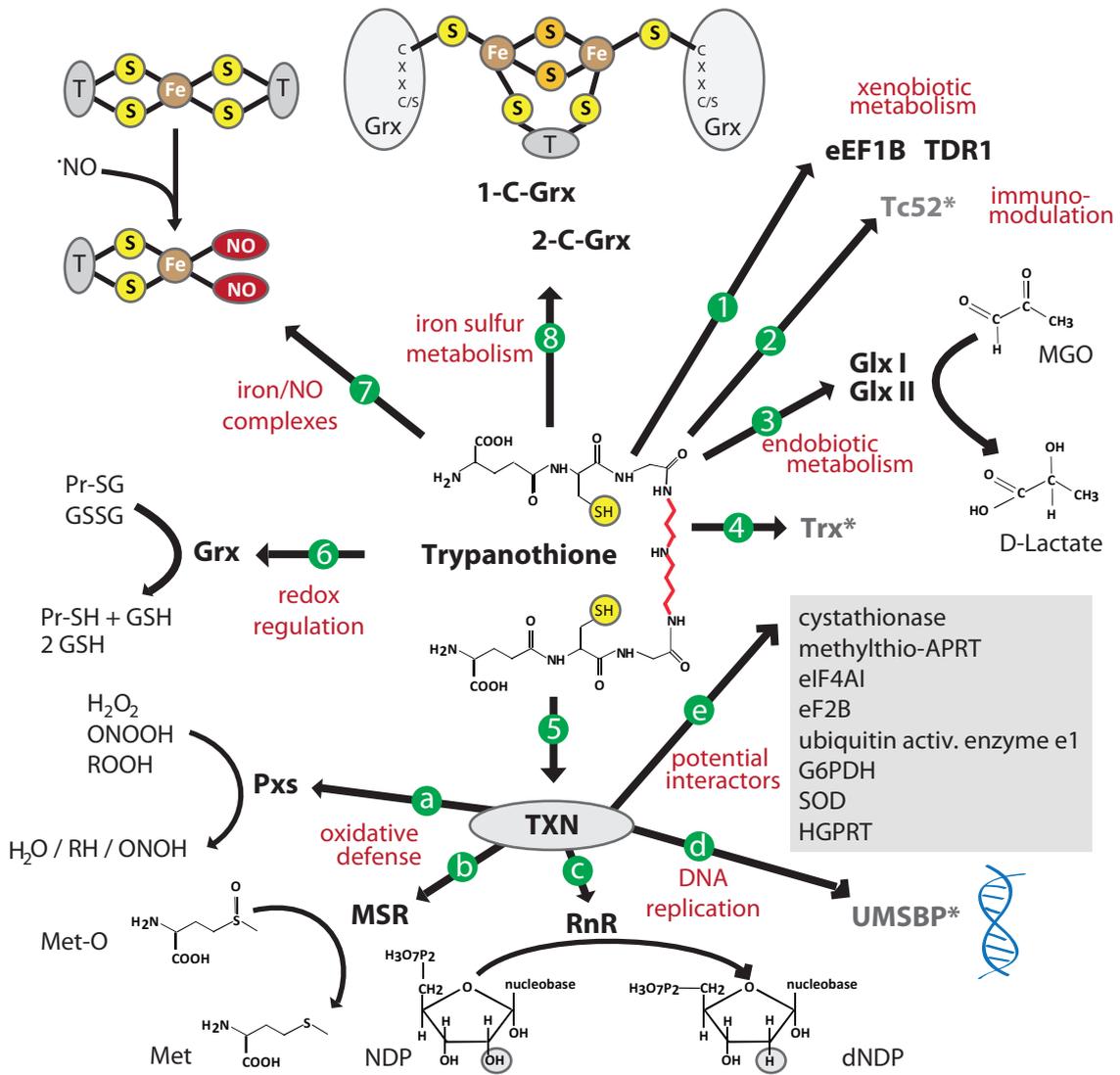
La biosíntesis de tripanotión se puede subdividir en cuatro etapas: producción o incorporación de cisteína (**1**), biosíntesis de glutatión (**2**), biosíntesis o asimilación de poliaminas (**3**) y biosíntesis del TSH<sub>2</sub> propiamente dicho (**4**).

**Paso 1:** La cisteína puede ser sintetizado *de novo* a partir de serina (**1a**) por la acción concatenada de la serina acetiltransferasa (SAT, EC 2.3.1.30) y la cisteína sintasa (CS, EC 2.5.1.47). La enzima 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST, EC 2.8.1.2) es candidata a proveer el sulfuro a partir de 3-mercaptopiruvato, rindiendo piruvato y, posteriormente, acetato. Esta vía está ausente en *T. brucei*. La cisteína también puede ser obtenida por transulfuración a partir de metionina (**1b**) por acción de las enzimas cistationina β-sintasa (CBS, EC 4.2.1.22) y cistationina γ-liasa (CGL, EC 4.4.1.1). Los primeros pasos de esta vía consisten en una serie de reacciones tanto catalizadas (línea continua) como espontáneas (línea punteada). A pesar de expresar CBS y CGL, *T. brucei* es auxótrofo para cisteína y utilizar transportadores eficientes para incorporar la forma reducida del aminoácido a partir del medio extracelular. **Paso 2:** Las enzimas γ-glutamilcisteína ligasa (GshA, EC 6.3.2.2) y glutatión sintetasa (GshB, EC 6.3.2.3) catalizan la unión de cisteína, glicina y glutamato a expensas de ATP para producir GSH. **Paso 3:** La adquisición de espermidina no es uniforme en tripanosomátidos. *T. brucei* realiza tanto incorporación a través de transportadores como biosíntesis *de novo*. Para esta última mecanismo, el parásito emplea la arginasa (ARG, EC 3.5.3.1), que produce ornitina a partir de arginina, la cual es decarboxilada por la ornitina decarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17). En el último paso, el grupo aminopropilo de la S-adenosilmetionina es transferido a la putrescina por acción de la espermidina sintasa (SpS, EC 2.5.1.16). **Paso 4:** La última etapa en la biosíntesis de tripanotión consiste en la unión de dos moléculas de GSH a los grupos amina de la espermidina a expensas de ATP. Esta reacción se da en una o dos etapas y es catalizada por la glutationilespermidina sintetasa (GspS, EC 6.3.1.8) o exclusivamente la tripanotión sintetasa (TryS, EC 6.3.1.9). La barra de escala de grises contigua a las enzimas indica la presencia de las mismas en *T. brucei* (negro), *T. cruzi* (gris) y *L. major* (gris claro). Para la GspS de *T. cruzi*, la estrella denota la ocurrencia en ciertas cepas y no en todas. En el caso de los transportadores de membrana, el código de colores es el mismo que para las enzimas y el grosor de la línea indica la vía principal para incorporar el metabolito en el organismo en cuestión. Adaptado de (Manta et al., 2013b).



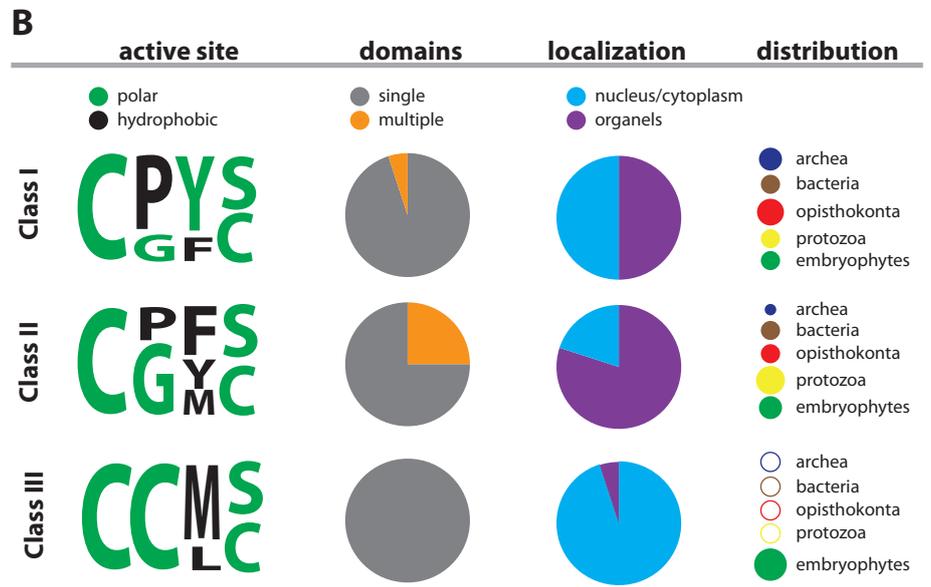
### Figura 1.13. Funciones dependientes de tripanotión

El tripanotión (imagen central) proporciona equivalentes de reducción a múltiples blancos tales como proteínas con actividad transferasa como TDR1 y eEF1B que neutralizan los xenobióticos en *Leishmania* (**1**) (Fyfe et al., 2012; Vickers and Fairlamb, 2004); proteína con actividad inmunomoduladora redox-dependiente como Tc52 en *T. cruzi* (**2**) (Garzón et al., 2003)); glioxalasa como Glx1 –ausente en *T. brucei*– y Glx2 que catalizan la isomerización de un  $\alpha$ -oxoaldehído acíclico reactivo (ej. metilglioxal, MGO) a su correspondiente  $\alpha$ -hidroxiácido (**3**),, tiorredoxinas (Trx, **4**); triparredoxina (TXN, **5**), la principal oxidorreductasa que conecta el potencial reductor del T(SH)<sub>2</sub> hacia destinos finales como ser las defensas antioxidantes integradas por distintos tipo de peroxidasas (Pxs, **a**), la metionina sulfóxido reductasa (MSR, **b**) o la replicación del ADN a través de la ribonucleótido reductasa (RnR, **c**) o la proteína de unión a secuencias universales de minicírculos de localización mitocondrial (UMSBP, **d**). A su vez, hay otra importante lista de posibles interactores de TXN cuya función dependerá, en última instancia, de la capacidad reductora del T(SH)<sub>2</sub> (**e**). Adicionalmente, el T(SH)<sub>2</sub> reduce directamente a las Grx (**6**, ver texto) y es capaz de formar complejos de bajo peso molecular con óxido nítrico y hierro (**7**) o centros ferrosulfurados (**8**, (Manta et al., 2013b)), como se detalla en el texto. Los asteriscos grises indican las enzimas para las cuales su caracterización es incompleta o proviene de experimentos *in vitro*. Otras abreviaciones: PND, nucleótido difosfato; dNDP, desoxinucleótido difosfato; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; Met, metionina; Met-O, sulfóxido de metionina; ONOOH, peroxinitrito ; ONOH, ácido nitroso; ROOH, peróxido orgánico, Pr-SG, proteína glutationilada. Adaptada de (Manta et al., 2013b).



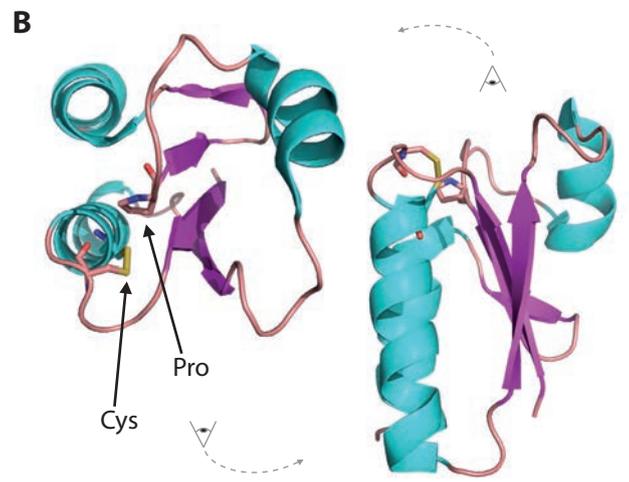
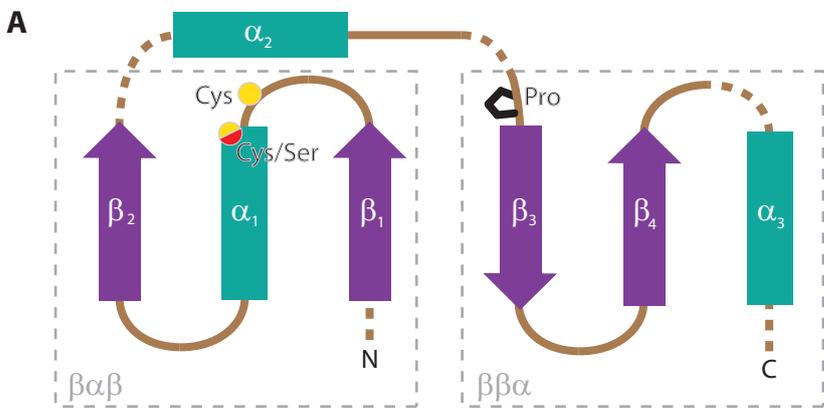
## Figura 1.14. Clasificación de las glutarredoxinas

**A.** Logo de secuencia del sitio activo de las proteínas de la familia Grx en PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00462>) realizado en base al alineamiento de 11052 secuencias (Junio 2013) indicando los residuos más frecuentes en las posiciones 1-4 del motivo CxxC. El color de cada aminoácido representa su naturaleza química según código de colores indicado en la clave. **B.** Descripción *cualitativa* de las tres clases de Grx propuestas por Ströher y Millar (Ströher and Millar, 2012). En la **columna 1** se representa la secuencia del sitio activo más probable en un formato de logo (no basado en alineamientos). En la **columna 2 y 3** se representa la distribución entre proteínas mono- y multidominio y localización subcelular dentro de cada clase, respectivamente. En la **columna 4** se indica la abundancia relativa de secuencia de Grx de cada clase según los grupos taxonómicos allí indicados. Los procariotas se separan en dos grupos (Archea y Bacteria), mientras que los eucariotas se separan en: "Opisthokonta", supergrupo que incluye -por ejemplo- a hongos y mamíferos (ver Figura 1.1), "Protozoa", clasificación artificial que nuclea a organismos de los supergrupos Amebozoa y Excavata (ver Figura 1.1) y "Embryophytes" que refiere a plantas vasculares.. El tamaño del círculo representa la abundancia relativa de esa clase dentro del grupo. Realizado en base a la interpretación de los resultados presentados en (Alves et al., 2009; Atkinson and Babbitt, 2009; Couturier et al., 2009; Rouhier et al., 2008; Ströher and Millar, 2012).



### Figura 1.15. Topología y plegamiento de glutarredoxinas

**A.** Distribución de elementos de estructura secundaria en el plegamiento tiorredoxina ("Trx-fold"). Las hebras  $\beta$  se indican en turquesa y las hélices  $\alpha$  en celeste. Los *loops* de conexión entre elementos de estructura secundaria se indican en marrón. Los sitios donde es más frecuente encontrar dominios o elementos de estructura insertados se indican en línea punteada. El sitio activo se indica inmediatamente antes de la hélice  $\alpha 1$  con círculos de color amarillo (primera Cys del sitio) y amarillo/rojo (segunda Cys/Ser del sitio). En negro se indica la prolina conservada en el *loop* precedente a  $\beta 3$  (*cis*-Pro). Las dos unidades que conforman el plegamiento se indican con marco gris punteado. Realizado en base a (Atkinson and Babbitt, 2009; Collet and Messens, 2010; Deonte, 2013). **B.** Distribución espacial de los elementos del plegamiento tiorredoxina, representados a través de la estructura de la Grx1 de *E. coli* (PDB 1EGO (Xia et al., 1992). El código de colores es como en **A** y se destacan las cisteínas del sitio activo (en su forma oxidada) y la prolina conservada. **C.** Estructura primaria de *EcGrx1* (UniProt ID P68688) destacando la ubicación de los residuos mencionados anteriormente. El código de colores es el mismo que en A y B.

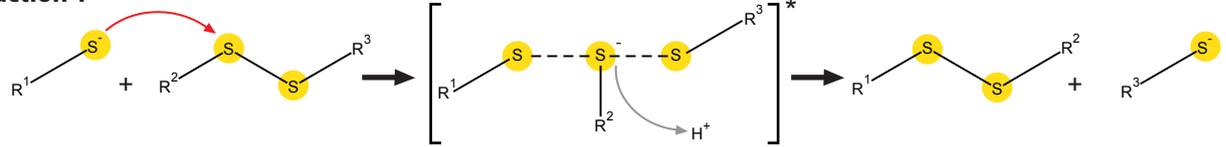


**C** **M**Q**T**V**I**F**G**R**S**G**C**P**Y**C**V**R**A**K**D**L**A**E**K**L**S**N**E**R**D**D**F**Q**Y**Q**Y**V**D**I**R**A**E**G**I**T**K**E**D**L**Q**Q**K**A**G**K**P**V**E**T**V****P**Q**I**F**V**D**Q**Q**H**I**G**G**Y**T**D**F**A**A**V**V**K**E**N**L**D**A

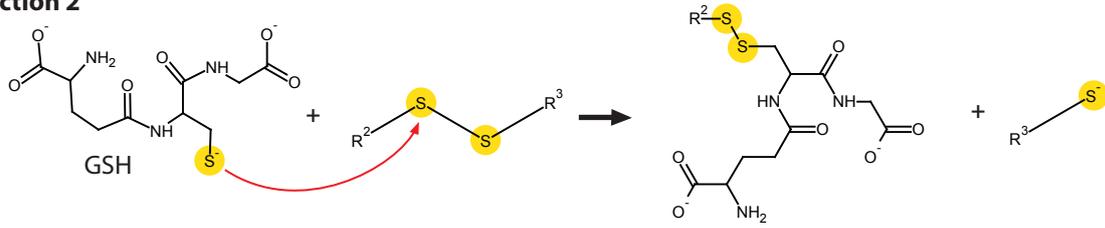
## Figura 1.16. Reacciones de intercambio tiol-disulfuro y glutationilación

**Reacción 1.** Intercambio tiol-disulfuro genérico entre el tiol  $R^1$  y el disulfuro  $R^2R^3$ . Las flechas rojas indican el ataque nucleofílico del tiolato de  $R^1$  sobre el disulfuro para formar un estado de transición lineal que se resuelve con la liberación de  $R^3$  y la formación de un nuevo enlace disulfuro (Deponte, 2013). **Reacción 2:** Intercambio tiol-disulfuro entre el glutatión (GSH) y  $R^2R^3$  determinando la formación del disulfuro mixto. El nucleófilo es el tiolato del GSH. **Reacción 3:** Glutacionilación de una proteína por ataque nucleofílico del tiolato de GSH sobre un tiol oxidado a sulfénico (SOH, verde) en una proteína. Los productos de la reacción son agua (omitido) y la proteína "glutacionilada". Las líneas punteadas azules (puentes de hidrógeno), verdes (interacciones hidrofóbicas) y rojas (interacciones electroestáticas) indican las potenciales interacciones no covalente que ofrece la molécula de GSH para estabilizar su unión a una proteína blanco. **Reacción 4:** glutacionilación de una proteína por intercambio tiol-disulfuro. El nucleófilo es el tiolato del residuo de cisteína de la proteína (una Grx, por ejemplo) y el producto es el mismo que en el caso anterior. La remoción del GSH unido covalentemente por acción de Grx a expensas de GSH se llama deglutacionilación (línea punteada).

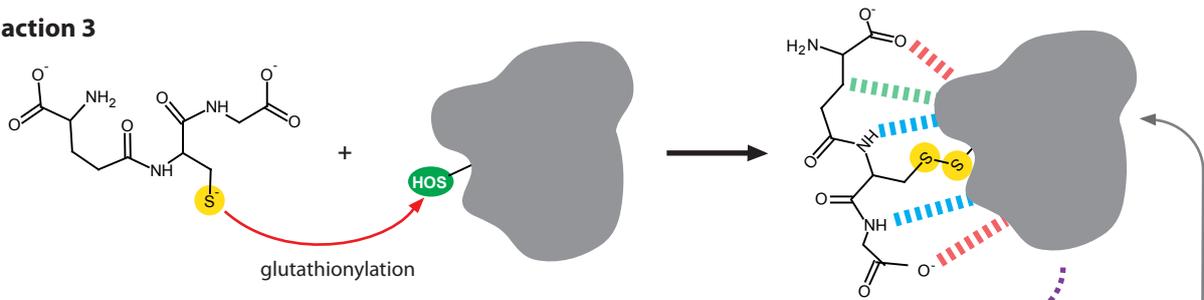
### Reaction 1



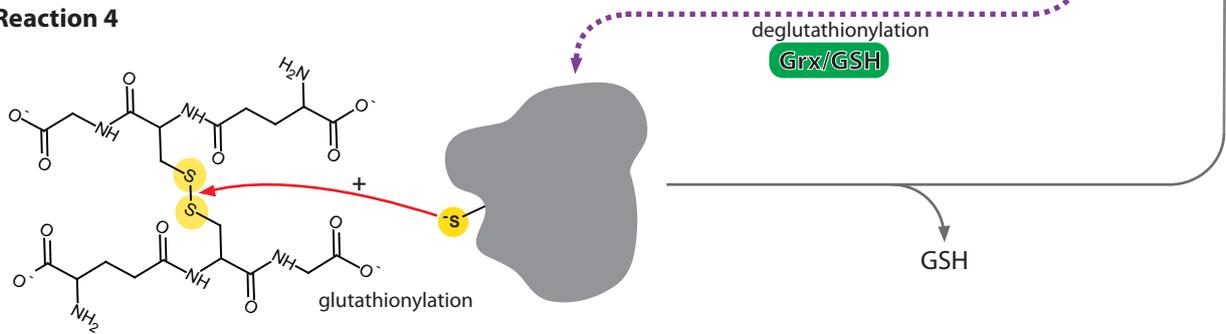
### Reaction 2



### Reaction 3

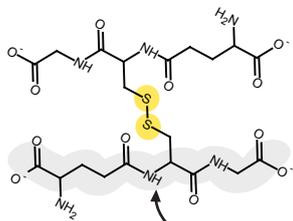


### Reaction 4

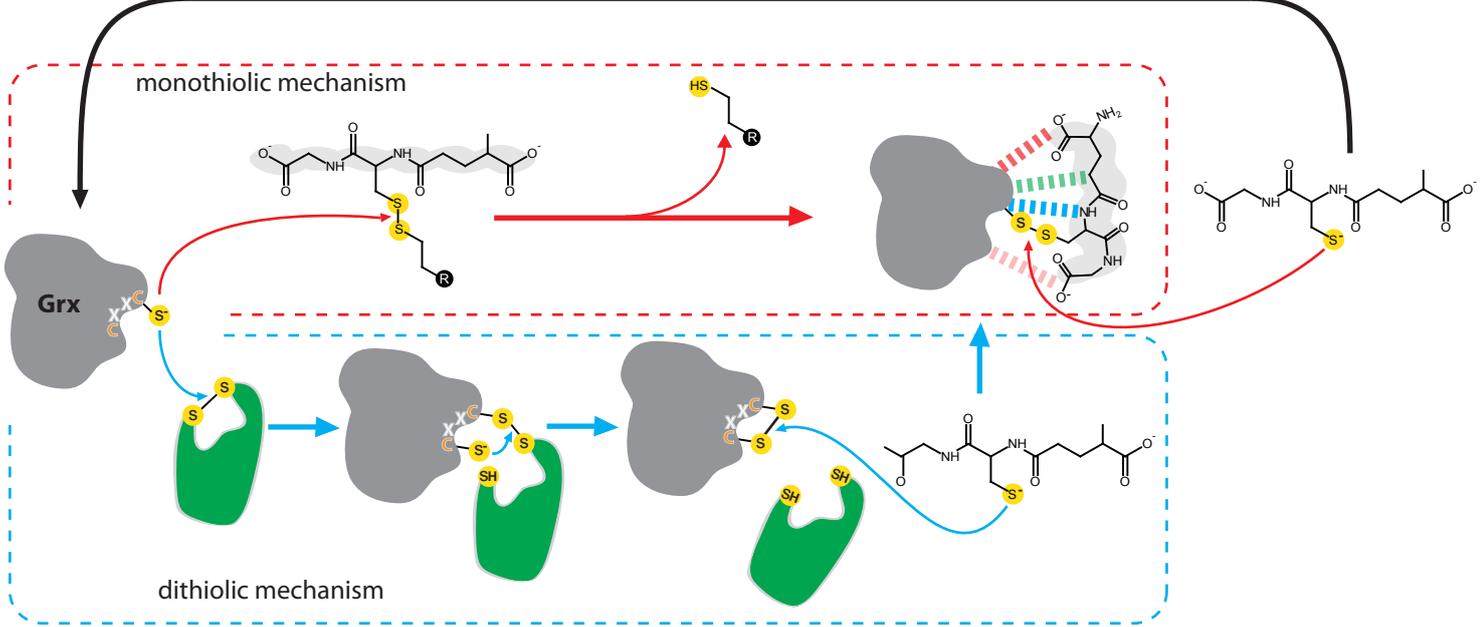


### **Figura 1.17. Mecanismo catalítico para glutarredoxinas**

La reducción de disulfuros por acción de las Grx puede proceder por dos caminos, dependiendo si se trata de un disulfuro de bajo peso molecular (ej. con GSH) o si es un disulfuro entre dos residuos de cisteína de una misma proteína. En ambos casos la cisteína aminoterminal del sitio activo de la Grx (sea esta mono- o ditiólica) es el nucleófilo que ataca el disulfuro a reducir. En el mecanismo monotiólico (marco y líneas rojas) la Grx resulta glutathionilada luego del primer paso (fase oxidativa) y el GSH unido puede interactuar no covalentemente con la oxidoreductasa como se comentó en la Figura 1.16. En el mecanismo ditiólico (marco y líneas celeste), la Grx ataca un disulfuro sobre una proteína y la especie mixta intercatenaria es resuelta con la formación de un disulfuro intramolecular en el sitio activo de la Grx. El mismo sufre posteriormente una reacción de intercambio tiol-disulfuro con el tiolato de GSH para dar la especie glutathionilada comentada anteriormente (fase oxidativa). Esta forma oxidada de la enzima, equivalente en ambos mecanismos, es reducida por GSH liberando GSSG.

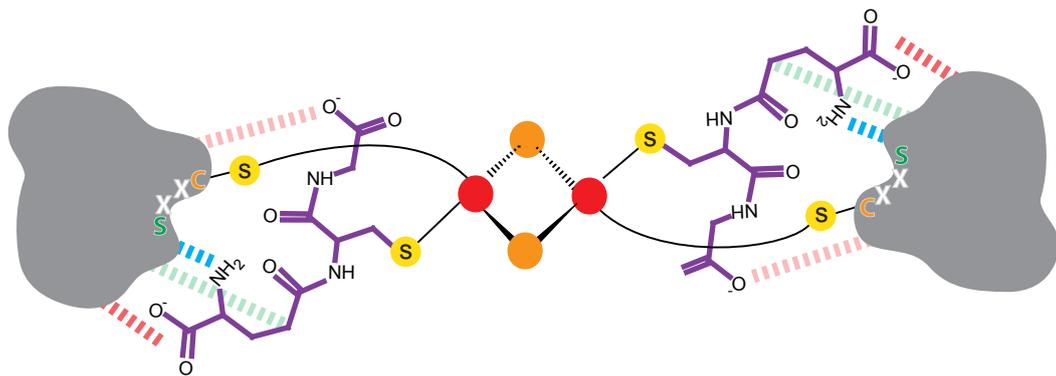


GSH-dependent reduction of covalent intermediate



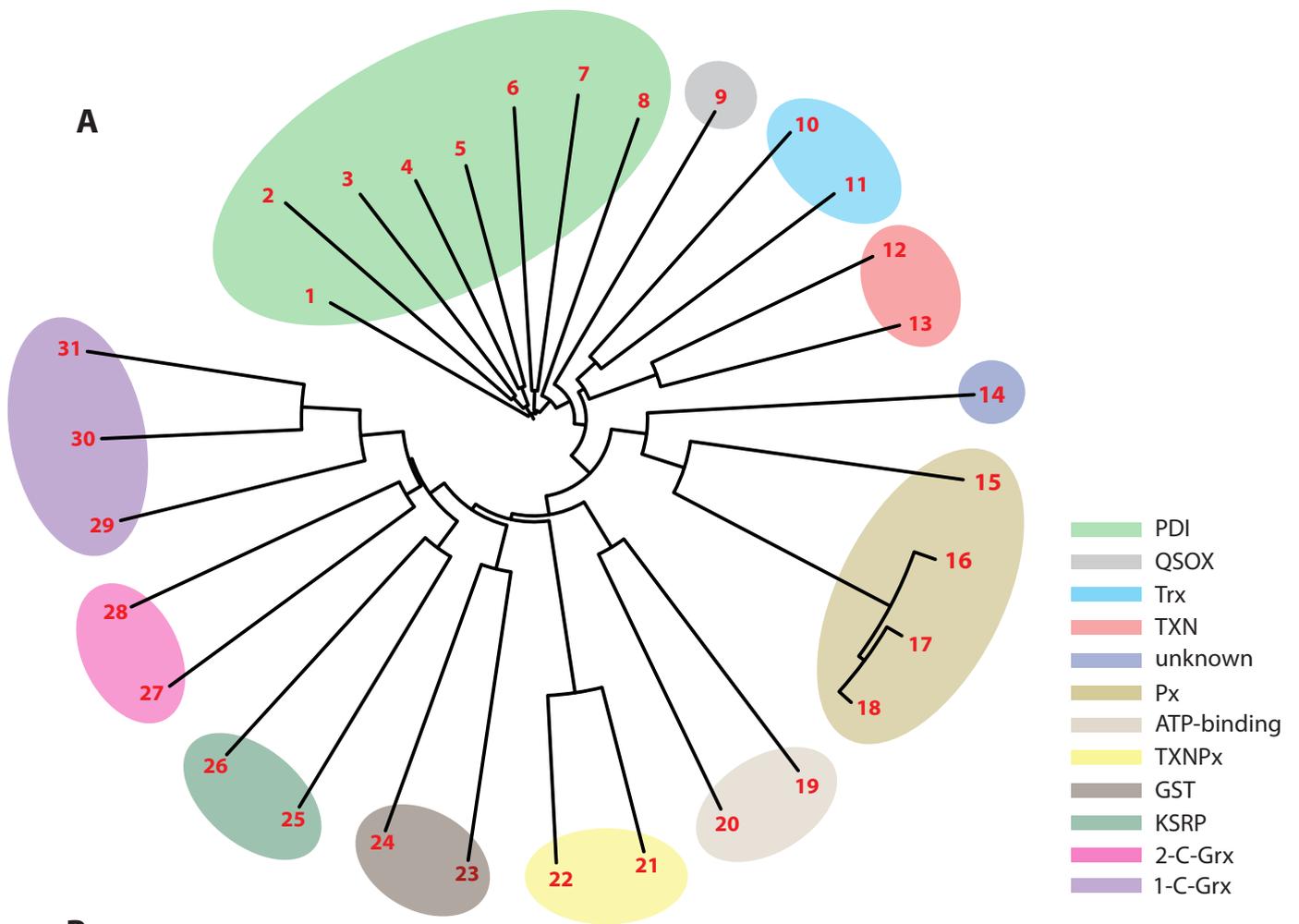
### **Figura 1.18. Unión de centros ferrosulfurados por glutarredoxinas**

Esquema de la unión de un centro ferrosulfurado del tipo [2Fe-2S] por una Grx monotiólica (sitio activo CxxS). Se indica que dos de las ligaciones del centro ferrosulfurado provienen de los residuos de cisteínas del sitio activo de dos monómeros de proteína mientras que las otras provienen de GSH (esqueleto resaltado en violeta) no covalentemente unidos a la misma. Es relevante destacar que la unión del centro ferrosulfurado determina la dimerización de la 1-C-Grx. El código de colores es como en la Figura 1.8 y 1.16.



## Figura 2.1. Dendrograma y alineamiento de los dominios con plegamiento Trx presentes en *T. brucei*.

**A.** Agrupamiento por identidad de secuencia de los dominios Trx presentes en *T. brucei*. Las secuencias son: **1.** dominio amino(N-)terminal de PDI3 (XP\_845754); **2.** dominio carboxilo(C-)terminal de PDI2 (XP\_823057); **3.** PDI1 (XP\_844395); **4.** dominio C-terminal de PDI3; **5.** PDI4 (XP\_846202); **6.** PDI5 (XP\_844776); **7.** proteína ortóloga a Q4DV70 de *T. cruzi* (XP\_846201); **8.** dominio N-terminal de PDI2; **9.** quiescina sulfidril oxidasa (QSOX, XP\_845306); **10.** dominio N-terminal de 1-C-Grx3 (XP\_844769); **11.** tiorredoxina (XP\_803641); **12.** TXN1 (XP\_843968); **13.** TXN2 (XP\_844099); **14.** proteína conservada no caracterizada (XP\_823396); **15.** proteína tipo Px no caracterizada (XP\_829649); **16.** Pxl (XP\_845736); **17.** PxlI (XP\_845737); **18.** PxlII (XP\_845738); **19.** proteína tipo fosducina 1 (XP\_951665); **20.** proteína tipo fosducina 2 (XP\_829673); **21.** TXNPx mitocondrial (XP\_847032); **22.** TXNPx citosólica (XP\_826969); **23.** GST2 (XP\_845655); **24.** GST1 (XP\_845973); **25.** KSRP1 (XP\_847389); **26.** KSRP2 (XP\_845725); **27.** 2-C-Grx2 (XP\_001218879); **28.** 2-C-Grx1 (XP\_828228); **29.** 1-C-Grx1 (CAF02300); **30.** dominio C-terminal de 1-C-Grx3; **31.** 1-C-Grx2 (XP\_823263). Entre paréntesis se indica el código de referencia de cada secuencia en NCBI. Cada grupo funcional se identifica con un color especificado en la clave a la derecha de la figura. **B.** Alineamiento de la región central de los dominios Trx de las proteínas representadas en A. En letras blancas se indica el sitio activo y en negrita los residuos de prolina conservados presentes en el plegamiento Trx, según se indicó en la Introducción, resaltadas sobre el alineamiento con una cabeza de flecha negra. Los residuos indicados en rojo refieren a posiciones específicas para cada grupo de proteínas comentadas en el texto.

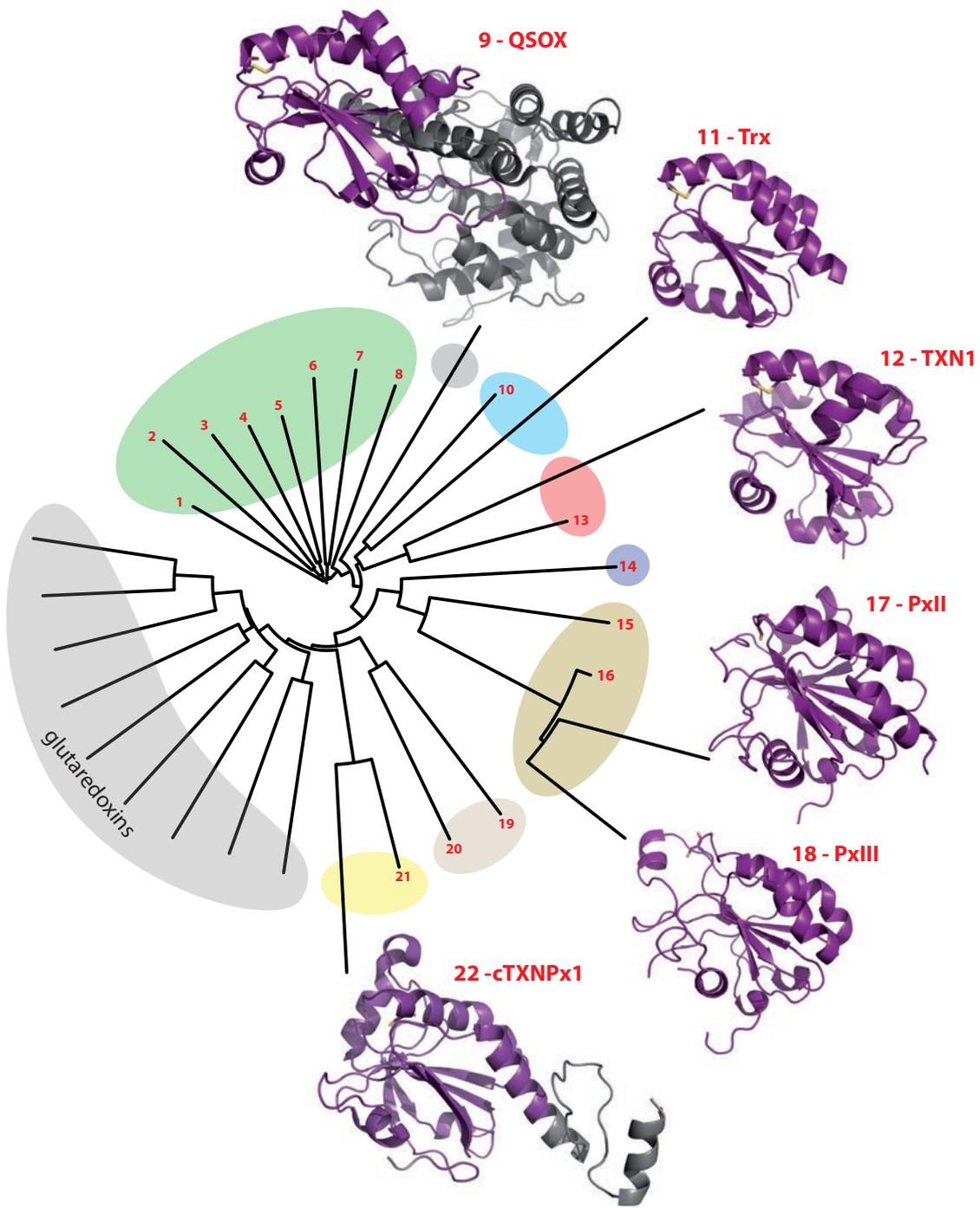


**B**

1	--DVAALVE----FYAPWCGHCNKLVP	PEFA--KLGRAAA--GAKDKVL--IAKVDATAQ-----KDLATRFVEVNGYPTILFFPAG----				
2	--GKMDLIL----FPAPWCGHCNFP	PTFD--KIAKEFD--ATDLI--VAELDATAN-----YVNSSTFTVTAFTPTVFFVNGGKP----				
3	--HKPVLIL----FYAPWCGHCKRLH	PEWE--KFAKSVV--GI--VR--VGAVNADEH-----QQLGQFNLRGFPPTVKFWLGEKRA				
4	--GKDAFVL----FYAPWCGHCKRLH	PSFE--SLAKVYQ--NEKD--LI--IANVDADDK-----SNSEVTKRYKVEGYPTLVFPFKGNKN				
5	--EKHFVFM----FYAPWCGHCKRLH	PKWE--ELAKEMK--DETS--VV--IARLDADKH-----RNVAERFPDVRGYPTLILLFARSKKE-				
6	RRKGPWLIF--FPAPWCGHC	KAALPKYA--DANLQAKLGVQH--AR--FATVNAVKS-----PELALRFRVAVYPTLIYTTGKAEN-				
7	--TKDVFVL----YCVTWGRHCRSA	VLWA--DLSISQFKRPTADFFV--AALIDAEAF-----PETAKRMGVKSYPTMLFYTRLEKAT				
8	--SEIFLVK----FYVDT	CGYQMLAPEWE--KAANET--IDNAL--MGEVDCHSQ-----PELAANFIRSIRGYPTIILFRNGKEAE				
9	--LCPWIVL----FYNDG	CACRRYASTFS--KFAGGLKVEHGKDALQIATAAAVNCASE-----VDLCRKYDINFVRLFFFPYRDSR				
10	ANGLGLVVH----FSASW	CEPCXGVT	EALV--RFSELYKGSVEFVEVDSEAL-----GSICEAAEAVDCVPIAFFRTSGDGK			
11	--DILTVAW----FTAVW	CGPCKTIE	RPME--KIAIEFP--TVK--FAKVADANN-----SEIVSKCRVLQLPTPIIARSGKMLG			
12	--VGKTVFLY----FSASW	CPPCR	RGFT	PVLA--EFYEKHHVAKNFVVLISWD--ENESDFHDYYG-----KMPWLALPFDQRSTVS--ELGKTFGVES		
13	EGKKYLLVY----FSASW	CPPCR	RVFT	PQLA--TFHELFSAKHNFVIVSRD--KDESSMSAYFYNPKYSSLSVSGGECSHGDWLALPFTQAQTVGKEIMSRYLNT		
14	SKLIEHKDEIMVVKYKHC	CTPCL	LSLAE	MYK--QVSEQCKKENRRIAWYSVNT--KD-----VSARSLVYQVLNGTPTVQTFSRMKQVG		
15	YAGCVTVLV----NTASL	CSFTSSNI	QHL--IHVQK	WASR--SFTVLA--FPCSQ--FGNQEP--KKRDEICCVVA--R--NGINFVFDKVNLRGPN		
16	HKGSPLLIY----NVASK	CGYTKGGY	ETA--TALYNKYK	SQ--GFTVLV--FPCNE--FGGQEA--GNEEEIKEFVCTK--FKAEFP		
17	HKGSPLLIY----NVASK	CGYTKGGY	ETA--TALYNKYK	SQ--GFTVLA--FPCNQ--FGGQEP--GTEEEIKEFVCTK--FKAEFP		
18	HKGSPLLIY----NVASK	CGYTKGGY	ETA--TALYNKYK	SQ--GFTVLA--FPCNQ--FGGQEP--GTEEEIKEFVCTK--FKAEFP		
19	GGSDDVCVHFYHK--DFET	RVMD	SRLL	ELSRMMLSVK	FVK--IDAEK--SPLFVE--RLHI-----KTLPCCVL--	
20	--ESERVVVHFMRR--STSR	SIL	ERHL	QIIAPQHF	FET	RFVY--VDVER--IPSLAE--RFNV-----LMLPTLMLVENKNTFH
21	YKGYIVLFFYPLD-PTF--V	PTEI	VSFS--DSHA	EFEK--LNTQV--IAVSCD--SHFSLAWVETPR--KGGLGEMKIP		
22	YRQKVVVLFYPLD-PTF--V	PTEI	QFS--DRV	KEFND--VDCEV--IACSM--SEFSLAWTNER--KGGGLGMNIP		
23	---NMTLY----RMK	CPY	ER	VEWLLR--YHLV	PF	FEI--VEVGP--LTTKGF
24	KKCPPILLY----RYST	CP	CA	TTK	SFLD--YNKIR	YEC--VEVEP--MPKKEISMSAYKKV
25	ANFVGVKLF	FTSMT	GD	RRIRDH	CRRA	ETLLY--LKRIT
26	---RHYV	SWY	CT	RM	KVLL--DHH--VYVE	PLRQ--QLQEV
27	LRRNKVMV----SATY	CQ	CF	TKL	KMLLI--ELK	HRFVS--LEIDI--IPNGREV
28	IKGNKVVVF----SWVT	CP	Y	RAE	KLLH--ART	KDITV--HYVDK--MSEGE
29	IKSEVVTPIKGL--P	AP	CA	YS	KRM	IVLE--ALG
30	TSRKGVVAFITGT--P	SR	PC	GT	V	KLI
31	TAEDRIVIFLTGT--P	QB	RC	GT	V	KM

## Figura 2.2. Estructuras de proteínas de *T. brucei* con plegamiento Trx

En la figura se muestran estructuras representativas de los grupos de proteínas con plegamiento Trx presentes en *T. brucei* para los cuales existe información experimental (ver texto). La nomenclatura de los grupos y secuencias es la misma que en la Figura 2.1. Los PDB usados para construir la figura fueron 3QCP (secuencia 9, QSOX), 1R26 (secuencia 11, Trx), 1O73 (secuencia 12, TXN1), 2VUP (secuencia 17, PxII), 3DWV (secuencia 18, PxIII). Al no haber estructura para ninguna TXNPx de *T. brucei* (cTXNPx) recurrimos a la estructura de la proteína de TXNPx citosólica de *T. cruzi* (PDB ID 1UUL, (Piñeyro et al., 2005)) que posee 84.3 % y 96.5% de identidad y similitud, respectivamente, con la secuencia 22 de la Figura 2.1. La región incluida en el plegamiento Trx se colorea en violeta y la porción restante en gris. La(s) cisteína(s) conservadas del motivo catalítico indicado en la Figura 2.1 (cuando correspondiera) se indican como palos, coloreando los átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre en rojo, azul y amarillo, respectivamente.



### Figura 2.3. Información sobre las glutarredoxinas presentes en *T. brucei*

En la tabla se listan el nombre (**1**), referencias de acceso en NCBI (**2**), UniProt/Swiss-Prot (**3**) y TriTryp (**4**) de las proteínas que integran el grupo de las Grx en tripanosomátidos según se propone en este trabajo. A su vez, se indica el número de aminoácidos del producto expresado (**5**), su peso molecular calculado (**6**), y su localización subcelular (columna **7**, M = mitocondria, C = citosol, F = flagelo) ya sea predicha (letras negras) o demostrada (letras rojas), en base a información disponible en (Acestor et al., 2009, 2009; Bridges et al., 2008; Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008; Gunasekera et al., 2012; Oberholzer et al., 2011; Urbaniak et al., 2012). La localización subcelular de *Tb1-C-Grx2* se muestra en la Figura 3.6. Las columnas **8** y **9** indican el sitio activo presente en el dominio Grx y el número de cisteínas extra-sitio en el mismo dominio, respectivamente. En la columna **10** se indica la clasificación de acuerdo a (Ströher and Millar, 2012). El signo de interrogación indica que no es posible asignarla a ninguna de las 3 categorías. En la columna **11** se indica si existe información experimental sobre la expresión de la proteína en base a datos de proteómica disponibles en [www.trypspoteome.org](http://www.trypspoteome.org) (Acestor et al., 2009; Panigrahi et al., 2009) o referencias publicadas por nuestro grupo (Ceylan et al., 2010; Comini et al., 2008). En la columna **12** se indica el resultado del silenciamiento del gen correspondientes por RNAi en los experimentos de Alsford y colaboradores (Alsford et al., 2011), de acuerdo al código de colores que se indica debajo de la tabla. La información sobre 1-C-Grx3 en esta columna proviene de resultados no publicados de RNAi de Comini y colaboradores y coincide con lo reportado por Alsford y colaboradores.

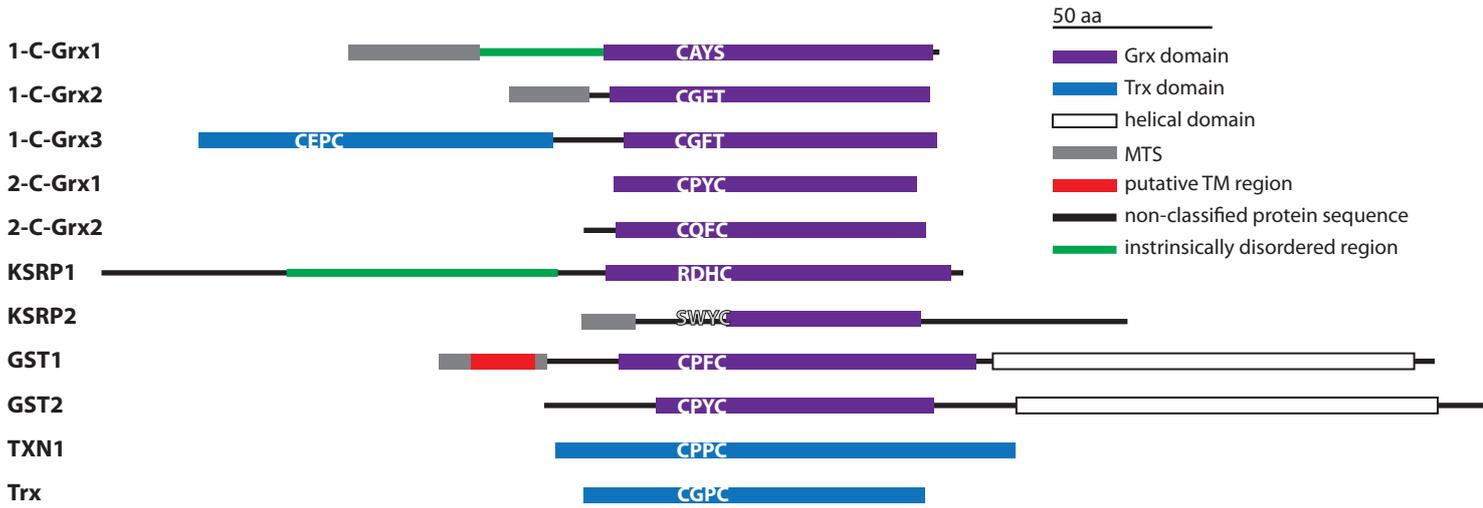
<sup>1</sup> Name	<sup>2</sup> NCBI	<sup>3</sup> UniProt	<sup>4</sup> TriTryp	<sup>5</sup> aa	<sup>6</sup> MW	<sup>7</sup> Loc	<sup>8</sup> active site	<sup>9</sup> extra cys	<sup>10</sup> class	<sup>11</sup> Exp	<sup>12</sup> RNAi
<b>1-C-Grx1</b>	CAF02300.1	Q2UZM9	Tb927.9.3590	184	20.4	<b>M</b>	CAYS	1	II	Y	●
<b>1-C-Grx2</b>	XP_823263.1	Q389T5	Tb927.10.10420	131	14.9	<b>M</b>	CGFT	2	II	Y	●
<b>1-C-Grx3</b>	XP_844769.1	Q57W40	Tb927.5.950	222	24.5	<b>C</b>	CGFT	2	II	Y	●
<b>2-C-Grx1</b>	XP_828228.1	Q387B5	Tb927.11.1370	95	10.6	<b>C</b>	CPYC	1	I	Y	●
<b>2-C-Grx2</b>	XP_001218879.1	Q4GZ42	Tb927.1.1770	107	12.2	<b>M</b>	CQFC	0	I	Y	●
<b>KSRP1</b>	XP_847389.1	Q57X23	Tb927.8.5590	270	30.5	<b>C</b>	RDHC	1	?	Y	●
<b>KSRP2</b>	XP_845725.1	Q57VU7	Tb927.7.1010	171	19.6	<b>M</b>	SWYC	0	?	Y	●
<b>GST1</b>	XP_845973.1	Q57WG5	Tb927.7.3500	312	35.4	<b>F</b>	CPFC	2	II	Y	●
<b>GST2</b>	XP_845655.1	Q57U23	Tb927.7.310	295	33.1	<b>C</b>	CPYC	0	II	N	●

● significant loss of fitness in BSF   ● significant loss of fitness in PCF   ● significant loss of fitness in BSF-PCF differentiation   ● no loss of fitness

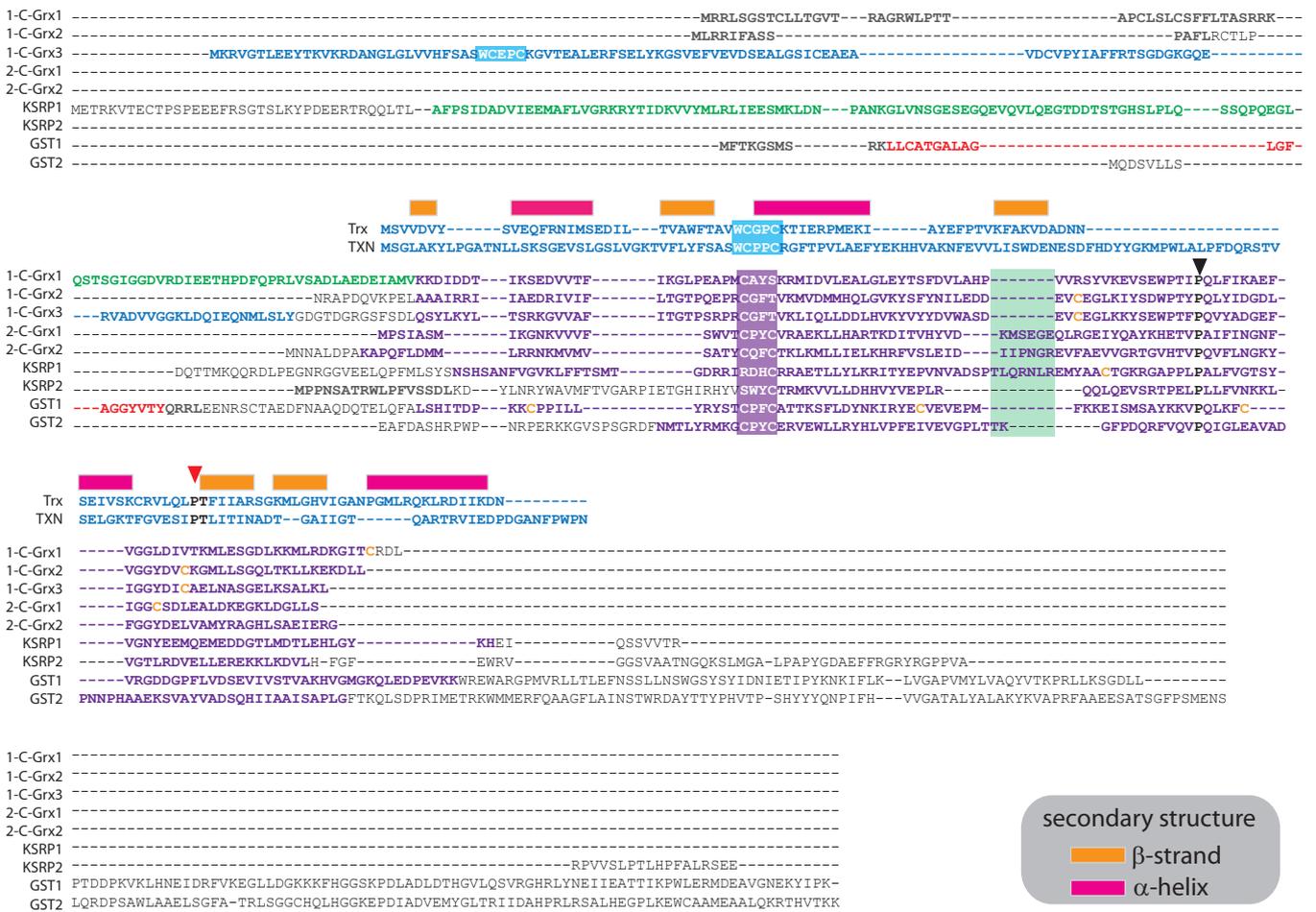
## Figura 2.4. Organización de dominios y alineamiento de secuencias tipo Grx de *T. brucei*

En la figura se muestra el esquema de dominios de secuencia (**A**) y el alineamiento (**B**) de las nueve secuencias de Grx identificadas en *T. brucei*. Cada secuencia fue analizada para predecir péptidos de localización subcelular, regiones transmembrana y dominios, según se indica en el Capítulo 7. Los péptidos de localización subcelular se indican en color gris, los dominios Grx en violeta, las regiones predichas como intrínsecamente desordenadas en verde, el dominio tiorredoxina en azul y una región predicha como transmembrana en rojo. Las regiones no asignadas se indican con línea negra. Los esquemas están centrados en los sitios activos de cada dominio con plegamientos Trx, indicados en letras blancas. En el alineamiento (B) se utiliza el mismo código de colores, solo que las regiones donde hay elementos de secuencia predichos se indican en letras "negrita" mientras que las letras no resaltadas indican secuencias no asignadas. A modo de comparación, se muestra la secuencia de Trx y TXN de *T. brucei* (secuencias 11 y 12 en Figura 2.1, respectivamente) alineadas sobre el sitio activo, y se indican los elementos de estructura secundaria de Trx en base a la estructura disponible (PDB ID 1R26, (Friemann et al., 2003)). La región correspondiente al sitio activo de los dominios Grx se indica sobre fondo violeta y sobre fondo celeste en los dominios Trx. En verde se indica la extensión presente en 2-C-Grx1, KSRP1 y KSRP2 comentada en el texto. La *cis*-Pro se indica con una cabeza de flecha negra sobre el alineamiento de las Grx y roja en el caso de las Trx y TXN. Todas las cisteínas externas al sitio activo están indicadas en letras naranjas, independientemente de su posición en la secuencia.

**A**



**B**



### **Figura 2.5. Identidad y conservación de secuencia de los dominios Grx en proteínas de *T. brucei***

Los dominios Grx de las secuencias de la Figura 2.4 fueron alineados y analizados de a pares para determinar su identidad (gris) y similitud (celeste), según los criterios comentados en el texto. La *identidad* se define como el porcentaje de conservación de residuos idénticos en las posiciones del alineamiento y la *similitud* como el porcentaje de conservación de residuos con propiedades fisicoquímicas equivalentes en las posiciones del alineamiento según la matriz de sustitución de "escala McLachlan", (Gribskov et al., 1987).

		1-C-Grx			2-C-Grx		KSRP		GST		Identity
		1	2	3	1	2	1	2	1	2	
1-C-Grx	1		34.0	33.0	20.4	15.9	13.2	20.5	12.2	12.2	
	2	57.5		46.1	15.6	15.6	9.3	12.3	9.8	4.9	
	3	52.8	67.6		19.0	21.7	11.6	14.9	10.6	6.5	
2-C-Grx	1	31.0	35.8	32.4		24.7	12.9	15.7	10.0	12.5	
	2	36.3	37.6	40.6	45.4		16.9	12.3	12.5	11.7	
KSRP	1	25.6	20.9	22.5	26.6	29.8		14.0	12.9	11.4	
	2	28.7	26.2	26.4	29.8	27.0	24.3		10.5	12.9	
GST	1	22.8	19.5	19.5	21.7	25.0	22.0	21.8		24.5	
	2	29.3	18.7	17.9	25.0	24.2	22.7	24.2	45.5		
Similarity											
		30-40%			40-50%		>50%				

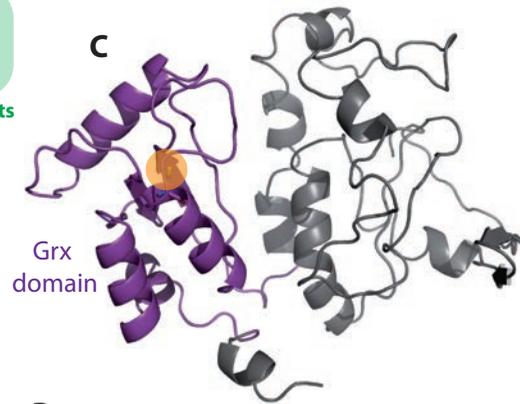
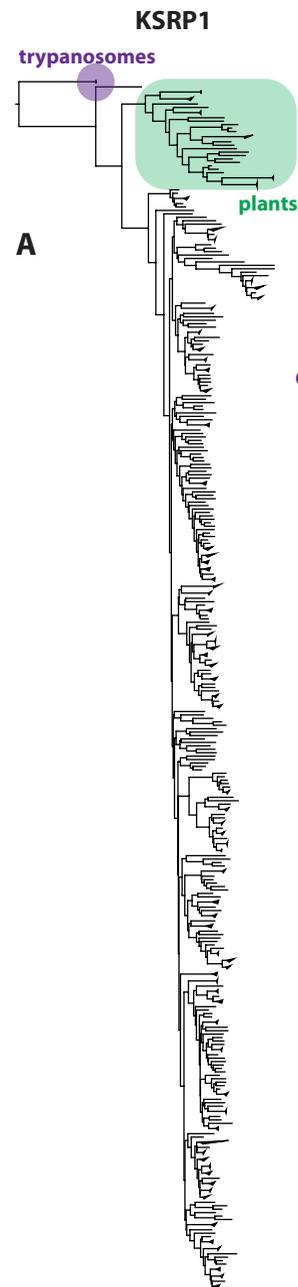
## Figura 2.6. Ontología de secuencias tipo Grx de *T. brucei*

Las secuencias de las proteínas “tipo Grx” presentes en *T. brucei brucei* (Figura 2.3) fueron usadas como sondas para la identificación de proteínas relacionadas en los organismos mostrados en la Figura 1.1 más especies representativas de tres grupos procariotas relevantes a los efectos de este trabajo (ver texto). Para el caso de *Euglena gracilis* y *Diplonema papillatum* recurrimos a información no publicada gentilmente cedida por los Drs. Mark Field y Michael W. Gray (*E.g*) y Gertraud Burger (*D.p.*) (afiliación en Figura 1.1). La exploración se realizó empleando la herramienta PSI/Delta-BLAST en la base de datos del NCBI o GeneDB usando como sonda las secuencias completas o sin señales de localización subcelular. La marca verde indica la presencia de una secuencia que consideramos ortóloga a la correlativa de *T. brucei*, mientras que la marca roja indica su ausencia. La marca en amarillo engloba situaciones de homología pero con incertidumbre, decididas caso a caso en base a los siguientes criterios: *i)* “e-value” muy cercano al límite de aceptación de PSI-BLAST, *ii)* cobertura muy baja (en % de largo) de la secuencia recuperada respecto de la secuencia sonda, *iii)* el alineamiento en la zona del sitio activo no posee cisteínas, *iv)* dos o más secuencias de *T. brucei* cumplen con los criterios para estar relacionadas con una misma secuencia del organismo blanco, *v)* dos o más secuencias del organismo blanco cumplen con los criterios para emparentar con una secuencia de *T. brucei*. Los criterios *ad hoc* se aplicaron de manera inclusive con el fin de no descartar posibles secuencias homólogas, si bien en varios casos se requiere un estudio más detallado.



## Figura 2.7. Relación filogenética y secuencia del dominio Grx de KSRP 1 y 2

**A.** El dominio Grx de KSRP1 (Figura 2.4) fue usado para realizar una búsqueda irrestricta por Delta-BLAST en la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI. Las 500 secuencias con mejor score ("e-value") fueron alineadas con Clustal Omega y se realizó el árbol de relaciones filogenéticas en base al programa COBALT (NCBI), el cual se representa en la Figura. La secuencia de búsqueda y otras estrechamente emparentadas presentes en tripanosomátidos (ver a continuación) se indica con fondo violeta. Las secuencias de plantas se indican con fondo verde y por motivos de simplicidad, no se indica la etiqueta de las secuencias presentes en el árbol. La ubicación del agrupamiento de KSRP1 es prácticamente la de un grupo externo, lo que sugiere que no presenta una importante similitud con las demás secuencias incluidas en el árbol. El mismo procedimiento se realizó utilizando la 1-C-Grx2 o 1-C-Grx1 y determina árboles completamente distintos, con las secuencias de búsqueda integradas en las ramas principales (no mostrado). **B.** Las secuencias ortólogas a KSRP1 de *T. brucei brucei* presentes en tripanosomas (letras negras) y *Bodo saltans* (letras verdes) recuperadas en A fueron curadas manualmente para determinar su estructura de dominios y péptidos de localización subcelular. Se muestra solo la región central del alineamiento, en torno al sitio activo (negrita), resaltando las cisteínas en naranja. Las secuencias utilizadas fueron (número, acrónimo, especie y referencia de secuencia en GeneDB): **1.** *Tbb*, *Trypanosoma brucei brucei* cepa 927/4 GUTat10.1, Tb927.8.5590; **2.** *Tbg*, *T.b. gambiense* DAL972, Tbg972.8.5580; **3.** *Tco*, *T. congolense* IL3000, TcL3000\_0\_10010.1; **4.** *Tvi*, *T. vivax* Y486, TvY486\_0805120; **5.** *Tcz*, *T. cruzi* cepa CL Brener, TcCLB.507889.20 (variante haplotípica TcCLB.503477.10); **6.** *Lbr*, *L. braziliensis*, LbrM.16.0760; **7.** *Ldo*, *L. donovani*, LdBPK\_160770.1.1; **8.** *Lin*, *L. infantum* JPCM5, LinJ.16.0770; **9.** *Lmj*, *L. major* strain Friedlin, LmjF.16.0770 y **10.** *Bs*, *B. saltans*, BS63330.1. **C.** Modelo estructural de KSRP1 realizado con I-TASSER (ver detalles en Capítulo 7). El dominio Grx se indica en violeta con la cisteína del motivo RDHC en naranja. El resto de la proteína se indica en gris. El modelo es de mala calidad ("C-score" de -4) y los representantes estructurales más cercanos son los PDB 1NM3, 3AHH y 1YGP. **D-E.** Igual que en A y B, respectivamente, solo que realizando la búsqueda con la secuencia completa de KSRP2 (Figura 2.4). Las secuencias utilizadas para el alineamiento fueron: **1.** *Tbb*, *Trypanosoma brucei brucei* cepa 927/4 GUTat10.1, Tb927.7.1010; **2.** *Tbg*, *T.b. gambiense* DAL972, Tbg972.7.960; **3.** *Tvi*, *T. vivax* Y486, TvY486\_0700840; **4.** *Tcz*, *T. cruzi* cepa CL Brener, TcCLB.506729.30 (variante haplotípica TcCLB.507513.30); **5.** *Lbr*, *L. braziliensis*, LbrM.26.0930; **6.** *Lin*, *L. infantum* JPCM5, LinJ.26.0890 ; **7.** *Lmj*, *L. major* strain Friedlin, LmjF.26.0920; **8.** *Lmx*, *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103, LmxM.26.0920 y **9.** *Bs*, *B. saltans*, BS52655.1.

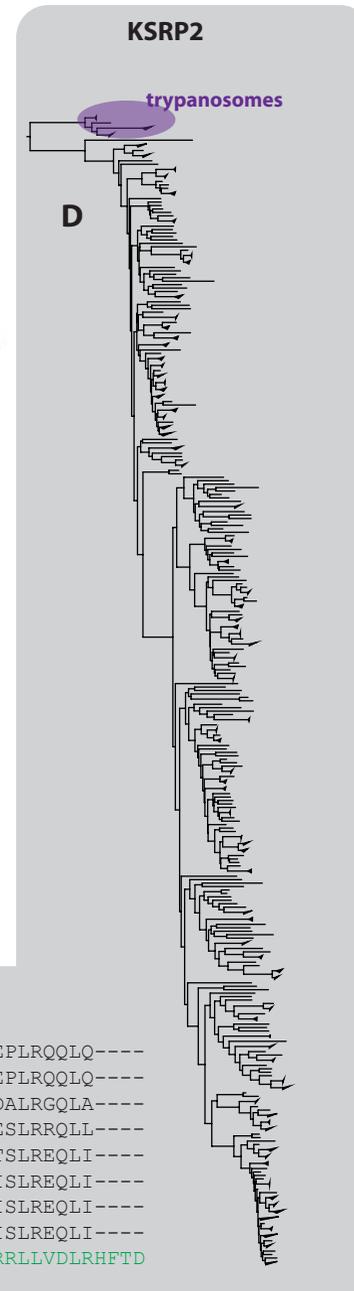


**B**

1. *Tbb* YNSHSANFVGVKLFFTSMTGDRRIRDHCRR  
 2. *Tbg* YNSHSANFVGVKLFFTSMTGDRRIRDHCRR  
 3. *Tco* ---VGVENPRTVKLFHTTMTGDRRIRAHCRR  
 4. *Tvi* SIPLSGDERLKTRLF<sup>●</sup>TTMTGDRRVRDHCRR  
 5. *Tcz* HTSATARHAAKAVLFVTTMTGDRRVRDHCRR  
 6. *Lbr* DHCLSRYGPGQVLLFFTTSMTGERAVRDHCRL  
 7. *Ldo* DDCLSRYGPGQVLLFMTSMTGERAVRDRCRL  
 8. *Linf* DDCLSRYGPGQVLLFMTSMTGERAVRDRCRL  
 9. *Lmj* DDCLSRYGPGQVLLFMTSMTGERAVRDCCRL  
 10. *Bs* -AAAEALSDKEVILYVTSMTANRQVRTECRL

**E**

1. *Tbb* RPIETGHIRHYVSWYCTRMKVLLDHHVYVEPLRQQLQ----  
 2. *Tbg* RPIETGNIRHYVSWYCTRMKVLLDHHVYVEPLRQQLQ----  
 3. *Tvi* RPIETGHIRHYVSWYCVRMKVLLDHHVHADALRGQLA----  
 4. *Tcz* RPIETGHLRHYVSWYCTRMKVVLDDHHIYAESLRRQLL----  
 5. *Lbr* QAIDTGHMRHYVSWYATRLKVVVELDHHIHATSLREQLI----  
 6. *Linf* QAIDTGHMRHYVSWYATRLKVVVELDHHVHAI SLREQLI----  
 7. *Lmj* QAIDTGHMRHYVSWYATRLKVVVELDHHMHAI SLREQLI----  
 8. *Lmx* QVIDTGHMRHYLSWYATRLKVVVELDHHIHAI SLREQLI----  
 9. *Bs* SAVDSARMRHYVNWYCTKCKPVDLDHHVSSRLLVDLRHFTD



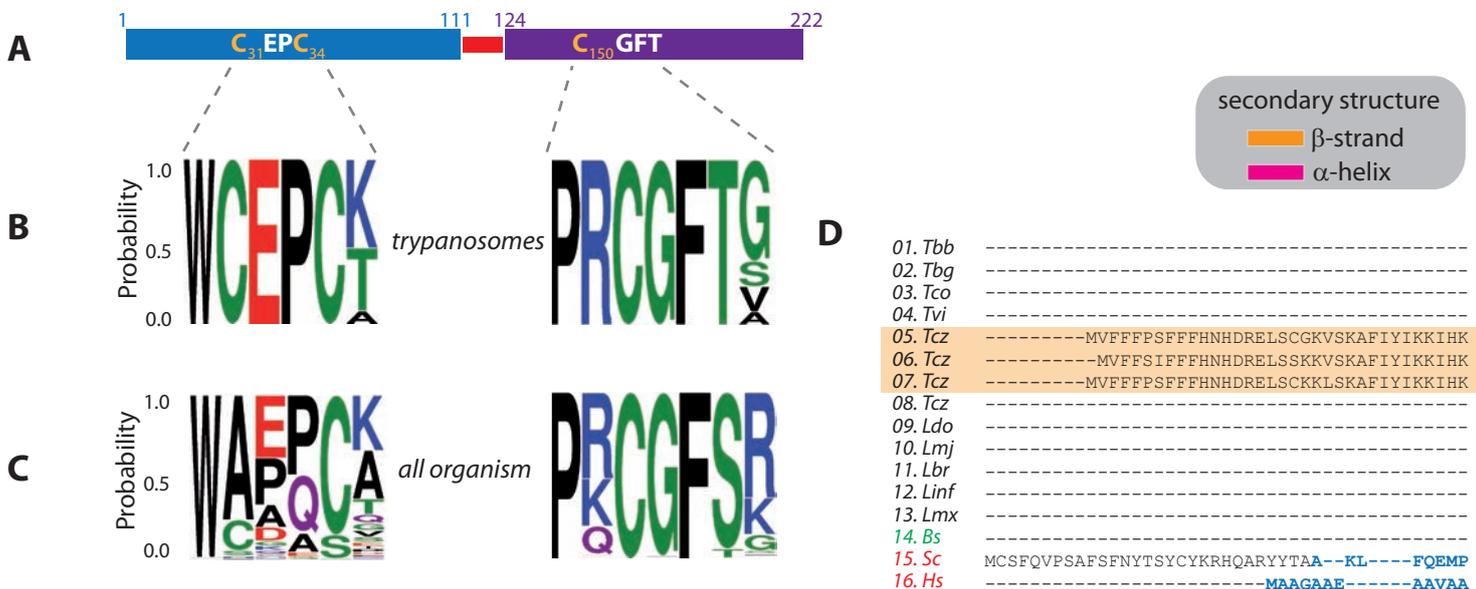
## Figura 2.8. Distribución de dominios y conservación de secuencia en 1-C-Grx3 de tripanosomas

**A. Dominios en *Tb1-C-Grx3*.** En la figura se muestra un esquema indicando la distribución de dominios y la posición y secuencia de cada uno de los sitios activos en *Tb1-C-Grx3*. El dominio aminoterminal Trx se presenta en azul mientras que el dominio carboxilterminal Grx se presenta en violeta. La secuencia de conexión entre ambos se presenta en rojo.

**B. Logo de secuencia de los sitios activos Trx y Grx en tripanosomas.** En base a una búsqueda por Delta-BLAST restringida a tripanosomas se recuperaron secuencias correspondientes a proteínas ortólogas de *Tb1-C-Grx3* (ver texto), las cuales fueron alineadas con Clustal Omega (secuencias 1-13 en D). La región del alineamiento correspondiente al sitio activo del dominio Trx (*izquierda*) y Grx (*derecha*) (Figura 2.4) fue seleccionada para presentar su conservación en forma de logo de secuencia.

**C. Logo de secuencia de los sitios activos Trx y Grx en proteínas relacionadas.** Análogamente a lo comentado, una búsqueda por Delta-BLAST *sin restricciones* permitió recuperar miles de secuencias relacionadas a *Tb1-C-Grx3* de donde se seleccionaron 276 con nivel de cobertura mayor al 85% las cuales fueron alineadas y este alineamiento fue utilizado para realizar el logo de secuencia de las regiones del sitio activo Trx (*izquierda*) y Grx (*derecha*). El código de colores de los aminoácidos presentados en los logos de la parte B y C es verde para polar, violeta para neutral, azul para básicos, rojo para ácidos y negro para hidrofóbicos (indicado en la figura).

**D. Alineamiento y conservación de motivos en proteínas ortólogas de tripanosomas.** Alineamiento mediante Clustal Omega de 13 secuencias de proteínas ortólogas a *Tb1-C-Grx3* presentes en tripanosomas, así como 3 secuencias de otros organismos con fines comparativos (secuencias 14-16). Todas las secuencias fueron analizadas con los programas PROSITE, SCOPE, SIGNAL-P y MITOPROT para predicción de dominios y péptidos señal (ver detalles en Capítulo 7). Los elementos de estructura secundaria en *Tb1-C-Grx3* fueron predichos mediante PSIPRED (McGuffin et al., 2000) e I-TASSER (Roy et al., 2010, 2012; Zhang, 2008) y se representan como barras de color púrpura (hélices  $\alpha$ ) o anaranjadas (hebras  $\beta$ ). El código de colores es el mismo que en A, donde el dominio Trx está presentado en azul, el dominio Grx en violeta y la conexión entre ambos en rojo. Los residuos presentados en letras negras no son asignados a ningún dominio. La extensión aminoterminal no conservada presente en las secuencias de *T. cruzi* (5-7, fondo amarillo) constituye una señal de localización peroxisomal/glicosomal (no mostrado). Las regiones donde se ubican el sitio activo en los dominios Trx y Grx se destacan en letras blancas y fondo celeste y violeta, respectivamente. Las cabezas de flecha de color negro indican la posición de los residuos de prolina conservados (ver texto) y las cabezas de flecha roja indican la posición correspondiente al residuo de prolina ubicado 5 lugares río abajo del sitio activo y de la isoleucina anterior a la *cis*-Pro, ambas conservadas entre tiorredoxinas y ausentes en las secuencias de tripanosomátidos. Las estrellas indican posiciones dentro del dominio Grx involucrados en la unión de GSH y se colorean según la siguiente clave: negro indica la presencia de residuo conservado, verde implican una variante conservativa y rojo implica una variante no conservativa, en todos los casos respecto a las secuencias de los dominios Grx de ortólogos de 1-C-Grx3 (indicadas con letras rojas en secuencias 15 y 16). Las secuencias utilizadas son las siguientes (número en la figura, acrónimo, especie, referencia de secuencia y, en caso de ser posible, un nombre común): **1.** *Tbb*, *Trypanosoma brucei brucei* cepa 927/4 GUTat10.1, XP\_844769 (1-C-Grx3); **2.** *Tbg*, *T. b. gambiense* DAL972, CBH10993; **3.** *Tco*, *T. congolense* IL3000, CCC90374; **4.** *Tvi*, *T. vivax* Y486, CCC47845; **5.** *Tcz*, *T. cruzi* cepa CL Brener, XP\_813048; **6.** *Tcz*, *T. cruzi*, EKG01498; **7.** *Tcz*, *T. cruzi* cepa CL Brener, XP\_812603; **8.** *Tcz*, *T. cruzi marinkellei*, EKF32139; **9.** *Ldo*, *Leishmania donovani*, XP\_003864711; **10.** *Lmj*, *L. major* cepa Friedlin, XP\_003722518; **11.** *Lbr*, *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, XP\_001568227; **12.** *Linf*, *L. infantum* JPCM5, XP\_001468938; **13.** *Lmx*, *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103, XP\_003879121; **14.** *Bs*, *Bodo saltans*, BS45360.1; **15.** *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*, YPL059W, Q03835 (Grx3); **16.** *Hs*, *Homo sapiens*, O76003 (Grx3/PICOT).



(D cont)



15. ALQS-----

16. **APKLEERLKVLTNKAASVMLFMKGNKQEAQCGFSKQILELLNSTGVEYETFDILEDEEVRQGLKAYSNWPFPQVYVKGELVGGGLDIVKELKENGELLPLRGEN** 2<sup>nd</sup> Grx domain of *HsGrx3*

### Figura 3.1. Análisis de alineamiento múltiple de secuencias de 1-C-Grx1 de tripanosomátidos y secuencias relacionadas de otros organismos

En la figura se muestra el alineamiento de secuencias homólogas a *Tb1-C-Grx1*. Todas las secuencias fueron analizadas con los programas PROSITE, SCOPE, Signal-P y MitoProt (ver Capítulo 7) y las regiones asignadas a elementos de secuencia se indican en letra negrita y según el código de colores de la Figura 2.4 (dominio Grx en letras violetas, MTS en gris y la extensión amino-terminal en verde). La región conservada de la extensión NTE se indica sobre fondo celeste y el motivo comentado en el texto en letras rojas. En el dominio Grx, los fondos rojos y verdes indican residuos conservados en *identidad* y *similitud*, respectivamente, mientras que el fondo celeste indica posiciones de *similitud conservada* donde solo una secuencia del alineamiento muestra una sustitución no conservativa, indicada en letras rojas (clave de colores indicada en la Figura). La cabeza de flecha roja, negra y amarilla indican la posición de la cisteína del sitio activo, la *cis*-Pro y la posición del residuo de cisteína C181 comentado en el texto, respectivamente. Los residuos conservados de unión a GSH se indican debajo del alineamiento con círculos grises. Las secuencias utilizadas son las siguientes (Nº, nombre, especie (nombre de proteína si corresponde, referencia de acceso): **1.** *Tbb*, *Trypanosoma brucei brucei* cepa 927/4 GUTat10.1 (1-C-Grx1, CAF02300); **2.** *Tbg*, *T.b. gambiense* DAL972 (CBH14109); **3.** *Tco*, *T. congolense* IL3000 (CCD12136); **4.** *Tvi*, *T. vivax* Y486 (CCC50293); **5.** *Tcz*, *T. cruzi* cepa CL Brener (XP\_818148); **6.** *Lmj*, *Leishmania major* cepa Friedlin (XP\_003721531); **7.** *Lmx*, *L. mexicana* MHOM/GT/2001/U1103 (XP003871536); **8.** *Ldo*, *L. donovani* (XP\_003857824); **9.** *Lin*, *L. infantum* JPCM5 (XP001462624); **10.** *Lbr*, *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (XP\_001561455); **11.** *Bs*, *B. saltans* (BS31335.1); **12.** *Eg*, *E. gracilis* (secuencia provista por el Dr. M.W. Gray, isotig06912-WT, no publicado); **13.** *Ac*, *Acanthamoeba castellanii* (XP\_004348697); **14.** *Ng*, *Naegleria gruberi* (XP\_002683279); **15.** *Gi*, *Giardia intestinalis* (Gigrx1, XP\_001709192); **16.** *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae* (ScGrx5, YPL059W); **17.** *Hs*, *Homo sapiens* (*HsGrx5*, AAH23528); **18.** *Ce*, *Caenorhabditis elegans* (CeGLRX-5, NP499610); **19.** *Dr*, *Danio rerio* (*DrGrx5*, NP998186); **20.** *Pt*, *Populus trichocarpa* (*PtGrxS15*, XP002303260); **21.** *At*, *Arabidopsis thaliana* (*AtGrxS15/Grx4*, AT3G15660); **22.** *Ec*, *Escherichia coli* cepa K-12 / MG1655 (*EcGrx4*, NP416171). La secuencia 14 (*N.gruberi*) no presenta un MTS predecible. El MTS de la secuencia 15 (*G intestinalis*) se indica según la determinación experimental mostrada en (Rada et al., 2009) y no según los predictores indicados más arriba. Como se indica en el texto, las secuencias 11-19 y 22 son, muy probablemente, ortólogos de *Tb1-C-Grx2*.

```

1. Tbb -----MR--R-LSGSTCLLTGVTRAGRWLPTTAP--CL-S--LCSFF---LT--AS-----RRKQSTSGIGGD-V-RDIEETHPDFQPRLV SAD---LAEDEIAMV
2. Tbg -----MR--R-LSGSTCLLTGVTRAGRWLPTTAP--CL-S--LCSF---LT--AS-----RRKQSTSGIGGD-V-RDIEETHPDFQPRLV SAD---LAEDEIAMV
3. Tco -----MQ--RLCNSVVCRTVGVTVPRHLSMAAL--CF-P--ARSAS---IT--AALR---DSAVITGTSNAGGD-V-RDTEETHPDFQPRLINAD---VADEVAMV
4. Tvi -----MQ--RLSSF-LIRRAGVAMFGSIPN-CW--CL-Q--PVRPF---HT--T-----TVIHSRSDVVGDD-V-HDTEWTHPDFQPRIVS TD---IADEVMTV
5. Tcz -----MK--RFCNAFSG--QSFSLFRRLPAVSS--LL-QLHQQLRF---MT--AA-----PTNGGGILGDGD-V-REREETHPDFQPRLVNTE---LADEVAMV
6. Lmj -----ML--PFSY--RVLMRGVS AVSVALQHRAL-AGTTRSFS--SS--RFVWLAPAAPTQKAPPAM-GG-D-TDAEETHPDFQPRMVSSD---LAQDEIAMI
7. Lmx -----ML--PFSY--RVLMRGVS AVSVALRHRTL-AGTTRSFC---SS--NPVWLAPAAPTQKAPPAM-GG-D-TDAEETHPDFQPRMVSSD---LAQDEIAMI
8. Ldo -----ML--PFSY--RVLMRGVS AVSVALQHRAL-AGTTRSFS--SS--SLVWLAPASAPTQTPPAM-GG-D-TDAEETHPDFQPRMVSSD---LAQDEIAMI
9. Lin -----ML--PFSY--RVLMRGVS AVSVALQHRAL-AGTTRSFS--SS--SLVWLAPAAPTQTPPAM-GG-D-TDAEETHPDFQPRMVSSD---LAQDEIAMI
10. Lbr -----ML--SFSY--RPLMRGVLATAGASLMALPNRAL-TATTRSFLY---SS--NLVRLAPVVPKDSPTM-GG-D-PDLEE THPDFQPRIVGGD---LAEDEIAMI

11. Bs -----MR--RVL SRHCALLSSAAATCRPSTFASQLRCS-S-----N--SS-----GFIPPTAPPLGGD-V-NKDADTHPDFQPRIVSSSSVSDSSYDEIEAI
12. Eg -----MMKPMPI SFARFATRSLLVPTSN---PKFQLPPFC-----FATIHT-----PGTHPDFAPKAKNPQE--ED---LEAA
13. Ac -----MQKRRLFSTALNRSRSVV-TSRAAL--LSLRSV-S-SPCSYAPIAPR--QQRWYTDDNK-EVGSEVATDSVQDAIKKVRNLNFPSPRPE-----ALT
14. Ng -----MLIILF-----LSDLTFPFTD-----YG-----TITRYQS-----R--MK---TLEM
15. Gi MDQINGGLFPKALALT--RYAS--RGLILGII SAGAELNQLAGFLTRRYPRSLFLPNAQNSVSRFLMPVCAP-----LATVSRGLERTSDLNATLAQ--SESIKQ--EL---KMF I
16. Sc -----MFLPKFNPIRSFS-----PI---LR--AKT-----LLR-----YQNRMYLS-----TEI
17. Hs -----MSGSLG-----RAAA-A---LLRWGR--GAG-GGGLWGPVGR-----AAGSGAGG-----GGS
18. Ce -----MLRVLS-----RQAFSMVR--AANF-----SASAS-----SAGGGGLS-----DEV
19. Dr -----MNSVFR-----STAR-CLR--SATWQYKTAHK-NGELSVGRAR-----LM---CS---SAG
20. Pt -----MA--RLLS--NTILKGISRAS-----QSPRI--VPASFNHVKL-----RFSTTIPNDPDSHADFPQPNKAVNE--SGSCSGINI
21. At -----MA--ASLS--SRLIKGIANLKA-----VRSSRLTSASVYQNGMM-----RFSSTVPSDSDTHDDFKPTQKVPPD--S---TDSL
22. Ec -----MSTT

```

```

1. Tbb KKDIDDTIKSEDVVTFIKGLPEAPMCAYSKRMIDVLEALGL---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFIKAEFVGGDLIVTKMLESGLKMKLRDKGITCRDL-----
2. Tbg KKDIDDTIKSEDVVTFIKGLPEAPMCAYSKRMIDVLEALGL---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFIKAEFVGGDLIVTKMLESGLKMKLRDKGITCRDL-----
3. Tco KKDIDDTIKSEDVVTFIKGLPEAPMCAF SKRMIDVLDALGL---EYTSFDVLAHPVVRTHVKEVSEWPTIPQLFIKGEFVGGDLIVTKMLESGLKHLQSKGITYRDI-----
4. Tvi KKDIDDTIKSEDVVAFIKGLPEAPMCAF SKRMIDVLEALGL---EYTSFDVLAHPVVRVYVKEISEWPTIPQLFVKGEFVGGDLIVLKMLESGLKLLQSKGIDCRNL-----
5. Tcz KKDIDDTIQTEDVVVFIKGVPEAPMCAF SKRLIDILEALGL---EYTSFDVLAHPVVRVYVKEVSEWPTIPQLFLKGEFVGGDLVVQKMAEGGDLQKLLQHKGISYRGEQS-----
6. Lmj KKDIDDTIRDEDIVVFIKGVPEAPMCAF SKRMIDVMEALGV---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFVKGEFAGGVDIILKMAESGDLQMLLDQKSIKHRDTKP-----
7. Lmx KKDIDDTIRDEDIVVFIKGVPEAPMCAF SKRMIDVMEALGV---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQV FVKGEFAGGVDIVLKMAESGDLQMLLDQKGIKHRDAKP-----
8. Ldo KKDIDDTIRDEDIVVFIKGVPEAPMCAF SKRMIDVMEALGV---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFVKGEFAGGVDIILKMAEGGDLQMLLDQKGIKHRDTKP-----
9. Lin KKDIDDTIRDEDIVVFIKGVPEAPMCAF SKRMIDVMEALGV---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFVKGEFAGGVDIILKMAEGGDLQMLLDQKGIKHRDTKP-----
10. Lbr KKDIVDTIRDEEIVVFIKGVPEAPMCAF SKRMIDVMEALGV---EYTSFDVLAHPVRSYVKEVSEWPTIPQLFIKGEFVGGVDIILKMAESGDLQMLLDQKGVKHCAGAKS-----

11. Bs KKDIRDITKDEEVVLFMKGLPEAPVCGFSKLLVDVLEALGL---EYTSFDVLAHPVVRVYVKELSDWPTIPQLVWKNEFVGGVDIILKMAESGELQGVLDKHHIKHRNKI-----
12. Eg IEEMKKDIQDNHVLFMKGEPKNPQCGFSAKVVQILAQYQG---KYIAYNVLADPLIRAGVKKISNWPTIPQLVYNGEFVGGCDIVTEMHNNELADVLKPKKAK-----
13. Ac LTRAVQVVS EYPCVVFEMKGTQDAPCGFSNATIKALNTVGA---HYEAFDVLQSAELRDKIKKFTDWPPTIPQVFI GGEFVGGCDITLQHLRSGELTTLLEKAKALKSQQ-----
14. Ng KEEIQKIIESNNIVLFMKGTPQREPCGFSGAVVQILKLYDV---EYHSENMKDTMMKEALKEYSDWPTIPQLVYNGKFIGGSDIVLNYHKNHEFQDVLDGKL-----
15. Gi LPQIRELLAENPVVLFMKGTPDSPECGFSKFAFMLKYNNI---SFGVDVLDLDPALRQIKLYGNWPTIPQLVYNGELIGGSDIIQQLHESGELRQVCGGLPD-----
16. Sc RKAIEDAIESAPVLFMKGTPEFPFCGFSRATIGLLGNQVDPAKFAAYNVLEDPQLREGIKFSEWPTIPQLVYNGEFIGGCDIVITSMARSGELADLLEEAQALVPEEEE--ETKDR
17. Hs AEQLDALVKKDKVVFLKGTPEQPQCGFSNAVQILRLHGVR---DYAAYNVLDLDPQLRQIKDYSNWPTIPQVYNGEFVGGCDIILQMHQNGDLVEELKKGILHSTLLDEKDKQDSK
18. Ce RKRIDGIVKDDVVVFEMKGTQQEPACGFSRNVKLVDFHNV---KFQDYNVLTQELREGVKIFSEWPTIPQVYVNGEFVGGCDIILSMHKDGEISDFLDEKGISNKYKQ-----
19. Dr QKNLEEMVKKDKVVVFEMKGTQAPMCGFSNAVQILRMHGVD---NYASYNVLDLQDVRQIKTFSNWPTIPQVYNGEFVGGCDIILQMHQSGDLVEELQKLGIRALLDQEKESK--
20. Pt KELVDKDVKEHPIVIMKGYPDLPQCGFSALAVRVLKQYNV---PITARNILEYDRLRGTGVKAYSNWPTFPQIFIKGEFIGGSDIIMNMHQTGELKEKLDIAGKEESE-----
21. At KDIVENDKDNPMVMIYMKGVPEPQCGFSSLAVRVLQYQNV---PISSRNILEQELKNAVKSFSHWPTFPQIFIKGEFIGGSDIILNMHEGELEQKLDVSGNQD-----
22. Ec IEKIQRQIAENPILLYMKGSFKPLSCGFSQAQVQALACGE---RFAYVDILQNPDIRAELPKYANWPTFPQLVWDGELVGGCDIVIEMYQRGELQOLIKETAAYKSEEPDAE----

```

- full identity match
- full similarity match
- single non-similar difference (red letters)

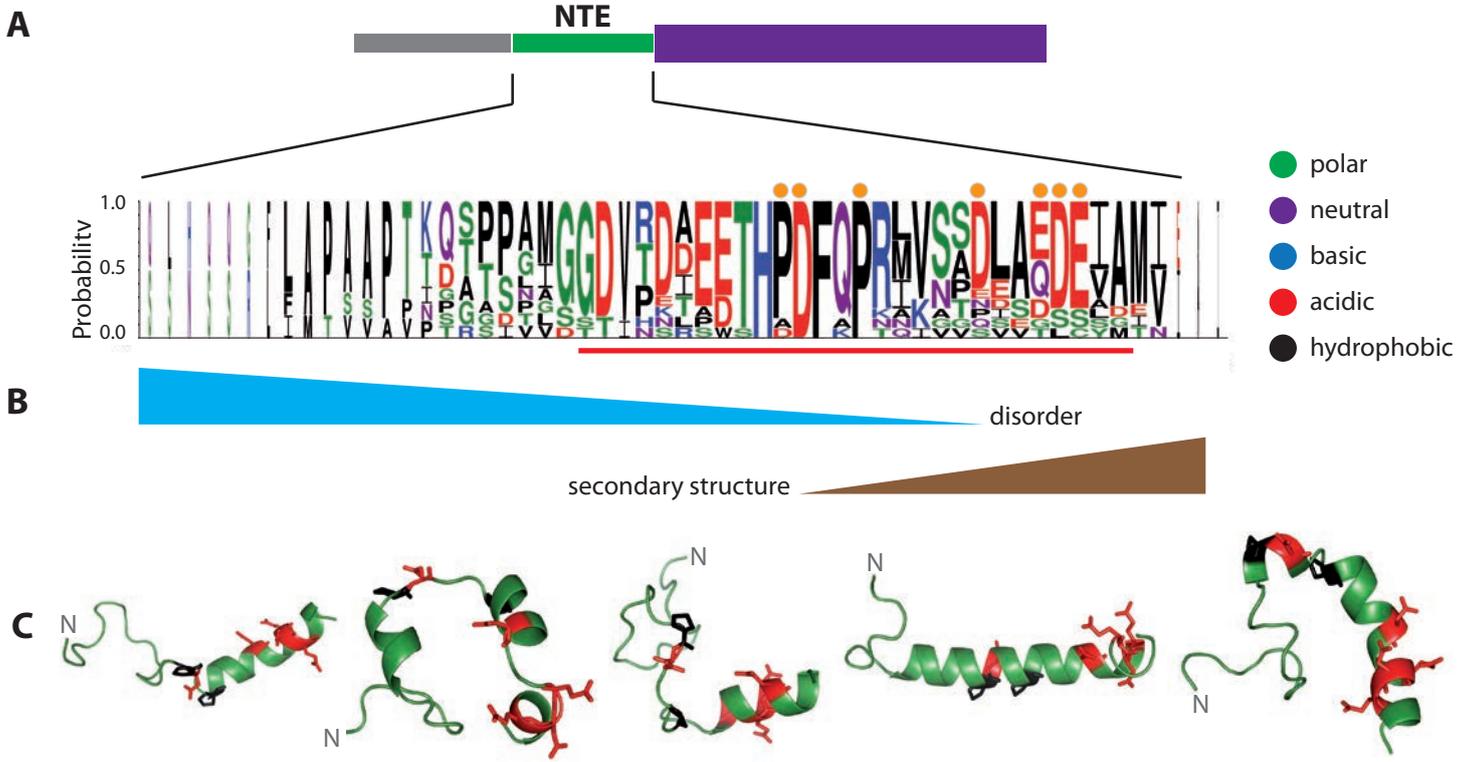
### **Figura 3.2. Características de la secuencia de localización mitocondrial de *Tb1-C-Grx1***

En la figura se muestra el logo de los MTS de las secuencias 1-10 (familia *Trypanosomatidae*, "tryps") y secuencia 1-22 ("all") presentadas en la Figura 3.1. En cada posición, la ocupación del espacio vertical se calcula por la frecuencia relativa de cada *tipo de residuo* en esa posición del alineamiento mientras que la ocupación del espacio horizontal representa la abundancia relativa de la *presencia de residuos* en esa posición del alineamiento. Los aminoácidos se colorean según: verde para residuos polares, violeta para neutrales, azul para básicos, rojo para ácidos y negro para hidrofóbicos.



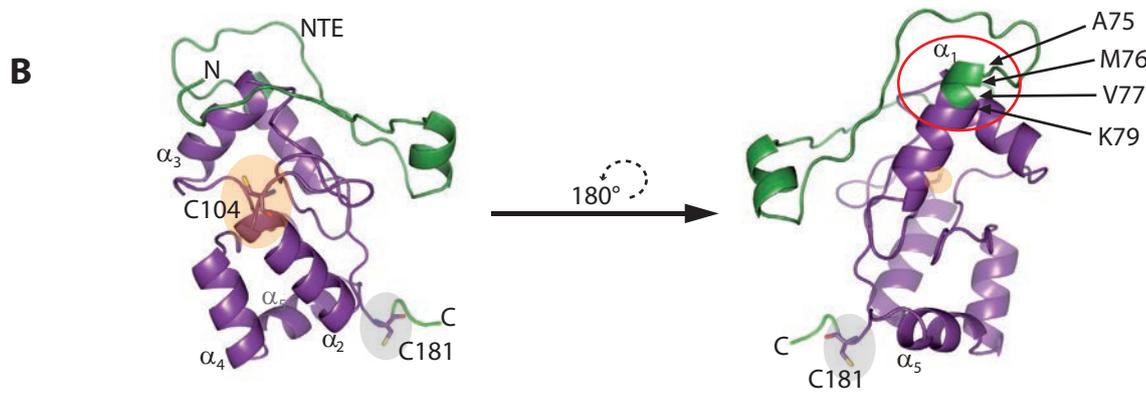
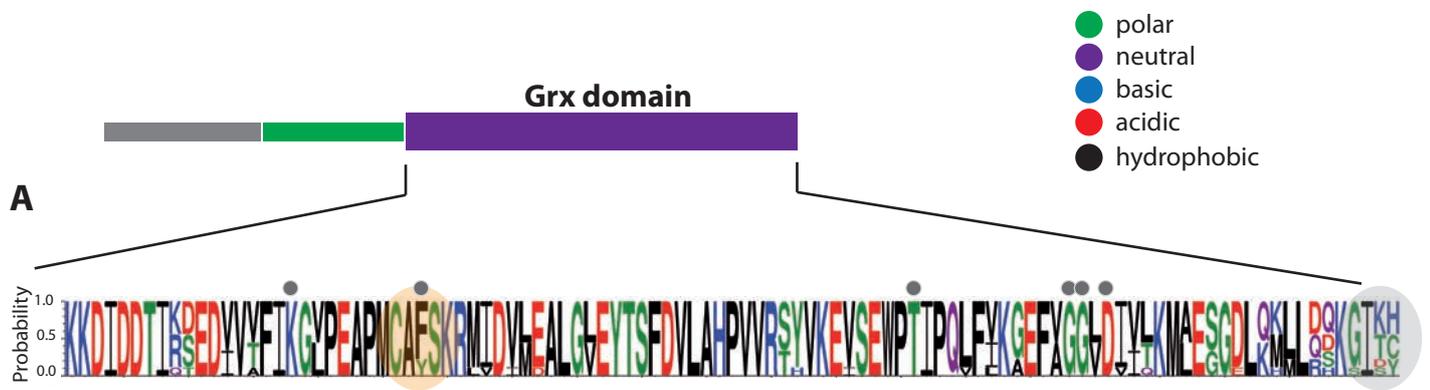
### **Figure 3.3. Análisis de secuencia y predicción de estructura de la extensión aminoterminal de *Tb1-C-Grx1***

**A.** Logo de las regiones NTE de las secuencias 1-C-Grx1 de euglénidos y proteínas homólogas de plantas (secuencias 1-12, 20 y 21 en Figura 3.1). **B.** Las formas triangulares representan el resumen de las predicciones de estructura realizadas con la secuencia del NTE de *Tb1-C-Grx1* según se describe en Materiales y Métodos (Capítulo 7). En celeste se indica la propensión de la región a encontrarse desplegada en condiciones nativas y en marrón a formar estructuras secundarias regulares. **C.** Modelos estructurales de la extensión aminoterminal de *Tb1-C-Grx1* realizados con I-TASSER. Si bien ninguno de ellos posee un “score” adecuado para considerarlo una estructura representativa, en la figura se evidencia la tendencia de la primera mitad del NTE a formar estructuras desordenadas y de la segunda a formar hélices (ver texto). Los residuos cargados positivamente y las prolinas conservadas (indicados con puntos naranjas sobre el logo) se indican en los modelos estructurales en rojo y negro, respectivamente.



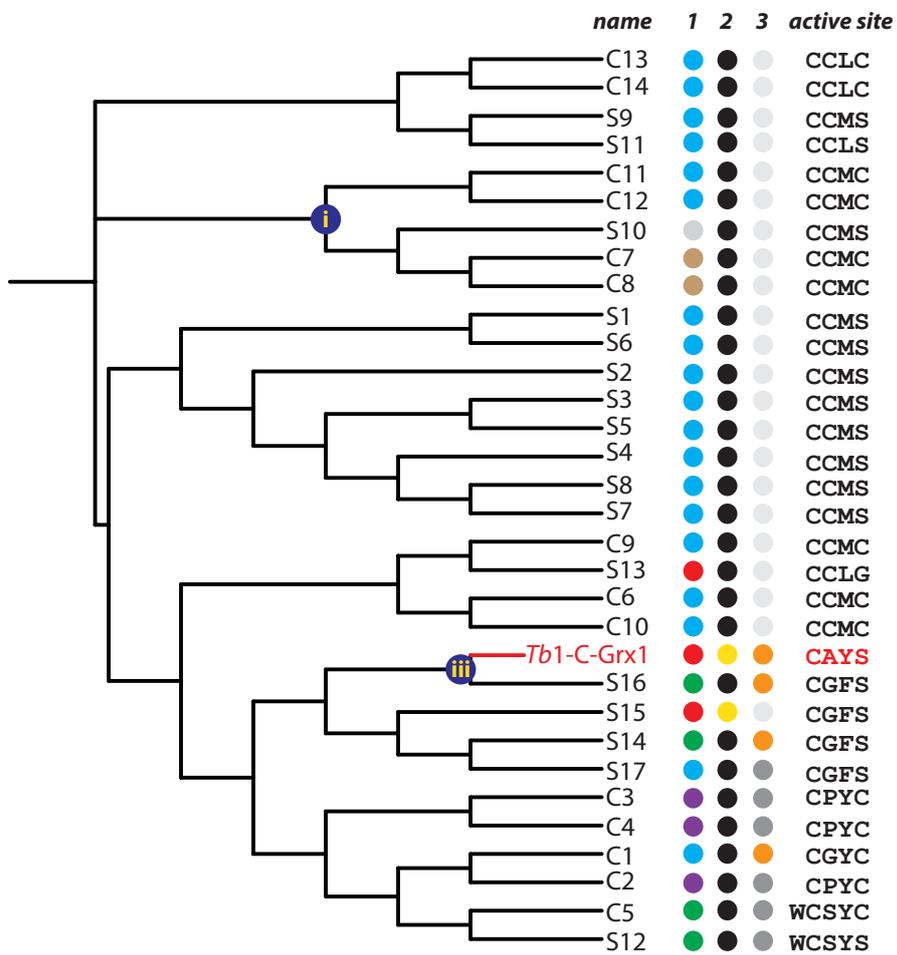
### **Figura 3.4. Conservación de secuencia y modelo estructural del dominio Grx de *Tb1-C-Grx1***

**A.** Logo de secuencia del dominio Grx de las secuencias 1-C-Grx1 de tripanosomátidos (secuencias 1-10; Figura 3.1) donde se indican los residuos conservados que participan en la unión de GSH (puntos grises), la región del sitio activo (fondo naranja) y la región del residuo C181 (fondo gris). Los aminoácidos se colorean según: verde para residuos polares, violeta para neutrales, azul para básicos, rojo para ácidos y negro para hidrofóbicos. **B.** Modelo tridimensional construido *in silico* mediante I-TASSER a partir de la secuencia de *Tb1-C-Grx1* sin MTS. Los colores representan los dominios Grx (violeta) y NTE (verde). Se indica la posición de los residuos de cisteína destacados en A, así como el comienzo de la hélice  $\alpha 1$ , donde se incluye el inicio del dominio Grx (ver texto).



### Figura 3.5. Dendrograma de las Grx presentes en plantas y su relación con *Tb1-C-Grx1*

Las secuencias de *A. thaliana* fueron tomadas de (Rouhier et al., 2004) y alineadas junto la versión completa de *Tb1-C-Grx1* (**i**), el dominio Grx más la región NTE (**ii**) o solo el dominio Grx (**iii**). El alineamiento obtenido en **ii** es el que se muestra en el dendrograma mostrado y es idéntico a los obtenidos para los alineamientos **i** y **iii**, con la excepción de la rotación de los nodos indicados en la figura con la numeración equivalente. El dendrograma obtenido al no incluir la proteína de *T. brucei* es equivalente (no mostrado), en particular en la parte inferior donde la presencia de *Tb1-C-Grx1* podría afectar y compara de manera prácticamente idéntica con el árbol reportado en (Laporte et al., 2012). A la derecha de las ramas se indica el nombre común de la proteína según (Rouhier, 2010; Rouhier et al., 2004), su localización subcelular (columna **1**, actualizada según <http://www.arabidopsis.org> y la literatura citada a continuación), la presencia o no de una extensión aminoterminal similar a la presente en *Tb1-C-Grx1* (columna **2**, analizada por alineamientos y predicción de dominios y secuencias de localización subcelular, no mostrado), la capacidad de la proteína de coordinar *in vitro* centros ferrosulfurados (columna **3**, tomado de la literatura citada) y la secuencia del sitio activo (**4**). Se eligió *A. thaliana* para realizar el análisis porque su genoma está mejor anotado, si bien también se dispone información sobre Grx de *Populus trichocarpa* (Couturier et al., 2009a), *Oryza sativa* (Garg et al., 2010) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Gao et al., 2010; Zaffagnini et al., 2008) la cual es cualitativamente equivalente (no mostrado). A continuación se listan el nombre sistemático/común y códigos de las secuencias usadas para construir la figuras, así como otra información y artículos específicos sobre estas proteínas u ortólogas en *P. trichocarpa*: **C1**, AT5G63030, estructuras resueltas PDB ID 2E7P en forma holo y 1Z7P en forma apo (Feng et al., 2006; Riondet et al., 2012; Rouhier et al., 2007); **C2**, AT5G40370 (Riondet et al., 2012); **C3**, AT1G77370; **C4**, AT5G20500 (Noguera et al., 2005; Rouhier et al., 2002, 2007); **C5**, AT4G28730 (Couturier et al., 2011); **C6**, AT4G33040; **C7**/ROXY1 (Xing et al., 2005), AT3G02000; **C8**/ROXY2, AT5G14070 (Xing and Zachgo, 2008); **C9**, AT1G28480; **C10**, AT5G11930; **C11**, AT3G62950; **C12**, AT2G47870; **C13**, AT2G47880; **C14**, AT3G62960; **S1**, AT1G03020; **S2**, AT5G18600; **S3**, AT4G15700; **S4**, AT4G15680; **S5**, AT4G15690; **S6**, AT3G62930; **S7**, AT4G15670; **S8**, AT4G15660; **S9**, AT2G30540; **S10**, AT3G21460; **S11**, AT1G06830 (por referencias sobre C6-C14 y S1-S11 ver (Ziemann et al., 2009); **S12**, AT2G20270, estructuras resueltas 3FZ9 y 3FZA (Couturier et al., 2009b; Zaffagnini et al., 2012); **S13**, AT1G03850 (Laporte et al., 2012); **S14**/AtGRXcp/CAX-interacting protein 1, AT3G54900 (Bandyopadhyay et al., 2008; Cheng et al., 2006; Li et al., 2010; Mapolelo et al., 2013; Wang et al., 2011); **S15**/Grx4 (secuencia n°21 en Figura 3.1, estructuras resueltas 3IPZ y 2LKU), AT3G15660 (Bandyopadhyay et al., 2008; Cheng, 2008; Rouhier et al., 2006); **S16**/CAX-interacting protein 2, AT2G38270, estructura del dominio aminoterminal 2LWF (Bandyopadhyay et al., 2008; Liu et al., 2013) y **S17**, AT4G04950 (Bandyopadhyay et al., 2008; Rouhier et al., 2006). GrxC5 posee ~70% de identidad de secuencia con GrxS12 y se encuentra exclusivamente en la familia *Brassicaceae*, probablemente derivada de una mutación puntual S→C en el sitio activo de GrxS12 (Couturier et al., 2011). *Tb1-C-Grx1* se indica en rojo.



### 1. subcellular localization

- nuclear
- cytosolic
- chloroplast
- mitochondria
- secretory pathway/membranous fraction
- not defined

### 2. N-terminal extension

- yes
- no

### 3. In vitro Fe-S cluster binding

- yes
- no
- not experimentally addressed

### Figura 3.6: Familia 1-C-Grx2 en tripanosomas

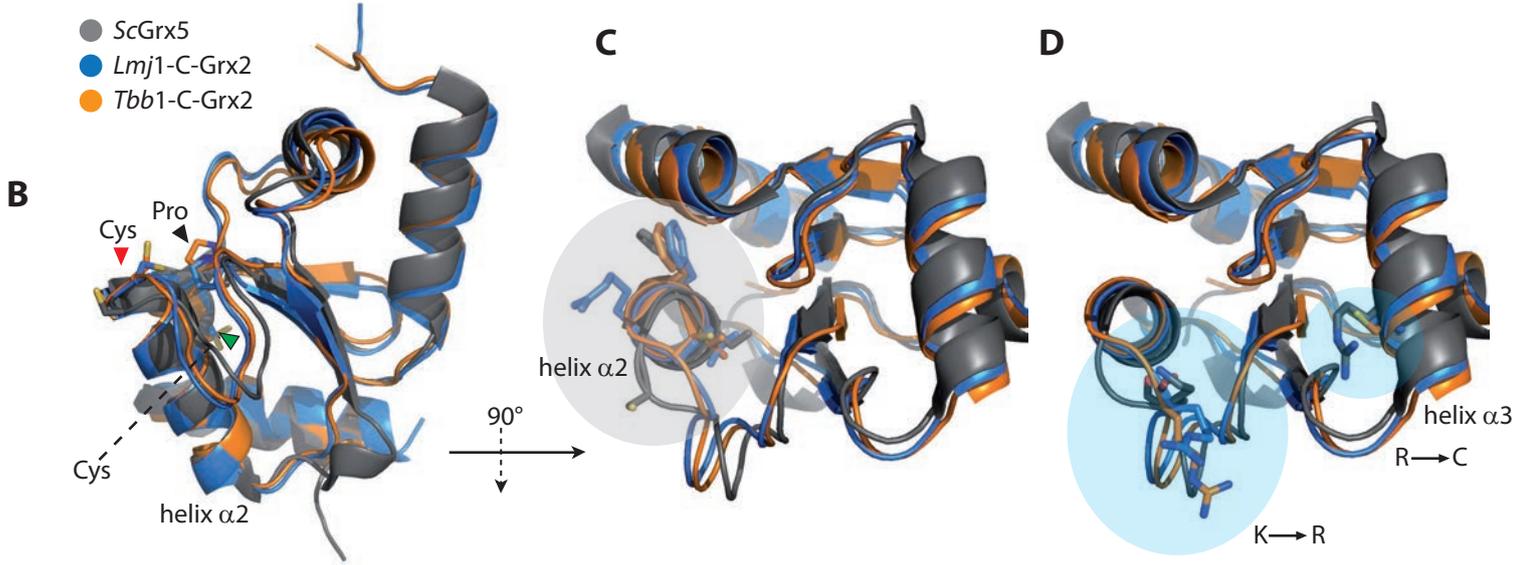
**A.** En la figura se muestra el alineamiento de los dominios Grx de 1-C-Grx2 y proteínas ortólogas en tripanosomátidos, en comparación a ScGrx5. Las secuencias fueron obtenidas por Delta-BLAST con *Tb1-C-Grx2* como sonda restringiendo la búsqueda a kinetoplastidos, curadas manualmente para identificación de dominio y péptidos de localización subcelular y posteriormente alineadas con Clustal Omega. En la figura se muestran solo los dominios Grx, si bien todas estas proteínas se predicen como mitocondriales por MITOPROT, PSORT y TARGETP (no mostrado). El sitio activo se indica sobre fondo gris, las posiciones estrictamente conservadas en las secuencias de tripanosomátidos y que difieren en la proteína modelo ScGrx5 se indican con fondo naranja y los residuos de K y R comentados en el texto sobre fondo celeste. Todos los residuos de cisteína externos al sitio activo se destacan en negrita. Las cabezas de flecha roja, negra y verde indican la posición de la cisteína del sitio activo, la *cis*-Pro y la segunda cisteína conservada en 1-C-Grx2 de tripanosomátidos. *Tb1-C-Grx2* (secuencia 1, (Comini et al., 2008; Filser et al., 2008)) y *Tc1-C-Grx2* (secuencia 4, Fleitas no publicado) se expresa a nivel de transcritpo y proteína. Para las demás, solo se dispone información de transcriptómica que indica que *Lmj1-C-Grx2* (secuencia 5) es expresada en la forma promastigota (Rastrojo et al., 2013). Las secuencia mostradas en la figura corresponden a (Número, Organismo, Código TriTryp): **1.** *Typanosoma brucei brucei*, Tb427.10.10420 (presentada en la Figura 2.1 en posición 31, XP\_823263); **2.** *T. b. gambiense*, Tbg972.10.12710; **3.** *T. vivax*, TvY486\_1010310; **4.** *T. cruzi* CL Brenner, TcCLB.503425.20; **5.** *Leishmania braziliensis*, LbrM.05.0310; **6.** *L. tarantolae*, LtaP05.0330; **7.** *L. mexicana*, LmxM.05.0310; **8.** *L. donovani*, LdBPK\_050320.1; **9.** *L. infantum*, LinJ.05.0320; **10.** *L. major*, LmjF.05.0310 y **11.** *S. cerevisiae*, (Grx5, YPL059W, Figura 3.1 y 4.5). **B-D.** Modelos estructurales de *Tb1-C-Grx2* y *L. major* 1-C-Grx2 (sin MTS) realizado con I-TASSER en base a las estructuras 3IPZ (*AtGrxS14*, (Li et al., 2010), Figura 3.5), 2LTK (*Tb1-C-Grx1Δ76*, (Manta et al., 2013a)), 2WUL (*HsGrx5*, (Johansson et al., 2010), Figura 4.5) y 3GX8 (*ScGrx5*, Figura 4.5) en comparación con *S. cerevisiae* Grx5. Cada estructura se indica de un color según la clave de la figura y los aminoácidos destacados se indican en forma de palos, coloreando las cadenas laterales según el átomo correspondiente (azul, rojo y amarillo para nitrógeno, oxígeno y azufre, respectivamente). En **B** se indica la cisteína del sitio activo, la *cis*-Pro y la segunda cisteína conservada en 1-C-Grx2 de tripanosomátidos, con la misma coloración que en A. En **C** se comparan los sitios activos de las 3 estructuras (región gris en A) y en **D** se compara las posiciones indicadas en celeste en la parte A y comentadas en el texto.

**A**

```

1. Tbb  ..AAAIRRIIAEDRIVIFLTGTPQEPRCGFTVKMVDMMHQLGV---KYSEFNILEDDEVCEGLKIYSDWPTYPQLYIDGDLVGGYDVCKGMLLSGQLTKLLKEKDLL-
2. Tbg  ..AAAIRRIIAEDRIVIFLTGTPQEPRCGFTVKMVDMMHQLGV---KYSEFNILEDDEVCEGLKIYSDWPTYPQLYIDGDLVGGYDVCKGMLLSGQLTKLLKEKDLL-
3. Tvi  ..ATAISNVISKDRVVVFLGTPEEPRCGFTIKMVDMLAQLGI---RYSSEFNILEDDEICEGLKRYSDWPTYPQLYIDGNLGGYDVCKDMLLNGQLTKLLKEKDLI-
4. Tcz  ..AASIKDIIKDRVVFVFLGTPEEPRCRFTTAQMVDMMQMGV---QYSEFNVLDDDDVCEGLKTYSDWPTYPQLYIDGELVGGYDVCKNMLLNGQLTRLFQEKKLL-
5. Lbr  ..AKDLHDIISHDRLVVFLGTPEQPRCRFTTAQLVDLFLNQLGI---KYTFNIMDDDEVCEGLKAYSDWPTYPQVYLDGELIGGYDICKMMLDGTLTSMLKAKNLI-
6. Lta  ..AKDLHDIICHDRLVVFLGTPEQPRCRFTTAQLVNLFLHQLGV---KYSEFNILDDDEVCEGLKVYSDWPTYPQVYLDGELIGGYDICKTMMLDGTLTMLKDKQLI-
7. Lmx  ..AKLDQDIIISHDRLVVFLGTPAQPRCRFTTAQLVDLLDQLGV---KYSEFNILDDDEVCEGLKAYSDWPTYPQVYVDGELLGGFDICKTMMLDGTLTMLKDKQLI-
8. Ldo  ..AKDLHDIICHDRLVVFLGTPEQPRCRFTTAQLVDLLDQLGV---KYSEFNIMDDEVCEGLKAYSDWPTYPQVYVDGELLGGFDICKTMMLDGTLTMLKDKQLI-
9. Lin  ..AKDLHDIICHDRLVVFLGTPEQPRCRFTTAQLVDLLDQLGV---KYSEFNIMDDEVCEGLKAYSDWPTYPQVYVDGELLGGFDICKTMMLDGTLTMLKDKQLI-
10. Lmj  ..AKDLHDIIGHDRLVVFLGTPEQPRCRFTTAQLVDLLDQLGV---QYSEFNIMDDEVCEGLKAYSDWPTYPQVYVDGELLGGFDICKTMMLDGTLTMLKDKQLI-
11. Sc   ..RKAIEDAIESAPVVFFMKGTPEPFKCGFSRATIGLLGNQGVDPAKFAAVNVLEDPELREGIKEFSEWPTIPQLVNKEFIGCDVITSMARSGELADLLEEAQALV...

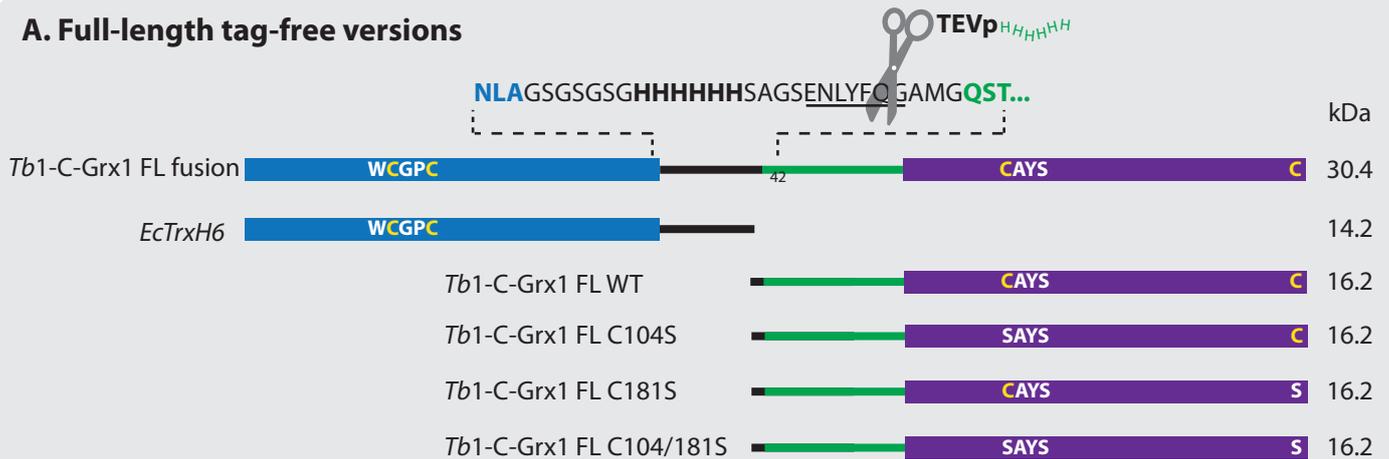
```



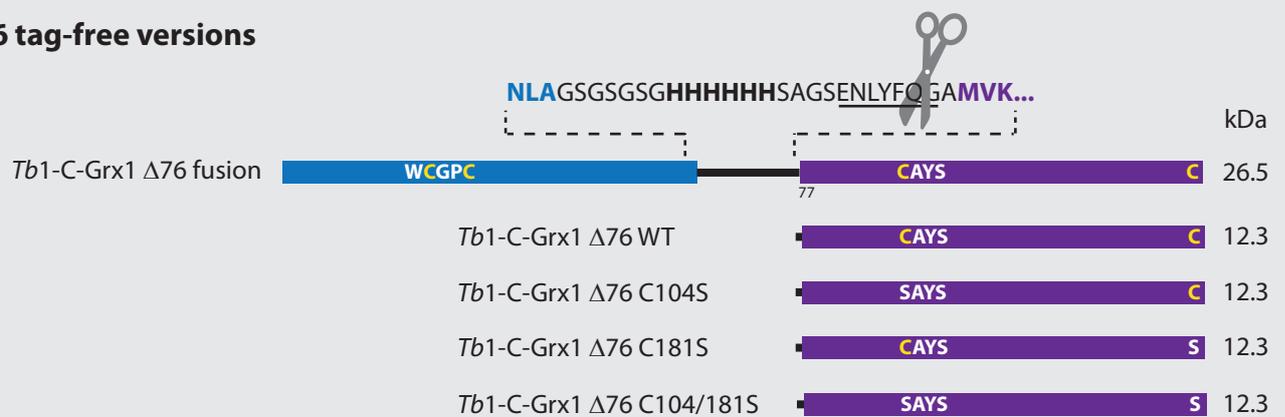
#### Figura 4.1. Versiones de *Tb1-C-Grx1* expresadas en este trabajo

**A.** Versión larga (FL, inicio en Q42) de *Tb1-C-Grx1* en su forma salvaje (WT) o mutantes simples (C104S, C181S) y doble (C104/181S) de cisteínas expresadas como fusión carboxilterminal a Trx1 de *E. coli* (*EcTrx*, indicada con color azul). En verde y violeta se indica la región NTE y el dominio Grx de *Tb1-C-Grx1*, respectivamente. Los residuos de sitio activo se muestran en letras blancas, resaltando las cisteínas en letras amarillas. La región en negro corresponde al *linker* que contiene un hexapéptido de histidinas (en negritas) y el sitio de corte para TEVp (subrayado). La proteasa se representa como una tijera y posee cola de histidinas. Luego de la proteólisis, la *Tb1-C-Grx1* incorpora los residuos GAMG del *linker* mientras que la proteína de fusión retiene la cola de hexahistidinas de este último (*EcTrxH6*). En el margen derecho se señalan los pesos moleculares (en kDa) de las distintas variantes de Grx producidas. **B.** Versión corta ( $\Delta 76$ , inicio en M77) de *Tb1-C-Grx1* en su forma salvaje (WT) o mutantes simples (C104S, C181S) y doble (C104/181S) de cisteínas expresadas como fusión C-terminal a *EcTrx*. Los colores y referencias son como en A, excepto que la *Tb1-C-Grx1* incorpora los residuos GA del *linker*. **C.** Versión larga (inicio en Q42) de la *Tb1-C-Grx1* en su forma salvaje (WT) o mutantes simples (C104S, C181S) y doble (C104/181S) de cisteínas expresadas con cola aminoterminal de histidinas (letras negritas). Los demás colores y referencias usados para la *Tb1-C-Grx1* son idénticos a los indicados en A. La barra inferior indica la escala de largo en aminoácidos para los esquemas mostrados en A-C.

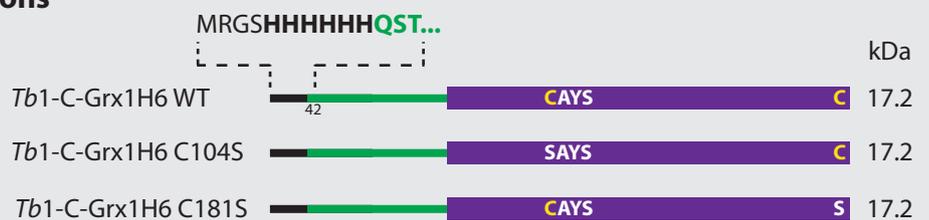
### A. Full-length tag-free versions



### B. Δ76 tag-free versions



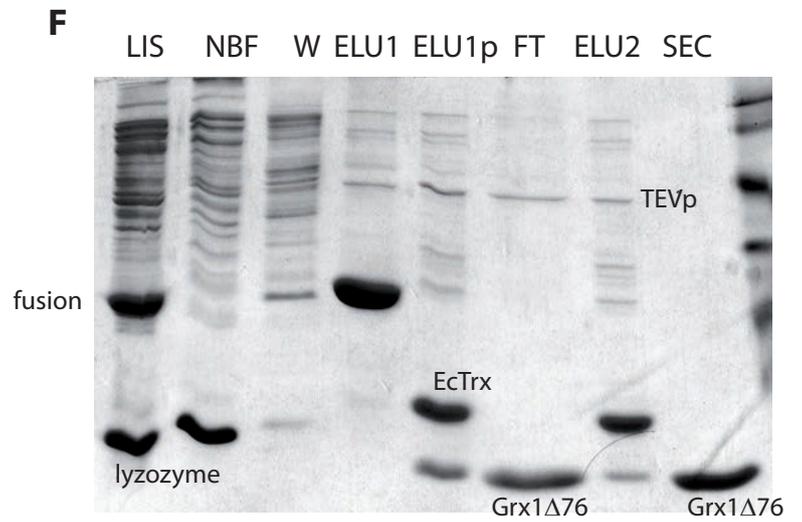
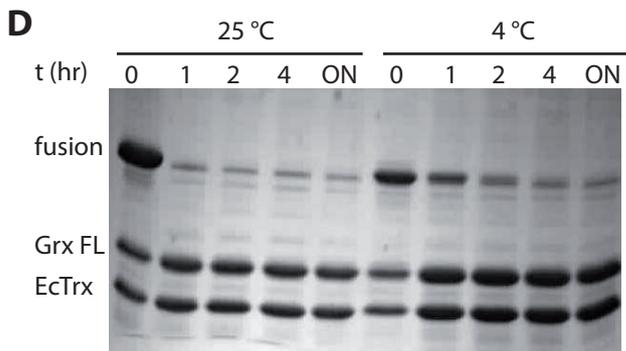
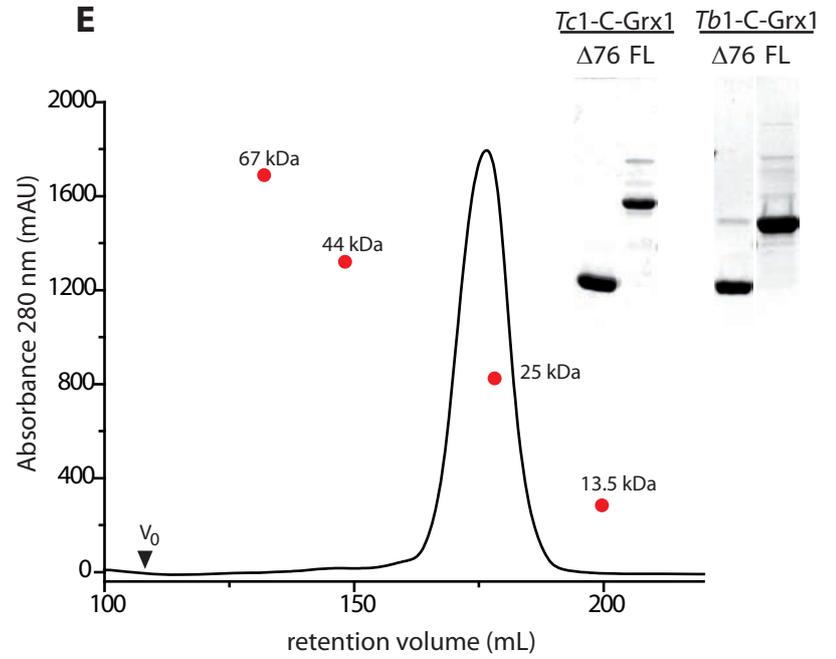
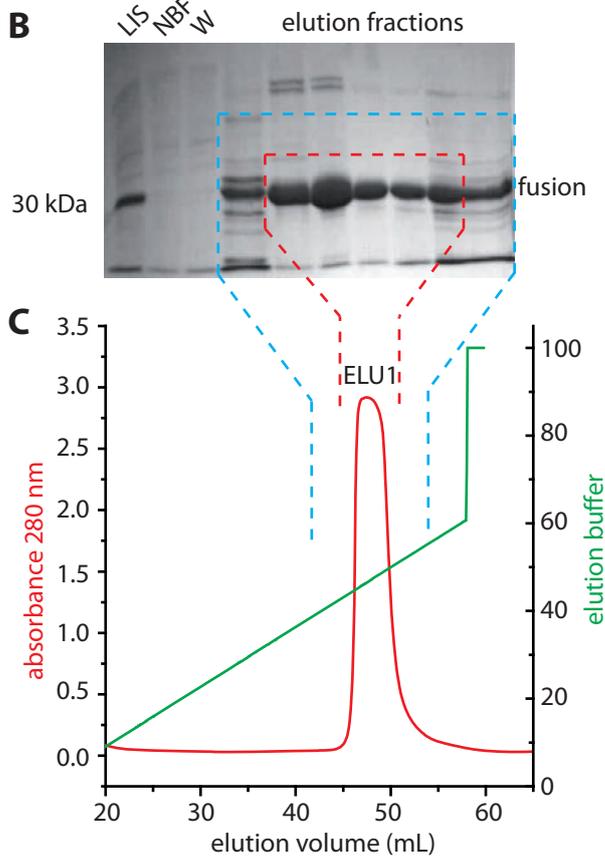
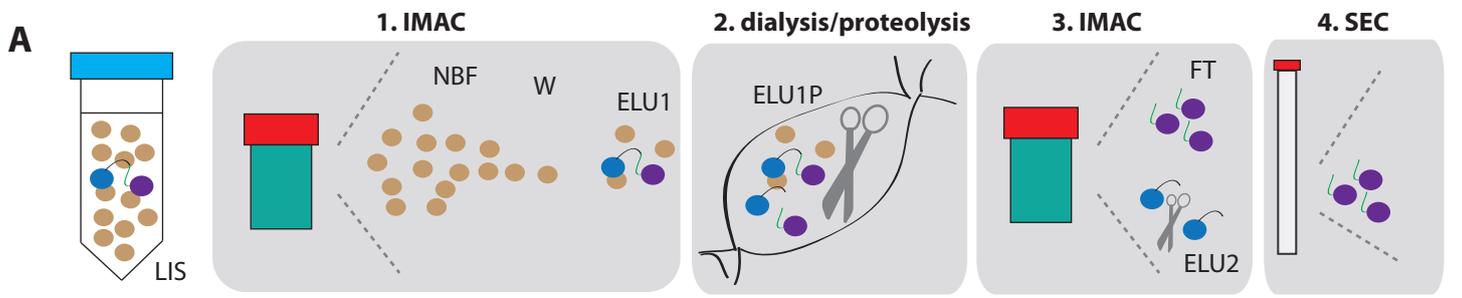
### C. Full-length His-tagged versions



20 aa

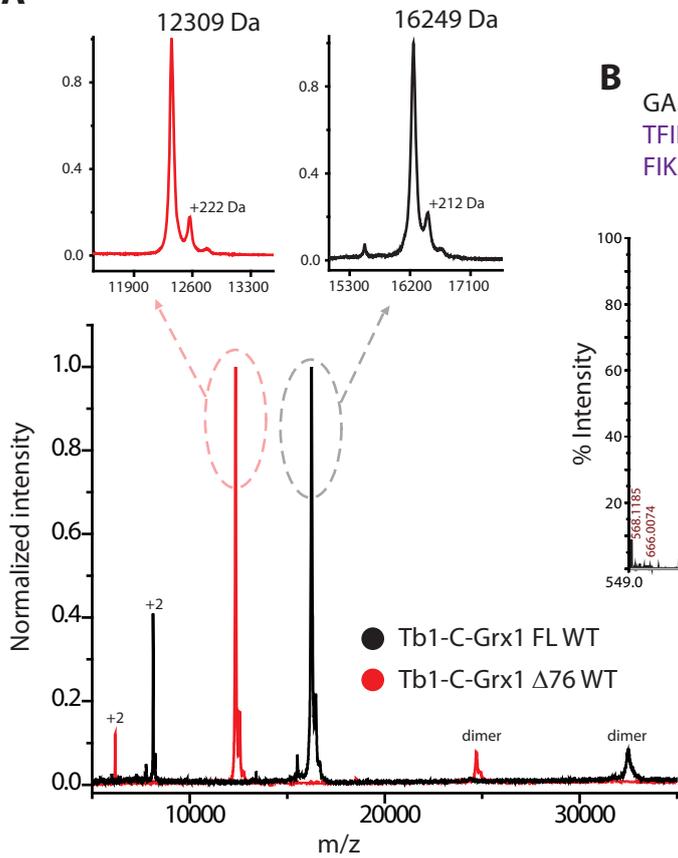
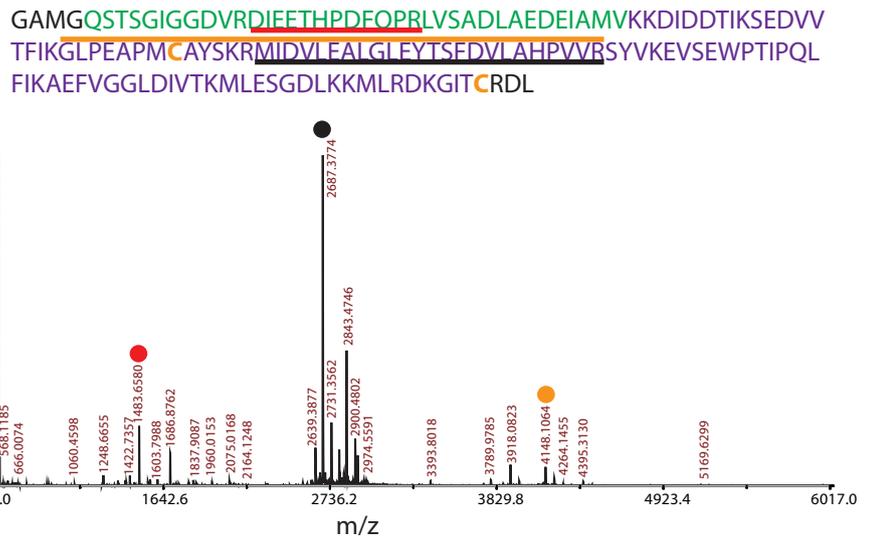
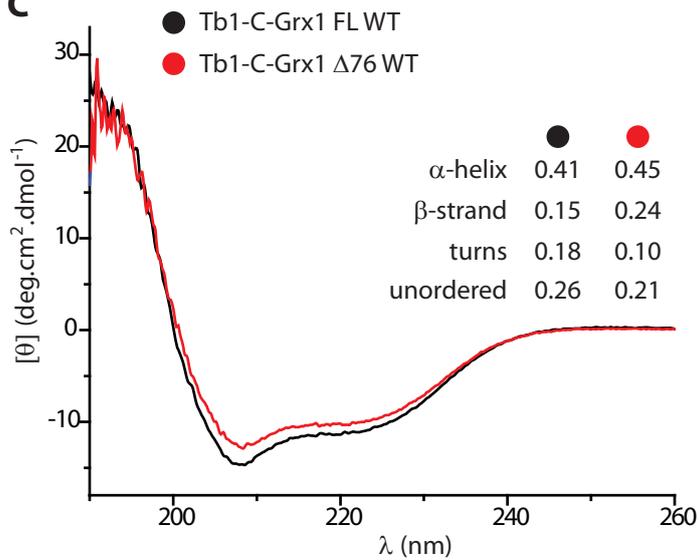
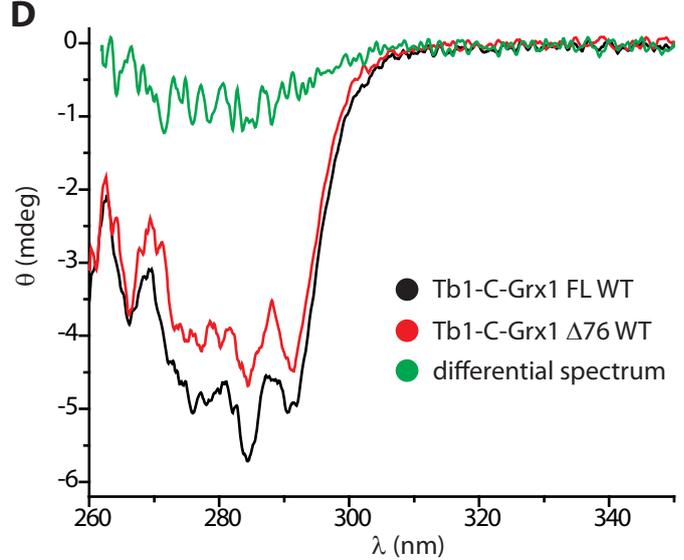
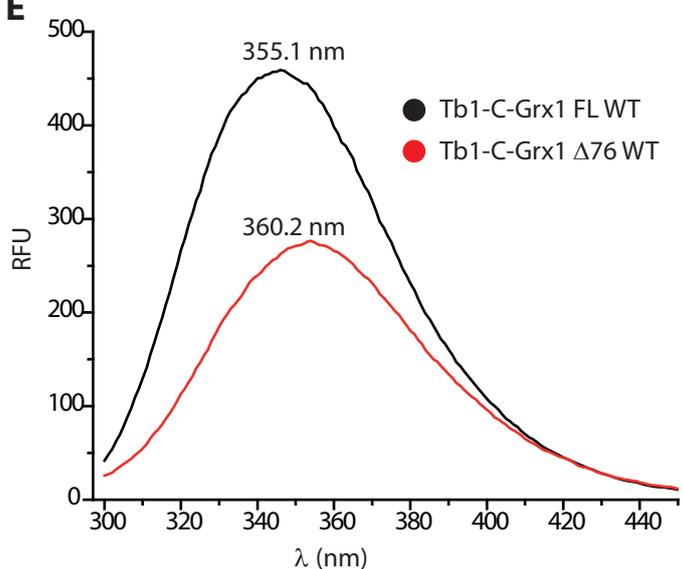
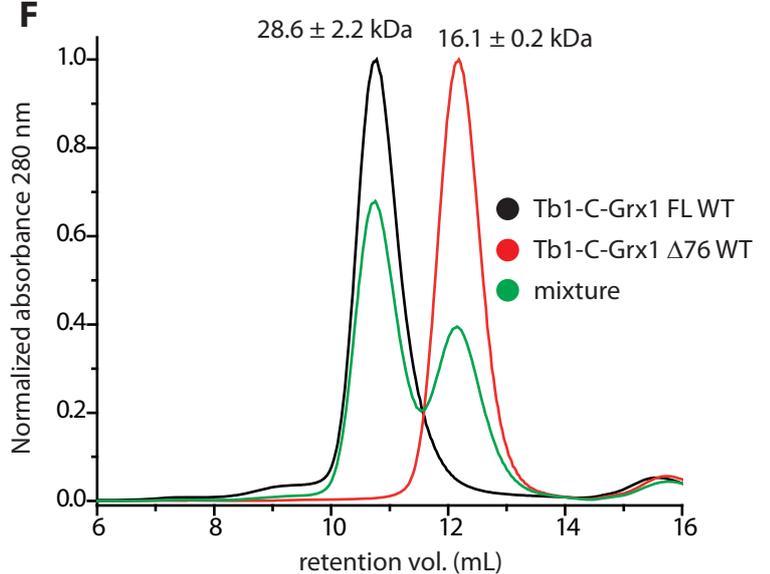
## Figura 4.2. Estrategia de purificación de la forma larga y truncada de *Tb1-C-Grx1* sin etiqueta de afinidad

Los cuatro pasos de la purificación de variantes FL o  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* sin etiqueta de afinidad se esquematizan en **A**. En las siguientes figuras se muestran resultados representativos para las cada una de estas etapas. **B**. SDS-PAGE 12.5 % correspondiente a la primera etapa de extracción y purificación de *Tb1-C-Grx1* FL WT (LIS: extracto celular total, NBF: material no unido a la IMAC, W: lavado con 20 mM imidazol en amortiguador A). Las muestras correspondientes al pico de elución de la IMAC mostrado en B (marcos punteados celeste y rojo, ver a continuación) se indican dentro de los recuadros. Como se comenta en el texto, la purificación se continuó a partir de todo el eluido de la IMAC obtenido mediante un escalón frontal de 500 mM imidazol en amortiguador A (celeste) o con las fracciones de mayor pureza obtenidas mediante la aplicación de un gradiente lineal (rojo), como el mostrado en B. **C**. Perfil de elución de la proteína de fusión con *Tb1-C-Grx1* FL WT con aplicación de gradiente lineal de 500 mM imidazol en amortiguador A. En los ejes verticales se indica en la absorbancia a 280 nm (rojo, corregida por el paso óptico del cromatógrafo) y el porcentaje de amortiguador con 500 mM imidazol (verde, "elution buffer"). **D**. Ejemplo de experimento de puesta a punto de la proteólisis con TEVp: 70  $\mu$ g de la proteína de fusión en amortiguador B se trataron con 5 mM DTT y 1  $\mu$ g TEVp a la temperatura y tiempos indicados para su posterior análisis por SDS-PAGE. En el gel se sembraron 20  $\mu$ g de cada reacción. Se omiten los controles de corte inespecífico (realizado con *HsPrx2*, purificada según (Manta et al., 2009)) y autoproteólisis. **E**. En la figura se muestra como ejemplo el perfil cromatográfico de  $\sim 40$  mg de la fracción FT correspondiente a la segunda IMAC de *Tb1-C-Grx1* FL WT (ver gel en parte E) resueltos en una columna Superdex 75 26/60 pre-equilibrada en amortiguador B con detección a 280 nm. El pico central corresponde a la proteína pura y la posición de los picos de los estándares de peso molecular usados para calibrar la columna en condiciones similares se indican como puntos rojos con sus correspondientes pesos moleculares. En el inserto se muestran geles de SDS-PAGE 15% de los picos de SEC correspondientes a  $\Delta 76$  WT o FL WT de *Tb* y *Tc* 1-C-Grx1 (10  $\mu$ g de proteína/carril). **F**. SDS-PAGE representativo de los pasos de purificación mencionados en el texto. Se trata de la purificación de *Tb1-C-Grx1*  $\Delta 76$  WT y se sembraron 20  $\mu$ g de cada fracción por carril, en un gel SDS-PAGE 15 %.



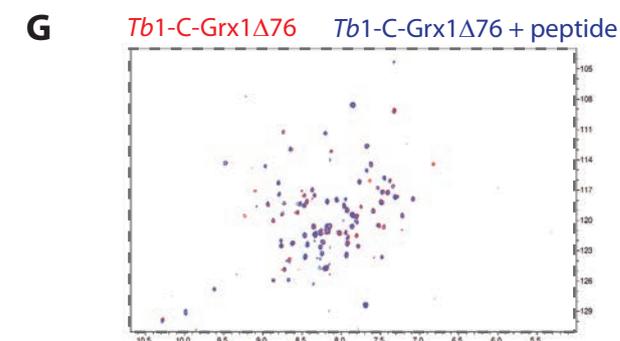
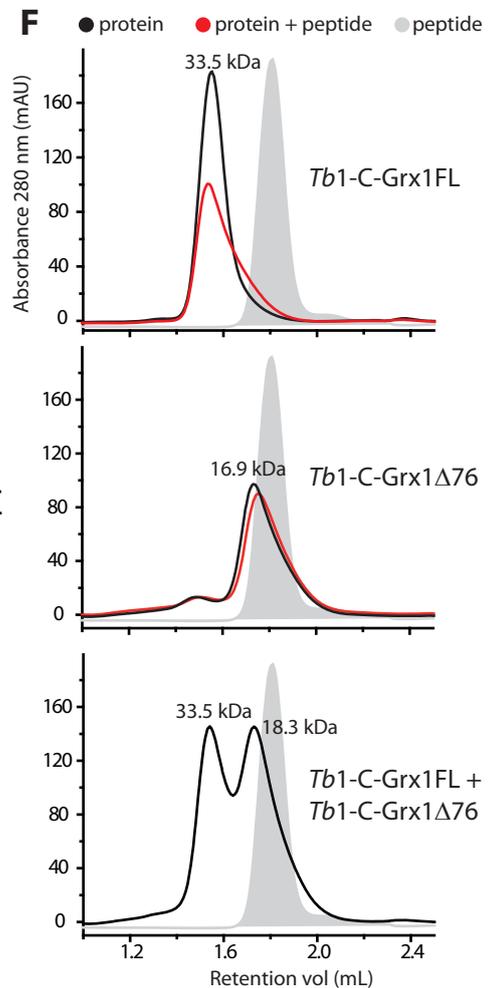
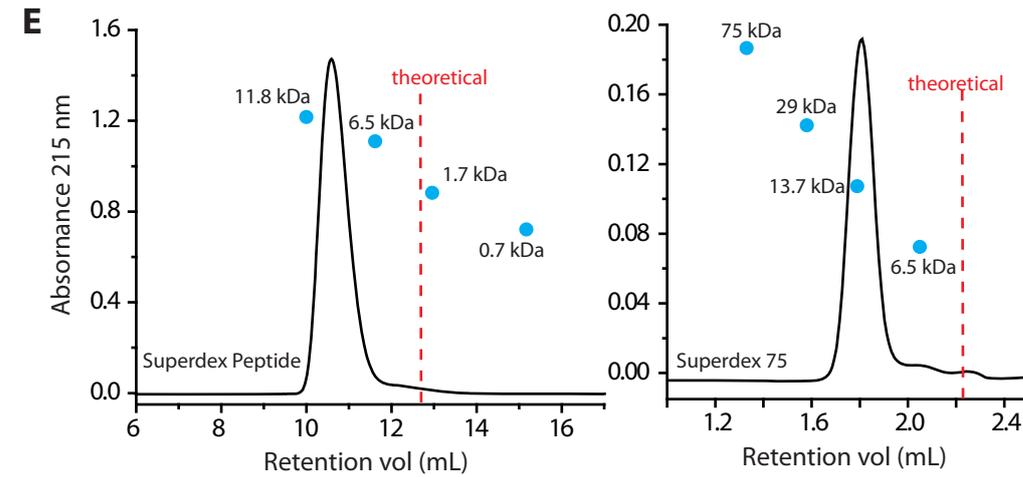
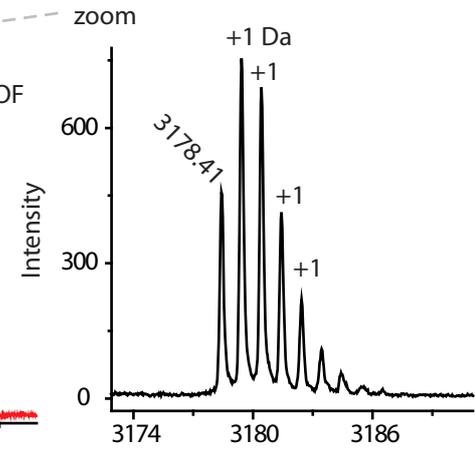
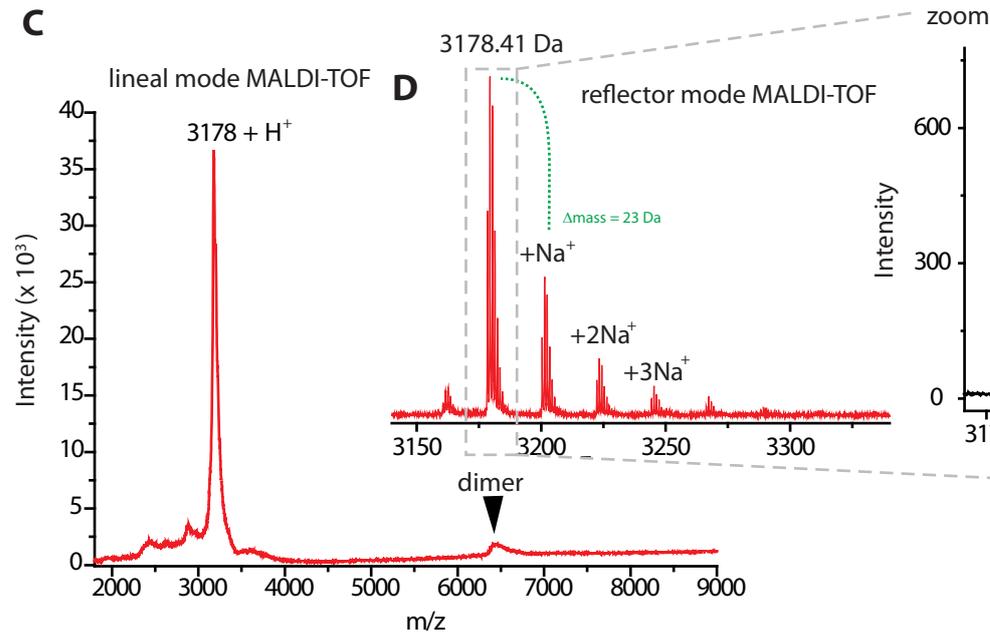
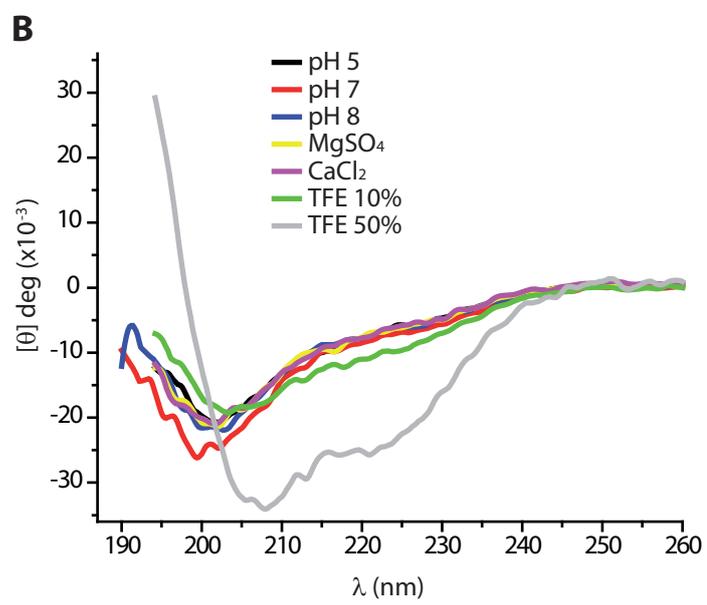
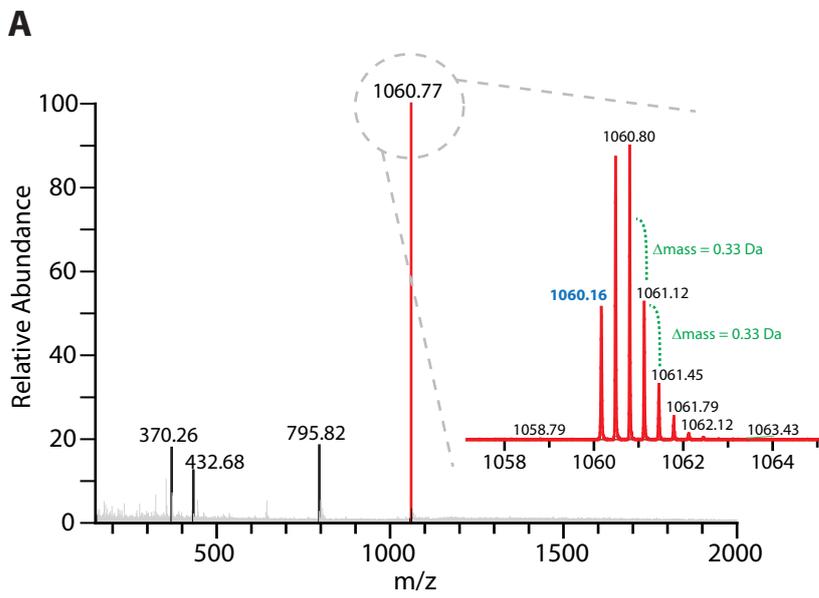
### Figura 4.3. Caracterización fisicoquímica de las formas FL y $\Delta 76$ de *Tb1-C-Grx1*

En la figura se muestran resultados representativos de diferentes experimentos de caracterización para la forma larga (FL, negro) y trunca ( $\Delta 76$ , rojo) de *Tb1-C-Grx1*. **A.** Espectrometría de masa de la proteína FL y  $\Delta 76$  entera en modo lineal positivo previamente tratada con 5 mM DTT. Los espectros se normalizaron para apreciar la calidad de las muestras sin la interferencia de la diferencia de intensidades. Las referencias "+2" y "dimer" indican la posición de los picos de las especies dicargadas y diméricas, respectivamente. En los insertos se muestra la ampliación de los picos correspondientes a las especies monocargadas, indicando el valor de m/z de la especie mayoritaria (las especies indicadas como "+222" y "+211" no fueron analizadas). **B.** Espectro de masa de los fragmentos trípticos de *Tb1-C-Grx1* FL WT carboxamidometilada. En la figura se indican algunos péptidos representativos sobre una >90%, cada uno indicado con un color sobre la secuencia de *Tb1-C-Grx1* FL, coloreada según Figura 4.1. No se observaron péptidos conteniendo el residuo C104. **C.** Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de 0.31 mg/mL de ambas proteínas (19 y 25  $\mu$ M, respectivamente) en amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 con NaCl 15 mM y 250  $\mu$ M DTT **D.** Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano de 1.027 mg/mL y 1.031 mg/mL de la forma FL y  $\Delta 76$ , respectivamente, en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl. En verde se muestra el espectro diferencial "FL -  $\Delta 76$ ". En C y D los espectros fueron adquiridos y procesados según se indican en la sección Materiales y Métodos. **E.** Espectro de fluorescencia de 1  $\mu$ M de proteínas pre-reducidas en amortiguador TMA (ver Capítulo 7) pH 7.53, con  $\lambda_{exc}$  = 280 nm y a 25°C. El centro de masa (indicado sobre el espectro) fue calculado según se detalla en la sección Materiales y Métodos. **D.** Cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 75 10/300 de 0.1 mg de cada una de las proteínas previamente tratadas con 5 mM DTT, así como de una mezcla equimolar de FL y  $\Delta 76$  incubada ON a 4°C y tratada 30 min con 5 mM DTT previo a la corrida. Las columnas fueron calibradas previamente en condiciones similares y los cromatogramas se normalizaron para permitir una mejor comparación de los pesos moleculares calculados en base a esta calibración, indicados sobre las curvas.

**A****B****C****D****E****F**

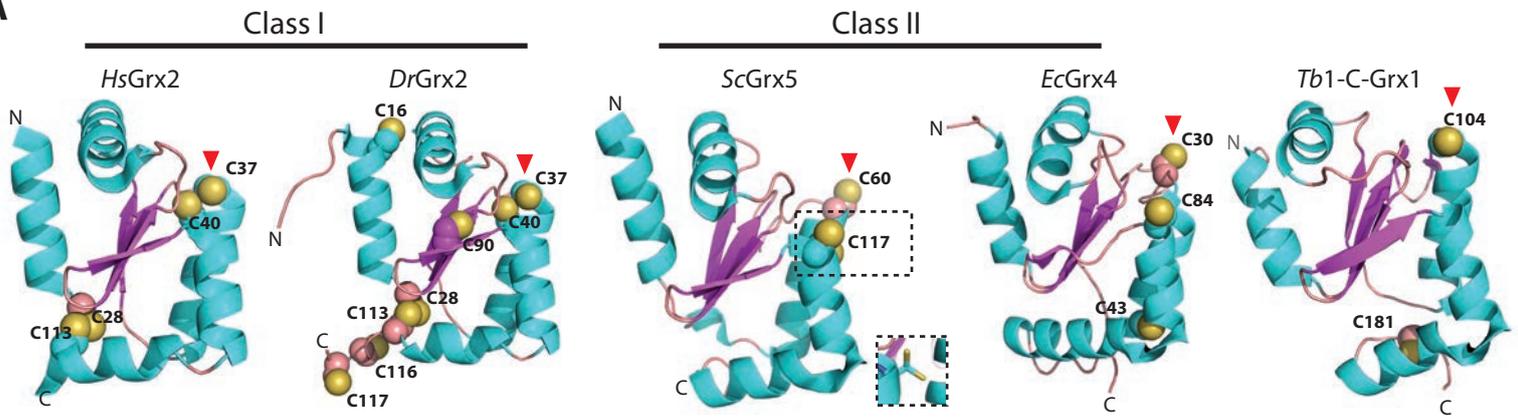
#### Figura 4.4. Resultados representativos de la caracterización del péptido aminoterminal en solución

**A. ESI-MS.** Una solución del péptido de concentración subnanomolar fue preparada en ácido acético 0.1% con acetonitrilo 20% (v/v) e inyectada directamente en la fuente de ionización del ESI registrando el perfil de  $m/z$  en el rango 150-2000. El pico a 1060.77 fue ampliado (*inserto*) y analizado por  $MS^n$  resultando ser la especie tricargada del péptido monoisotópico de 1060.16 Da (en azul), confirmada por fragmentación con gases nobles (no mostrado). Las demás especies presentes en A corresponden a otros estados de ionización del péptido (no mostrado). **B. Dicroísmo circular.** Espectro de CD en el ultravioleta lejano de iguales concentraciones del péptido en amortiguador fosfato de sodio 10 mM pH 5, 6 y 8, con 20 mM NaCl y en presencia de 1.5 mM  $CaCl_2$ ,  $MgSO_4$  o trifluoroetanol (10 o 50% (v/v)) en amortiguador pH 7.0. **C-D. MALDI-TOF MS.** Una solución de concentración micromolar del péptido en bicarbonato de amonio 50 mM pH 8.0 con 50 mM NaCl fue colocada en la placa del MALDI-TOF y analizada en el modo lineal (**C**) o reflector (**D**). La forma dimérica es apenas visible en el modo lineal, y en el modo reflector se evidencian trenes separados por +23 Da, indicando la unión de sodio (*inserto*). El péptido fue secuenciado por fragmentación (no mostrado). **E-F. Cromatografía de exclusión molecular del péptido aislado.** Una solución del péptido (~1 mg/mL) fue preparada en amortiguador B y sembrado en columnas de SEC para péptidos (rango 0.6-9 kDa) o proteínas (Superdex 75, rango 6-70 kDa) previamente equilibradas y calibradas en el mismo amortiguador. La posición de los estándares de calibración se indica con círculos azules y el perfil cromatográfico del péptido en cada caso como línea negra. La posición esperada para el pico del péptido en función de su peso molecular teórico se indica con una línea roja. **F. Interacción del péptido con Tb1-C-Grx1 analizada por cromatografía de exclusión molecular.** Ejemplos representativos de resolución de Tb1-C-Grx1 FL (arriba),  $\Delta 76$  (medio) o una mezcla de ambas (abajo) en ausencia (negro) o presencia (rojo) de un exceso molar del péptido. Sobre los picos se indican los pesos moleculares calculados según la calibración mostrada en E. En gris se indica el perfil cromatográfico del péptido solo a 215 nm, con fines comparativos. **G. Unión del péptido al dominio Grx analizada por NMR.** En la figura se muestra la comparación del  $^{15}N$ -HSQC de la proteína Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$  (puntos rojos, 1 mM en condiciones como las indicadas en la Figura 5.2) con un exceso molar de 10 veces de péptido (puntos azules).



#### Figura 4.5. Cisteínas extras en glutarredoxinas

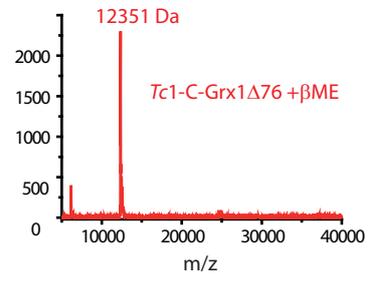
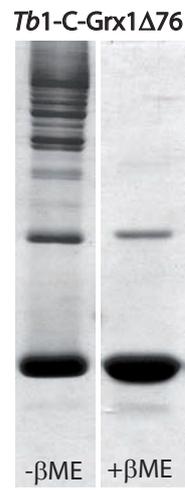
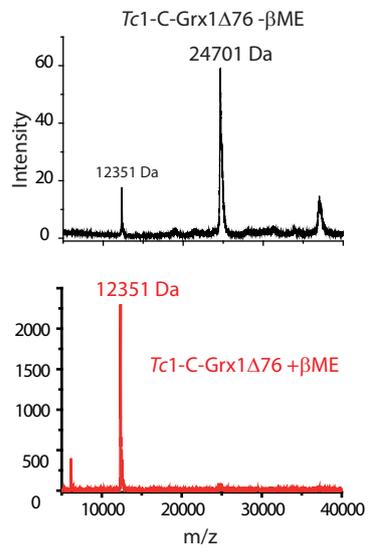
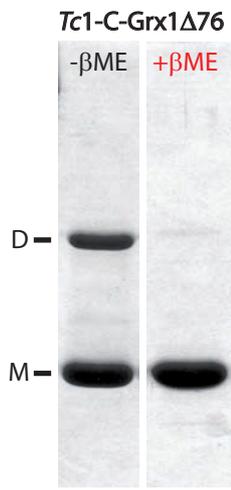
En la figura se muestran las estructuras **(A)** y alineamiento **(B)** de proteínas representativas de clase I y II en comparación con *Tb1-C-Grx1*. Las estructuras se colorean por estructura secundaria (ver Figura 5.3) y se destacan los átomos de azufre en los residuos de cisteína (etiquetados) como esferas de color amarilla. La flecha verde indica la posición del sitio activo. Todas las estructuras se presentan en una orientación similar, con el plano de la hoja  $\beta$  perpendicular al plano del papel y la hélice  $\alpha 2$  a la derecha. Las estructuras usadas para esta figura son: *HsGrx2* (PDB ID 2FLS, sin referencia asociada); *DrGrx2* (PDB ID 3UIW, (Bräutigam et al., 2013)); *ScGrx5* (PDB ID 3GX8, sin referencia asociada y con un error en el refinado de la cadena lateral de la segunda cisteína, mostrado en inserto); *EcGrx4* (PDB ID 1YKA (Fladvad et al., 2005)) y *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* (PDB ID 2LTK, (Manta et al., 2013a)). Las figuras se realizaron con la cadena A cuando hubiera más de un polipéptido en la unidad asimétrica y con modelo 1 en el caso de las estructuras resueltas por NMR (2LTK y 1YKA). En el alineamiento (B), las cisteínas se resaltan en amarillo, mientras que la *cis*-Pro conservada se indica con recuadro rojo y el motivo "GG" en recuadro celeste.

**A****B**

<i>HsGrx2</i>	QSMFVNQIQETISDNCVVIFSKT-----SCSYCTMAKKLFHDMNVN---YKVVLDLLEYGNQFQDALYKMTGERTVPRIFVNGTFFIGGATDTHRLHKEGKLLPLVHQCYLKKSKRKEFO
<i>DrGrx2</i>	SSACGGQFVQDIVSSNCVVIFSKT-----TCPYCKMAKGVFNEIGAT---YKVVLDLDEHNDGRRLQETLAEELTGARTVPRVFINQOCI GGGSDTKQLHQKLLPLIEQCRPCLNMTPEG
<i>ScGrx5</i>	STEIRKAIEDAIESAPVFLFMKGTPEFPKCGFSRATIGLLGNQGVDPKFAAYNVLED---PELREGIKEFSEWPTIPQLYVNKEFIGGCDVITSMARSGELADLLEEAQALVPEEEET
<i>EcGrx4</i>	STT-IEKIQRQIAENPILLYMKGSPKLPSCGFSAQAVQALAACGER---FAYVDILQN---PDIRAE LPKYANWPTFPQLWVDGELVGGCDIVIEMYQRGELQQLIKETAAYKSEEPDA
<i>Tb1-C-Grx1</i>	GAMVKKDIDDTIKSEDVVTFIKGLPEAPMCAYSKRMI DVLEALGLE---YTSFDVLAH---PVVRSYVKEVSEWPTIPQLFIKAEFVGGLDIVTKMLESGLDKMLRDKGITCRDL----

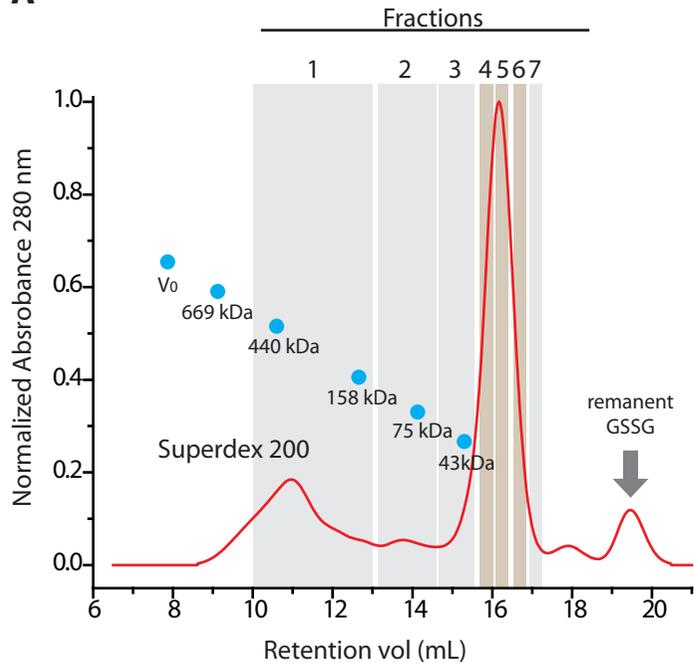
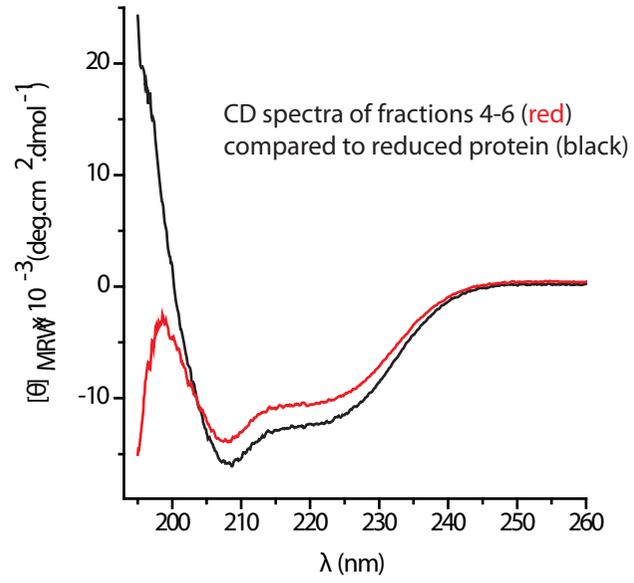
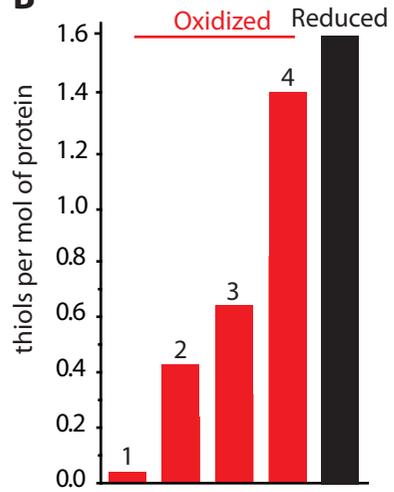
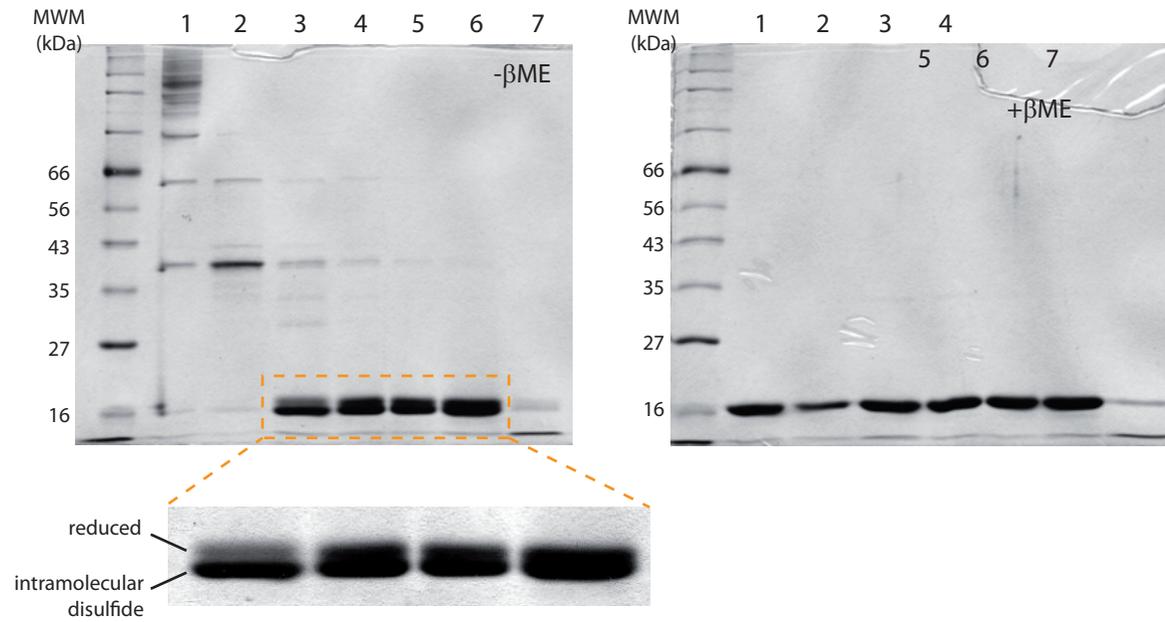
#### **Figura 4.6. Oxidación espontánea de *Tb* y *Tc1-C-Grx Δ76* durante el almacenamiento**

Resolución en SDS-PAGE 17% de *Tb1-C-Grx1Δ76* y *Tc1-C-Grx1Δ76* almacenadas durante 1 mes a 4°C en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl en condiciones estériles. Las muestras fueron preparadas usando amortiguador de carga con (+βME) o sin (-βME) reductor y se sembraron 10 μg de proteína por carril.



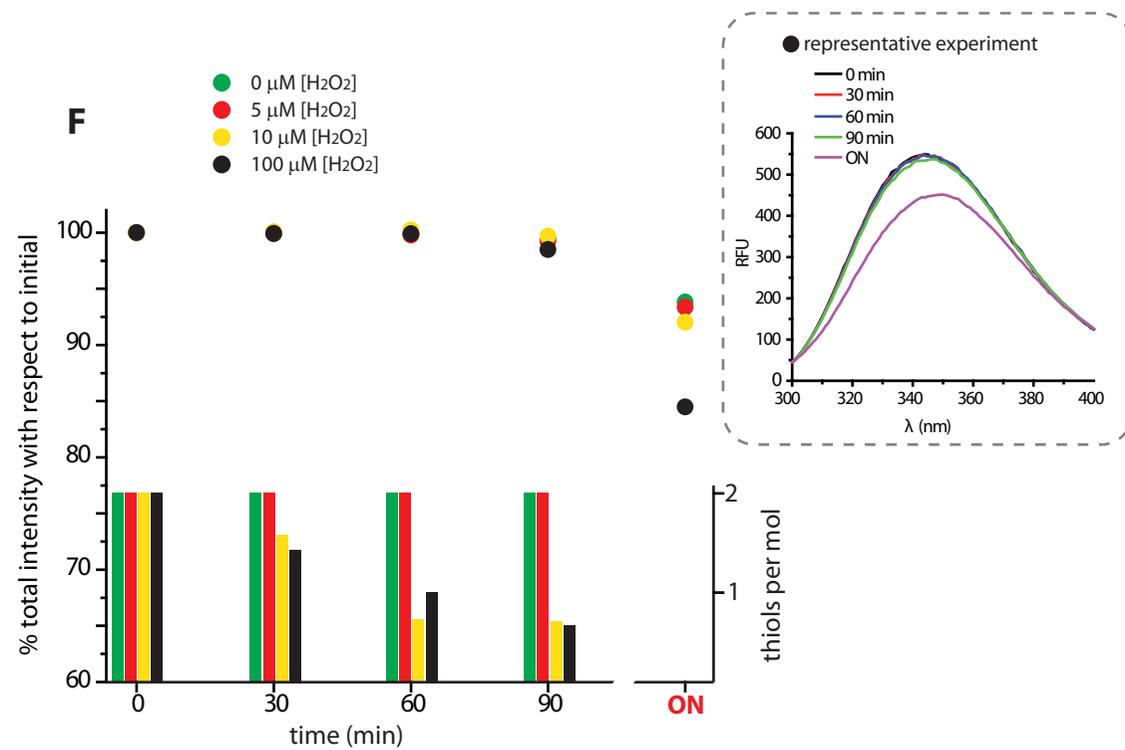
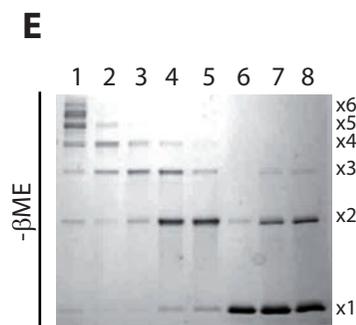
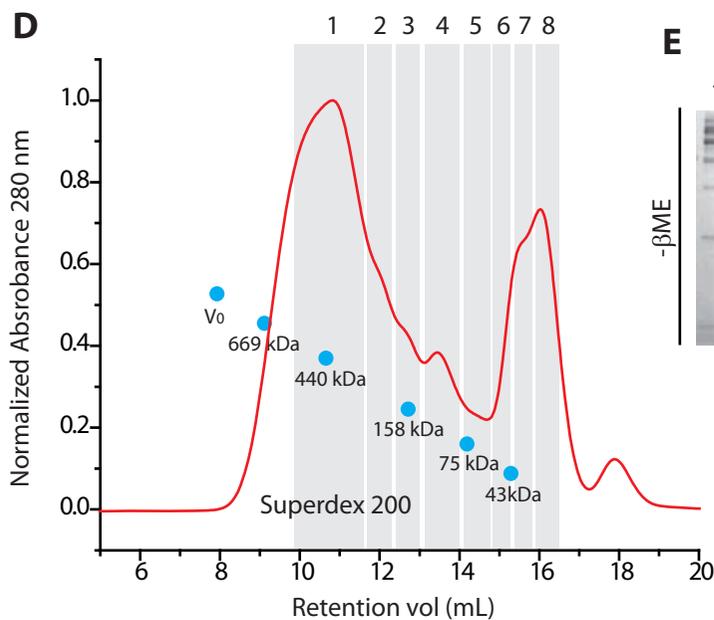
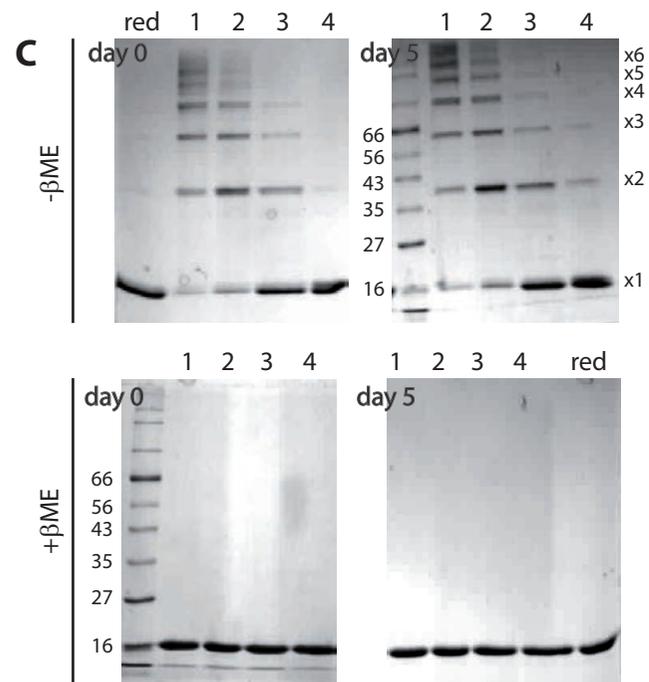
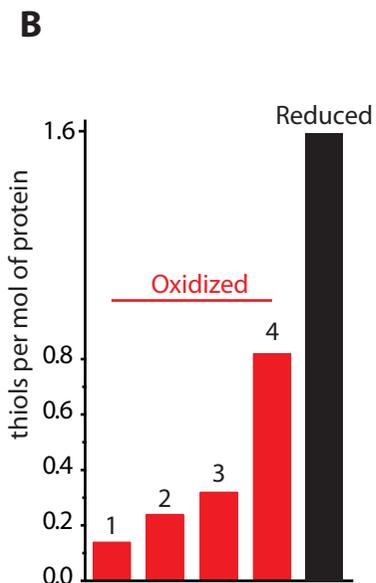
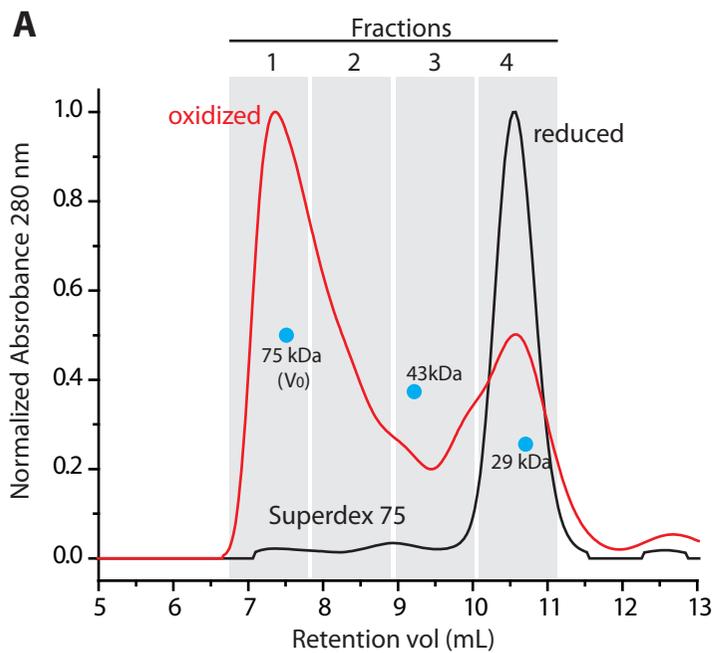
#### **Figura 4.7. Oxidación de *Tb1-C-Grx1* por glutatión disulfuro**

**A.** En la figura se muestra el perfil cromatográfico normalizado de 1.1 mg de *Tb1-C-Grx1*FL oxidada con un exceso molar de 2 veces GSSG durante 30 min en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl resuelta en una columna SEC analítica Superdex 200 10/300 con detección en línea a 280 nm y calibrada en iguales condiciones. La calibración se indica con puntos celestes y el volumen de exclusión de la columna como  $v_o$ . Se tomaron fracciones individuales o agrupadas en las cuales se determinó el contenido de proteínas y tioles libres (**B**). Estas fracciones se analizaron además por SDS-PAGE en geles al 12% en presencia (+ $\beta$ ME) o ausencia (- $\beta$ ME) de agente reductor en el amortiguador de carga (**C**), sembrando 1.5  $\mu$ g de proteína por carril. En el carril de la izquierda se sembró marcador de peso molecular (MWM) con masas indicadas en kDa. En **D** se muestra el espectro de CD en el ultravioleta lejano de *Tb1-C-Grx1* reducida y el conjunto de fracciones 4-6 (**A**; ver detalle en Capítulo 7), el cual consiste en una mezcla de proteínas reducidas y con disulfuro intramolecular (ampliación de gel en **C**).

**A****D****B****C**

#### Figura 4.8. Oxidación de *Tb1-C-Grx1* por peróxido de hidrógeno

**A.** En la figura se muestra el perfil cromatográfico normalizado de 1.1 mg de *Tb1-C-Grx1*FL oxidada con un exceso molar de 2 veces  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 min en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con 150 mM NaCl (línea roja) comparado al de la proteína no tratada y reducida (línea negra), resueltas en ambos casos en columna de SEC analítica Superdex 75 10/300 con detección en línea a 280 nm y calibrada en iguales condiciones (puntos celestes). Se tomaron fracciones de 1 mL en las cuales se determinó el contenido de proteínas y tioles libres (**B**) así como su composición por SDS-PAGE (**C**) corrida en condiciones reductoras (+ $\beta$ ME) y no reductoras (- $\beta$ ME) en geles al 12%, sembrando 2.5  $\mu\text{g}$  de proteína por carril, incluyendo una muestra no oxidada ("red"). Dos de los cuatro geles poseen marcadores de peso molecular indicados en el carril de la izquierda (en kDa). Las muestras colectadas de la SEC fueron resueltas por SDS-PAGE inmediatamente obtenidas ("day 0") o luego de 5 días de almacenamiento a 4°C sin reductor ("day 5"). En **D** se muestra el mismo experimento que en **A** solo que usando una columna Superdex 200 10/300 calibrada en idénticas condiciones como se indicara anteriormente. Se colectaron fracciones de 0.2 mL (simples o agrupadas) que fueron resueltas por SDS-PAGE 12% en presencia (no mostrado) y ausencia de agente reductor (**E**). **F.** 10  $\mu\text{M}$  de *Tb1-C-Grx1*FL fue tratada con 0 (verde), 5 (rojo), 10 (amarillo) y 100 (negro)  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.2 con 150 mM NaCl y se registró el espectro de fluorescencia de la proteína ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ , 25 °C) antes de la oxidación ( $t = 0$ ) y a varios tiempos posteriores ( $t = 30, 60$  y 90 min,  $t = \sim 16 \text{ hr}$ , ON). A su vez, se determinó la concentración de tioles por mol de proteína antes de la oxidación ( $t = 0$ ) y a los 30, 60 y 90 min (gráfico en barras con colores correspondientes a las distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  usadas). En esta gráfica también se incluye la intensidad de fluorescencia total registrada para cada experimento a los diferentes tiempos normalizada respecto a la intensidad de fluorescencia inicial ( $t = 0$ ; puntos de colores). En el inserto (cuadrante punteado) se muestra el experimento representativo a 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 4.9. Modelos para los posibles mecanismos de oxidación de *Tb1-C-Grx1* inducidos por GSSG y  $H_2O_2$**

En **A** se muestra el esquema topológico de *Tb1-C-Grx1* reducida obtenido a partir de la estructura del dominio Grx (PDB ID 2LTK, (Manta et al., 2013a), ver Figura 5.3) considerando que la extensión aminoterminal (línea verde) no interacciona con el dominio Grx en la proteína de largo completo. Los esquemas muestran un mecanismo posible para la oxidación por GSSG o  $H_2O_2$  y la formación de una especie con disulfuro intramolecular (B) o intermolecular (C). En D se muestra la especie sobreoxidada propuesta en (Melchers et al., 2007).



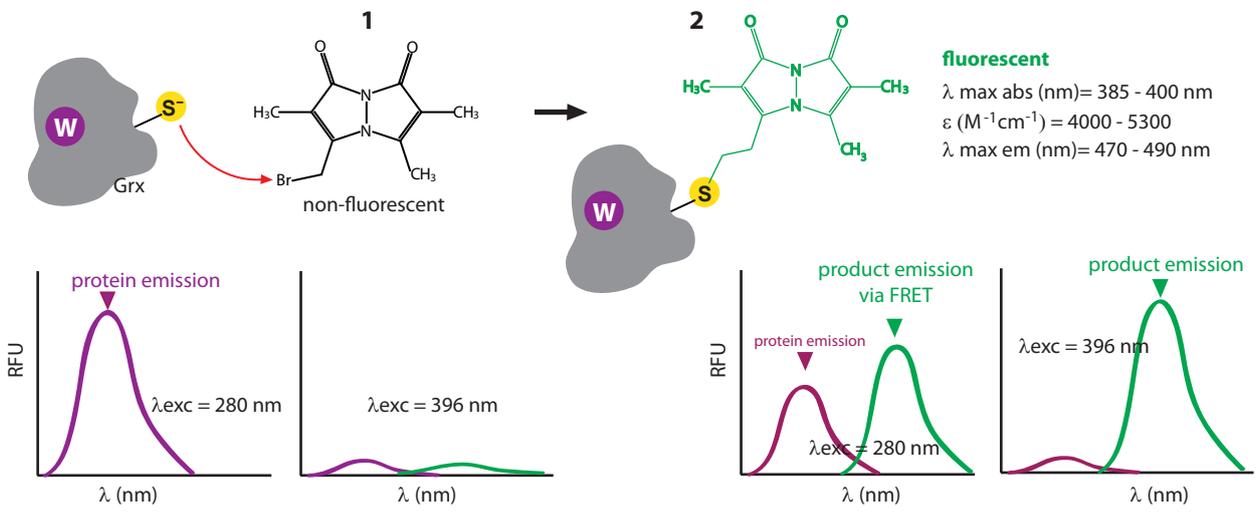
#### **Figura 4.10. pKa de cisteínas del sitio activo en glutarredoxinas**

En la tabla se resumen la información disponible para pKa de cisteínas de sitio activo de Grx reportadas en la literatura. Las diferentes proteínas para las cuales se posee información se clasifican por organismo, indicándose el nombre de la proteína, la clasificación, el sitio activo, la numeración de la cisteína del sitio activo en la proteína madura, el valor de pKa determinado experimentalmente y el procedimiento experimental usado, observación y, finalmente, la referencia. Es importante destacar que en esta tabla se lista solo aquellos datos obtenidos a partir de determinaciones experimental, descartando los provenientes de simulaciones. Para estos últimos, el lector es referido a (Foloppe and Nilsson, 2004, 2007).

Organism	Protein	Active site	Class	Cys	pKa	Method	Notes	Ref
<i>Escherichia coli</i>	Grx1	CPYC	I	11	4.9	Ellman reaction at different pH		(Peltoniemi et al., 2006)
	Grx3	CPYC	I	11	<5.5	NMR chemical shift	Protein denatured below pH 5.5	(Nordstrand et al., 1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx1	CPYC	I	27	3.2	Monobromobimane alkylation		(Discola et al., 2009)
					4.0	Iodoacetamide inactivation		
					4.5	Electrophoretic shift mobility assay due to alkylation with Mal-PEG	Abnormal profile suggestion two transitions	(Iversen et al., 2010)
	Grx2	CPYC	I	61	3.1	Monobromobimane alkylation		(Discola et al., 2009)
					3.5	Iodoacetamide inactivation		
Grx5	CGFS	II	60	5.0	Iodoacetamide alkylation		(Tamarit et al., 2003)	
<i>Homo sapiens</i>	Grx2	CSYC	I	22	4.6	Iodoacetamide inactivation		(Gallogly et al., 2008)
<i>Sus scrofa</i>	Grx1	CPFC	I	22	2.5	Iodoacetamide inactivation	Bell shape profile centered on pH 3	(Gan and Wells, 1987)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Grx1	CPYC	I	47	3.9	Iodoacetamide inactivation		(Gao et al., 2010)
	Grx2	CPYC	I	47	4.8			
<i>Populus tremula</i>	GrxS12	WCSYC	I	29	2.8	Alkylation with bimane compound		(Couturier et al., 2009)
					3.8	Iodoacetamide inactivation		(Zaffagnini et al., 2012)
	GrxC1	CGYC	I	31	4.7	NMR chemical shift	Protein denatured below pH 4.5	(Feng et al., 2006)
<i>Plasmodium falciparum</i>	Glp1	CGFS	II	99	5.5	Alkylation by IAM at diff. pH and quantitation of remanentSH by DTNB. 25°C		(Deponte et al., 2005)
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	1-C-Grx1	CAYS	I	104	3.7/5.6	Alkylation with monobromobimane	Bell shape profile with inflection points at indicated pHs	(Sardi et al., 2013)
	1-C-Grx3	CGFS	II	150	5.4	NMR chemical shift	No titration of WCEPC active site on Trx domain	Bellanda et al., unpublished
	2-C-Grx1	CPYC	I	21	4.0	Alkylation with monobromobimane		Manta, Ferrer-Sueta et al., unpublished.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1-C-Grx1	CAYS	I	105	4.2/5.0	Alkylation with monobromobimane	Bell shape profile with inflection points at indicated pHs	Fleitas, Manta et al., unpublished

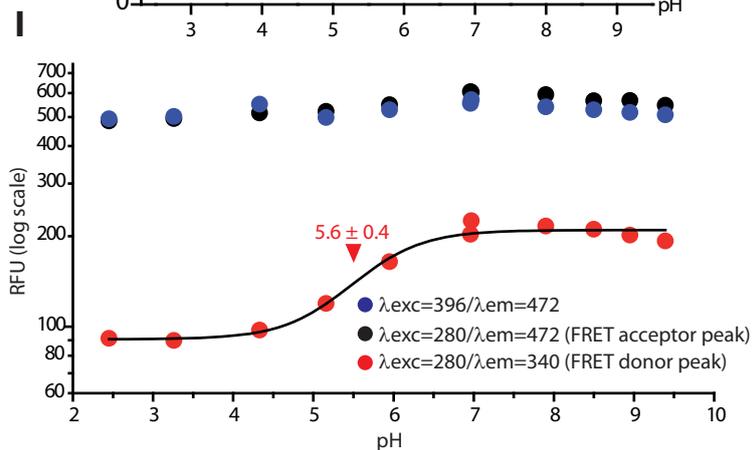
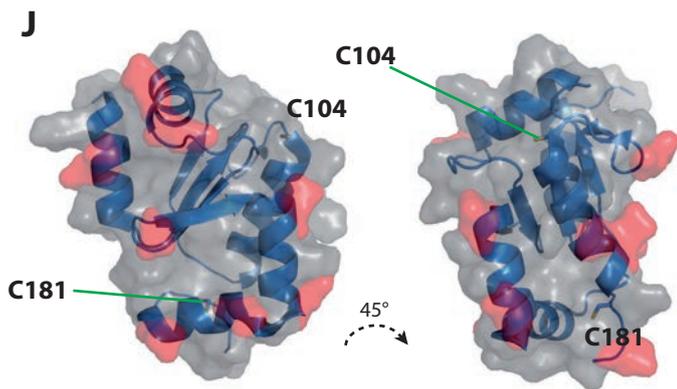
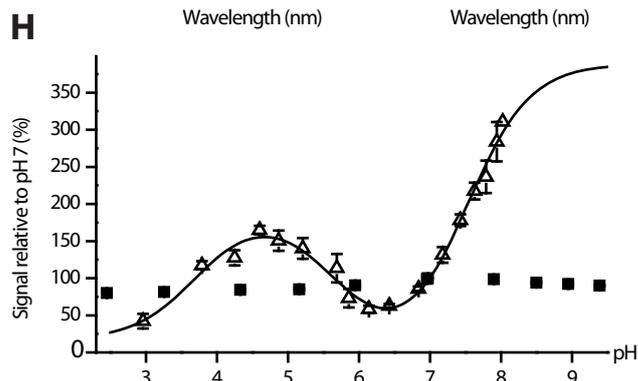
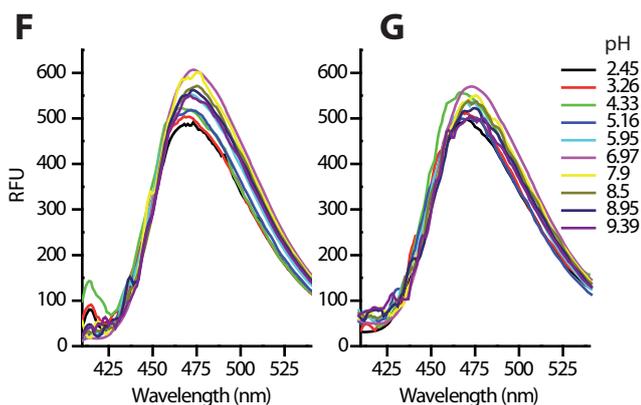
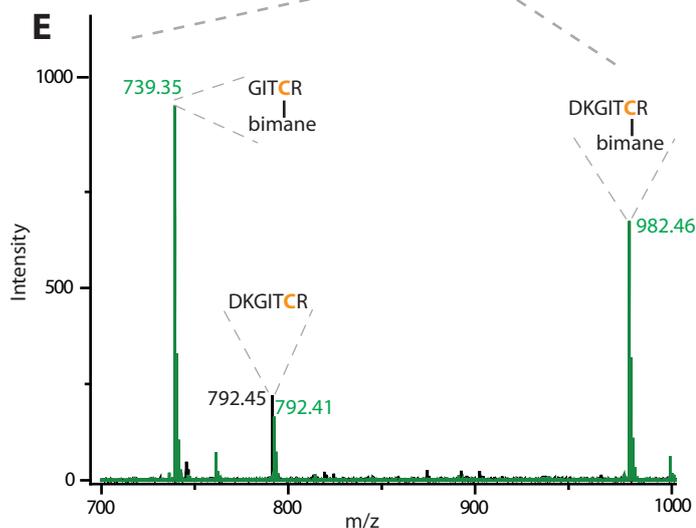
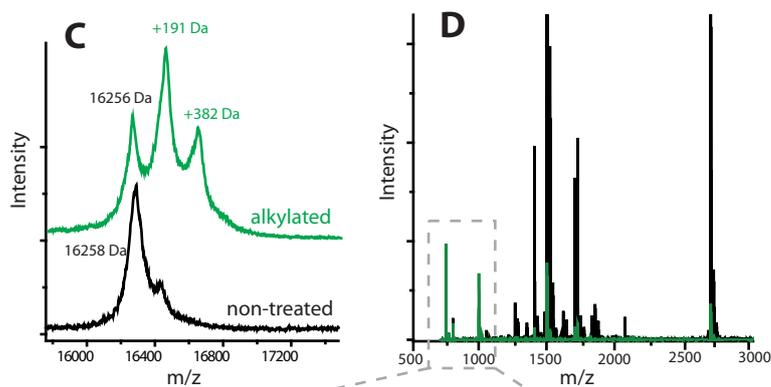
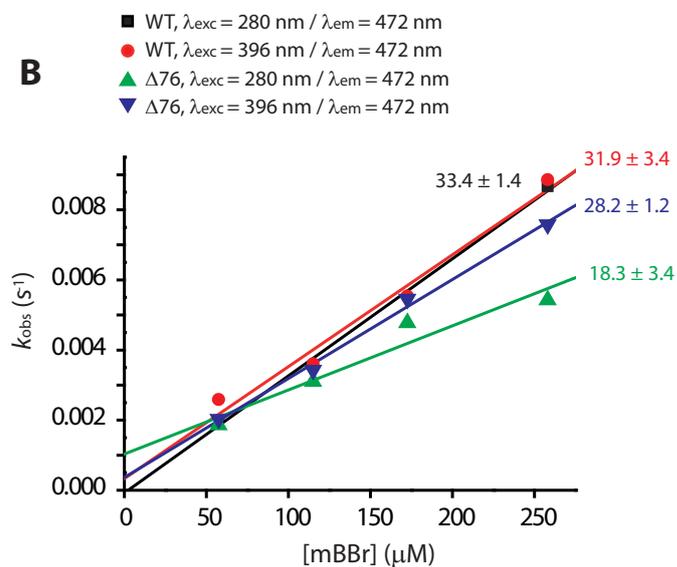
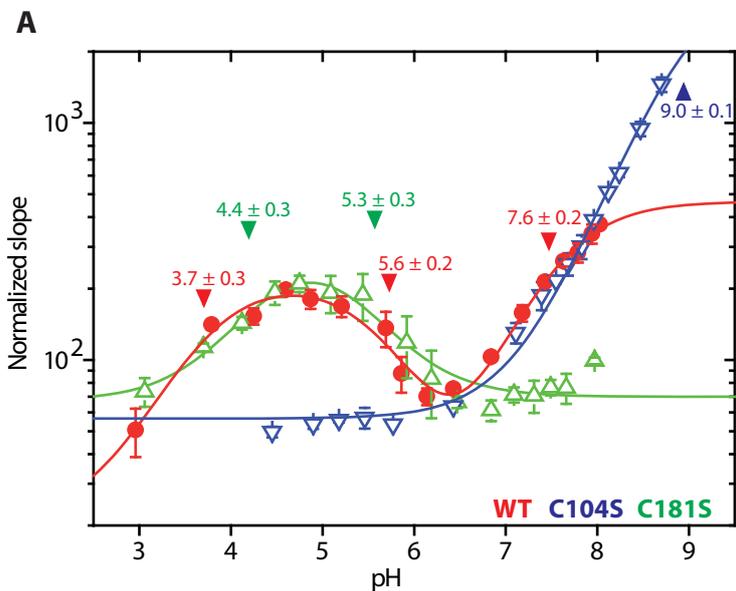
#### Figura 4.11. Esquema del método de determinación del pKa de tioles por alquilación por mBBr

Esquema de la reacción de alquilación de tioles por monobromobimano (mBBr, **estructura 1**) y propiedades espectrales del producto de la reacción (**estructura 2**). La variación en los valores de máximo de absorción (" $\lambda_{\text{max abs}}$ "), absorptividad molar ( $\epsilon$ ) y máximo de emisión de fluorescencia (" $\lambda_{\text{max em}}$ ") depende del tiol con el que reaccione el mBBr. En la parte inferior de la figura se esquematiza el espectro de emisión esperado al excitar la mezcla de proteína más mBBr a 280 nm o 396 nm antes (izquierda) o después (derecha) de que se dé la reacción de alquilación. En violeta se representa la emisión fluorescente del triptófano (*W* en el esquema de la parte superior) y en verde la emisión fluorescente del producto de alquilación Prot-SH-mB. Realizado en base a (Sardi et al., 2013).



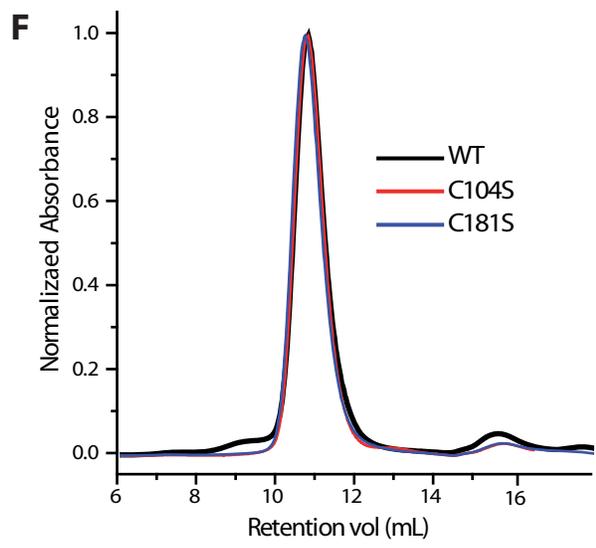
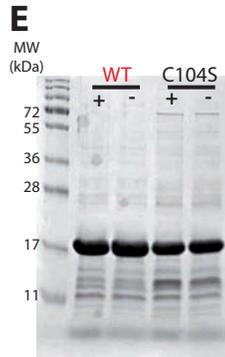
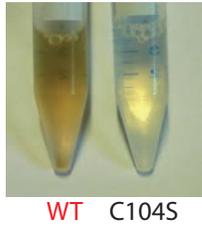
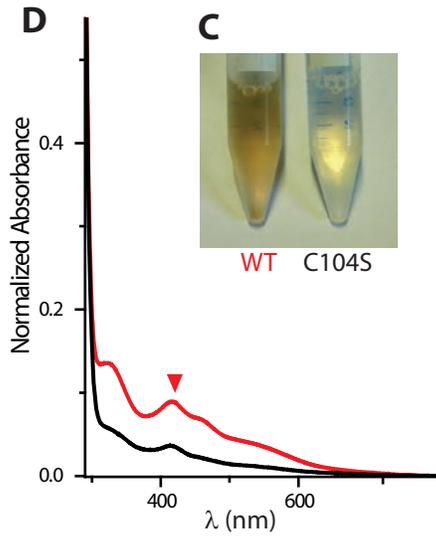
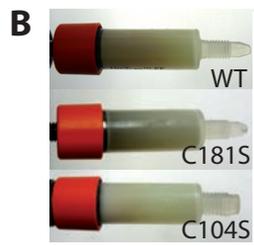
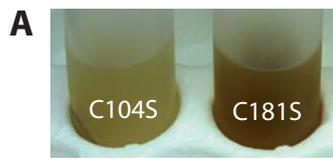
#### Figura 4.12. Análisis de pKa y cambios espectrales dependientes del pH para *Tb1-C-Grx1* FL

**A.** Perfil de reacción dependiente del pH de *Tb1-C-Grx1* (3  $\mu\text{M}$  en todos los casos, WT en rojo, C104S en verde y C181S en azul) con mBBBr (5  $\mu\text{M}$  a  $\text{pH} < 7$  y 3  $\mu\text{M}$  a  $\text{pH} > 7$ ). La reacción de alquilación fue monitoreada durante 1 hr con  $\lambda_{\text{exc}}=396$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=492$  nm (excitación directa), la pendiente inicial de la reacción fue normalizada respecto de la concentración inicial de mBBBr y graficada en función del pH en escala logarítmica luego de haber ajustado a ecuaciones de 3, 2 y 1 pKa, respectivamente (ver (Sardi et al., 2013)). **B.** La constante bimolecular de reacción ( $k_2$ ) entre mBBBr y las formas FL y  $\Delta 76$  de *Tb1-C-Grx1* fue analizada en condiciones de pseudo-primer orden con 1  $\mu\text{M}$  (FL) o 2  $\mu\text{M}$  ( $\Delta 76$ ) proteína y 50-200  $\mu\text{M}$  mBBBr en amortiguador TMA pH 8.5 a 37°C. La reacción se siguió tanto por excitación directa ( $\lambda_{\text{exc}}=396$  nm/ $\lambda_{\text{em}}=492$  nm) como por FRET ( $\lambda_{\text{exc}}=280$  nm/ $\lambda_{\text{em}}=492$  nm) y los resultados fueron analizados independientemente ajustando los trazos cinéticos a exponenciales de primer orden y los gráficos secundarios, como el mostrado en la figura, a regresiones lineales. Los valores de  $k_2$  determinados se indican al costado de cada línea, en unidades de  $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . **C-D.** La forma FL de *Tb1-C-Grx1* fue incubada en amortiguador TMA pH 8.0 con un exceso de 10 veces mBBBr (relación molar) y el exceso de alquilante removido 5 min después por gel filtración (no mostrado). En **C** se muestra el espectro de masa MALDI-TOF en el modo lineal positivo de la muestra alquilada (verde) y reducida (negro) con una precisión de  $\pm 2$  Da. Los picos indicados como "+191" y "+382" corresponden a especies mono y dialquiladas con bimano, respectivamente. La muestra alquilada y un control no tratado fueron tripsinizadas y los péptidos resultantes analizados por MALDI-TOF en el rango 500-3000 m/z en el modo reflector con una resolución de  $\pm 0.1$  Da (**D**). Los péptidos conteniendo a C104 no están presentes entre los péptidos detectados (no mostrado). La región de m/z 700-1000 fue ampliada (**E**) para mostrar los péptidos que contienen C181 en su modo libre (negro) y alquilado con bimano (verde). Los iones de m/z 739.36 y 982.49 fueron fragmentados y secuenciados para confirmar la alquilación en la cisteína (no mostrado). **F-H.** Espectro de emisión de 0.66  $\mu\text{M}$  *Tb1-C-Grx1* (promedios de  $n=4$ ) alquilada mayoritariamente en C181 a diferentes pH, registrando la emisión directa del compuesto fluorescente ( $\lambda_{\text{exc}}=396$  nm, **F**) o vía FRET ( $\lambda_{\text{exc}}=280$  nm, **G**). En **H** se muestra la emisión de fluorescencia a 472 nm para los espectros de **F** y los valores de pendiente correspondientes a la curva de proteína WT mostrada en **A** normalizados respecto del valor a pH 7.0 asignado con un valor arbitrario de 100. En el gráfico se ve que el efecto del pH en el espectro de emisión ( $\blacksquare$ ) es menor y que no recapitula el perfil de la reacción ( $\Delta$ ). En **I** se muestra la intensidad máxima de fluorescencia para cada una las curvas de **F** y **G** en función del pH en escala logarítmica, graficándose la intensidad máxima obtenida en la excitación directa (azul), a través de FRET (negro) y la intensidad del pico correspondiente al Trp (no mostrado en **F** y **G**) en rojo ( $n=4$ ). El ajuste de esta última curva se realizó considerando una ecuación de Boltzman simple, indicándose el valor de pH para el punto de inflexión. Parcialmente adaptado de (Sardi et al., 2013).



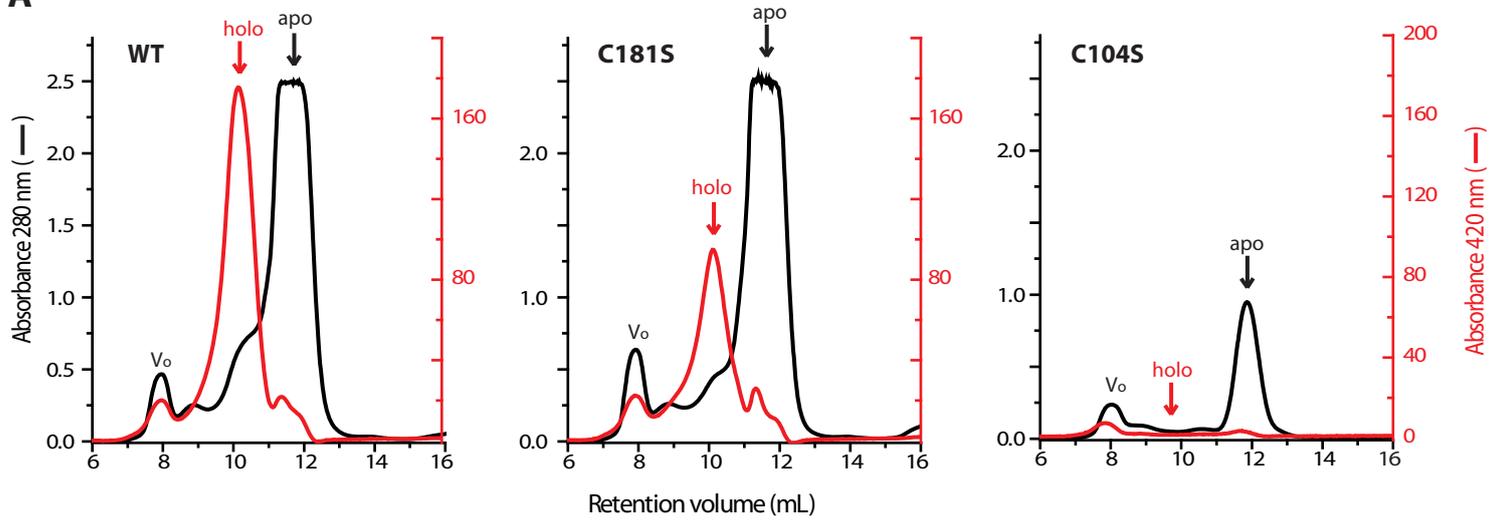
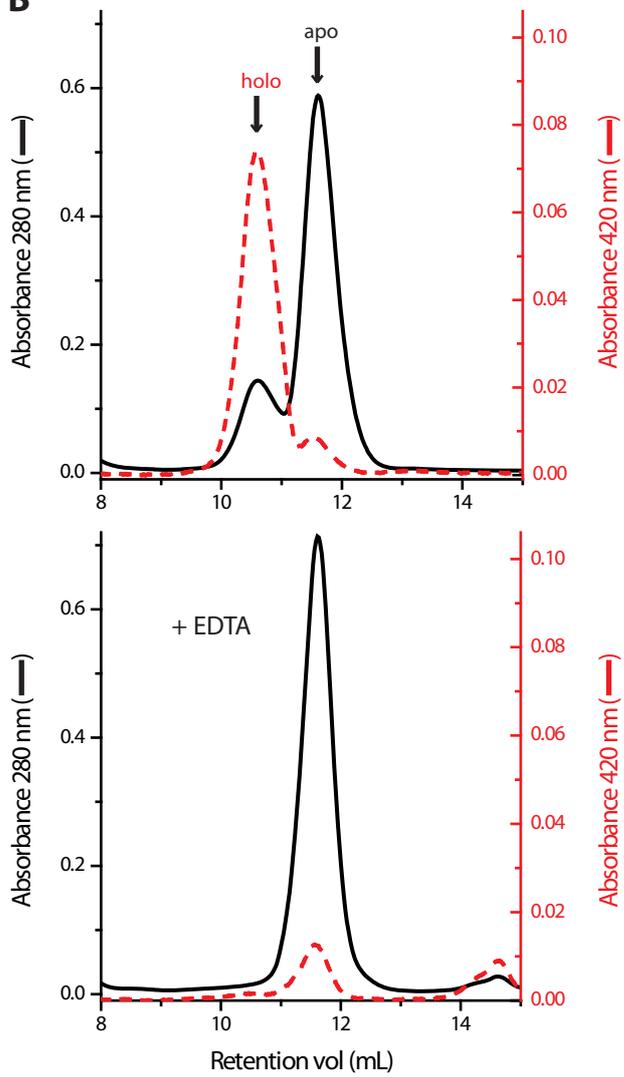
**Figura 4.13. El residuo del sitio activo es esencial para la coordinación de centros ferrosulfurados “in vivo”**

**A.** Fotografías de los lisados celulares totales de *E. coli* luego de la sobreexpresión de los mutantes de *Tb1-C-Grx1* FL C104S o C181S. **B.** Columna de IMAC cargadas con los lisados clarificados de *E. coli* luego de la sobreexpresión de las tres formas de la proteína *Tb1-C-Grx1* FL con etiqueta de afinidad. **C.** El eluido de la IMAC para las formas WT y FL fue fotografiado para mostrar su diferencia de color y analizado por espectroscopía UV-visible (**D**) a iguales concentración de proteína. En la proteína WT se observa la absorbancia característica a 420 nm (flecha roja), usada como referencia de la forma holo en futuros experimentos. **E.** El eluido de la IMAC de la purificación de las formas WT y C104S (espectro en D) fue analizado por SDS-PAGE 15% en condiciones reductoras (+) o no reductoras (-), sembrando 20 µg de proteína total por carril. En ambos casos se observa que el eluido presenta una relación >90% de la proteína recombinante y que ambas migran como especies de 17 kDa (peso molecular teórico 17630 kDa, Figura 4.1). **F.** Análisis por SEC de 500 µg de *Tb1-C-Grx1* FL WT (rojo), C181S (azul) y C104S (negro) con etiqueta de afinidad, tratadas con 5 mM DTT/2 mM EDTA 30 min antes de ser inyectadas en la columna Superdex 75 10/300 GL equilibrada con amortiguador A. Como se puede ver en la figura, las 3 versiones poseen el mismo volumen de retención equivalente a una proteína de ~30 kDa (no mostrado).



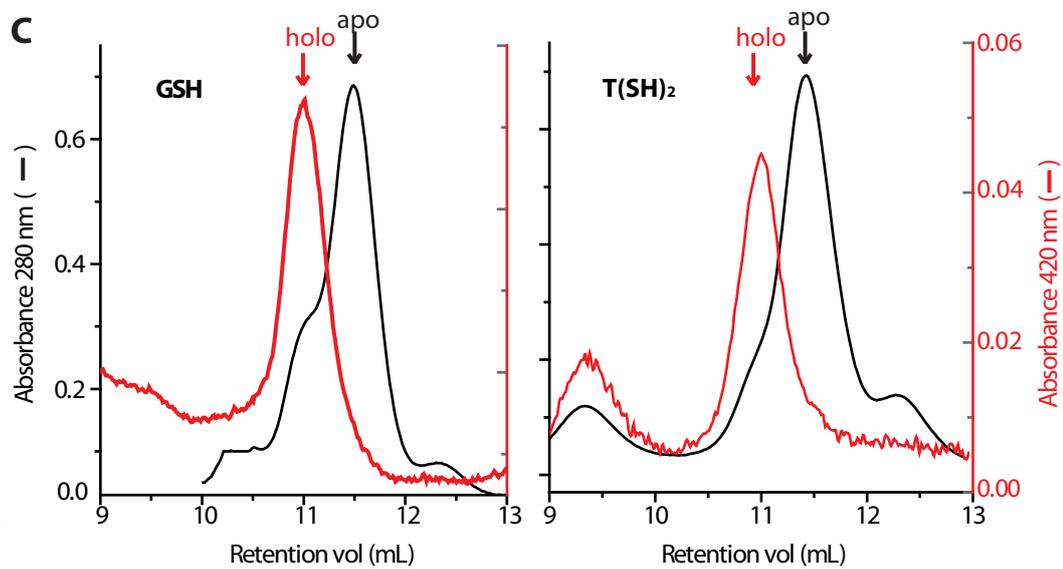
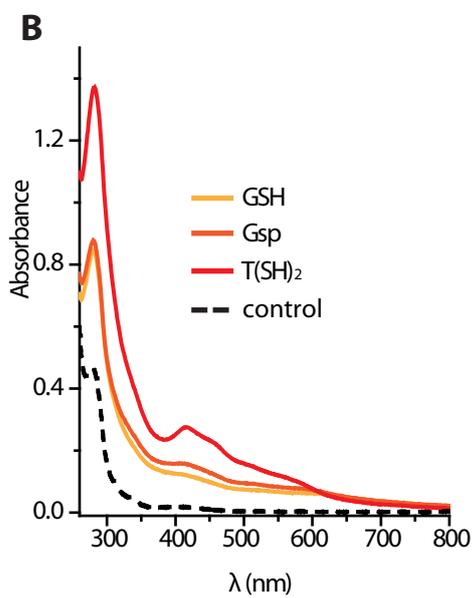
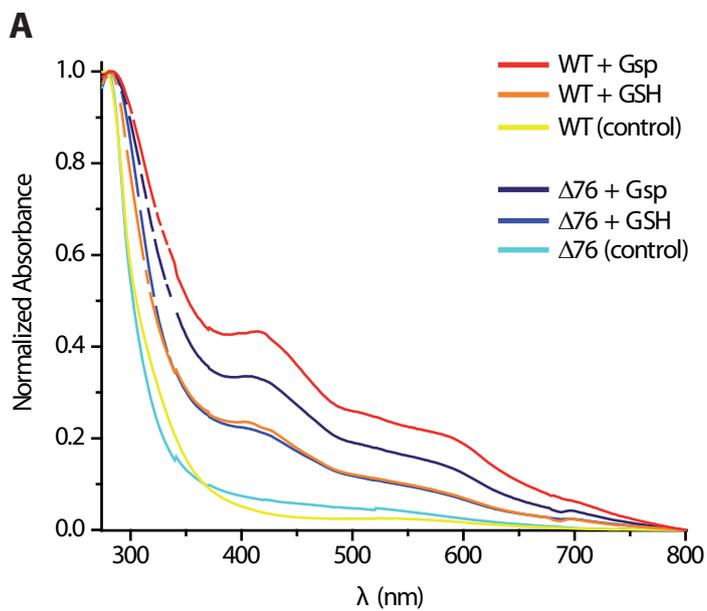
**Figura 4.14. Cambios conformacional producto de la coordinación de centros ferrosulfurados “in vivo”**

**A.** El eluído de la IMAC de las formas WT (izquierda), C181S (centro) y C104S (derecha) fue analizado por SEC inmediatamente luego de su obtención. Se utilizó una columna Superdex 75 10/300 GL equilibrada con amortiguador B degaseado con argón y detección en línea a 280 nm (negro) o 420 nm (rojo). En todos los casos se sembró igual volumen de muestra (500  $\mu$ L) pero no necesariamente igual concentración de proteína. El perfil cromatográfico del eluído de la IMAC de las formas WT y C181S muestra un hombro de mayor peso molecular donde se concentra la absorbancia a 420 nm (“holo”), el cual está ausente en el perfil de C104S, donde solo se evidencia el pico de la apo-proteína. **B.** El eluído de la IMAC de la forma WT fue separado en dos mitades y tratado con amortiguador B degaseado (panel superior) o EDTA 5 mM (panel inferior) y luego analizado por SEC en iguales condiciones a las de la parte A, sembrando igual concentración de proteína en cada caso (100  $\mu$ g). En el panel superior se evidencia el hombro correspondiente a la holo-proteína el cual desaparece por el tratamiento con el quelante.

**A****B**

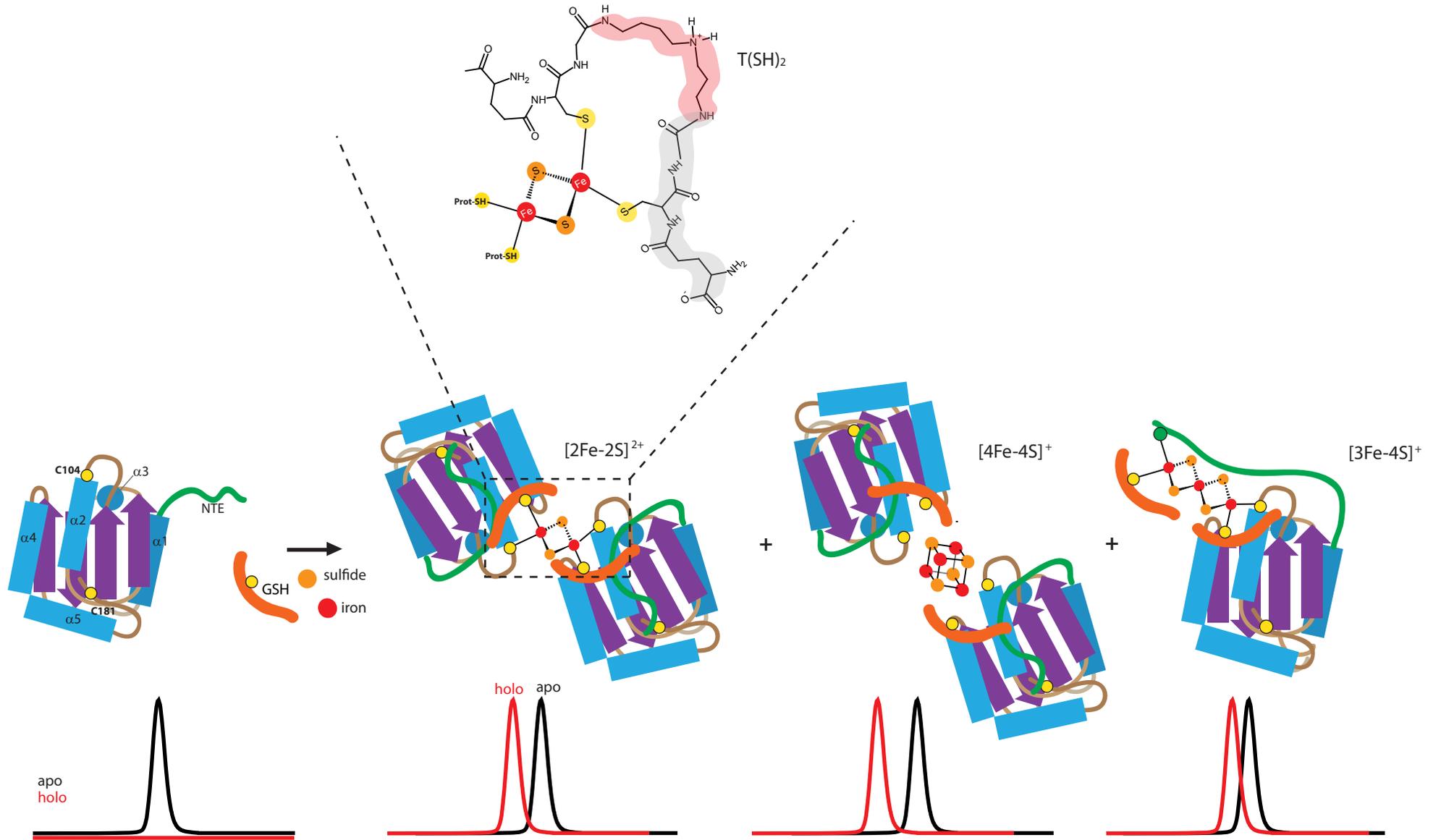
**Figura 4.15. *Tb1-C-Grx1* es capaz de usar tioles específicos del parásito para sustentar el ensamblado de centros ferrosulfurados**

**A.** Espectro UV-visible del resultado de la reconstitución *in vitro* de FeS sobre 50  $\mu\text{M}$  *Tb1-C-Grx1* WT o *Tb1-C-Grx1*  $\Delta 76$  sin etiqueta de afinidad en presencia de 150  $\mu\text{M}$  Gso o GSH. El ensayo fue realizado como se describe en la sección Materiales y Métodos, incubando la mezcla por 1 hr. Cumplido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 14000 g por 2 min y pasadas por una PD10 equilibrada en amortiguador B degaseado. La fracción proteica fue analizada por espectroscopía UV-visible y el resultado se muestra normalizado por su absorbancia a 280 nm. Las líneas indicadas como "control" son el mismo experimento en paralelo solo que omitiendo la desulfurasa de cisteína. **B.** 50  $\mu\text{M}$  *Tb1-C-Grx1* WT sin etiqueta de afinidad fue sometida al ensayo de reconstitución *in vitro* con 1 mM GSH, 1 mM Gsp o 500  $\mu\text{M}$  T(SH)<sub>2</sub>. El experimento control mostrado se realizó omitiendo la sal de hierro. C. una fracción de cada reconstitución mostrada en B con ~100  $\mu\text{g}$  de proteína fue analizada por SEC con detección a 280 nm (negro) y 420 nm (rojo). Se muestra solo el resultado obtenido al ensamblar el clúster con GSH (*izquierda*) o T(SH)<sub>2</sub> (*derecha*).



**Figura 4.16. Modelos de coordinación de centros ferrosulfurados por *Tb1-C-Grx1* FL a expensas de GSH y T(SH)<sub>2</sub>**

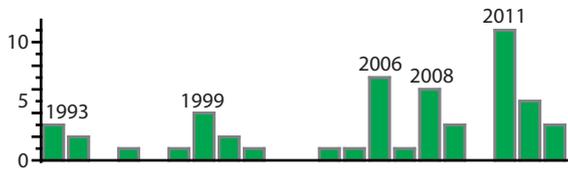
En la figura se esquematizan los posibles resultados del ensamblado de FeS sobre *Tb1-C-Grx1* FL in vitro e “in vivo”, en base a lo propuesto en (Comini et al., 2013; Zhang et al., 2013), así como un modelo del posible resultado en el estado oligomérico de la holo-proteína respecto a la apo para cada caso. Para el caso del clúster lineal [3Fe-4S]<sup>+</sup> se propone la participación de la región NTE en la coordinación del mismo. En la figura se propone además una posible geometría para la coordinación de un clúster tipo [2Fe-2S]<sup>2+</sup> a expensas de T(SH)<sub>2</sub>, en base a la estructuras presentadas en la Figura 1.8 y 1.10.



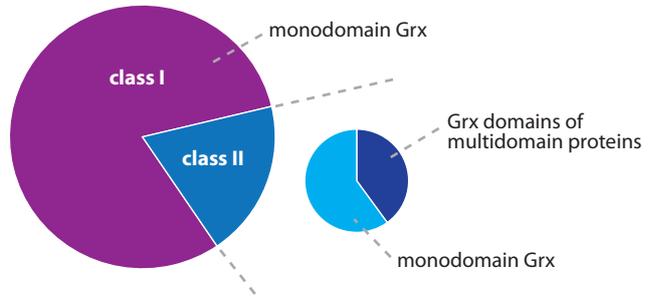
### **Figura 5.1. Información sobre estructuras tridimensionales de Grx**

En la Figura se resume parte de la información obtenida al analizar las 52 estructuras de Grx reportadas en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). **A.** Número de estructuras de Grx publicadas por año. **B.** Distribución de estructuras Grx por clase y, dentro de las Grx de clase II, se indica la relación entre estructuras que provienen de proteínas mono- o multidominio. **C.** Técnicas empleadas para la resolución de estructuras de Grx, comparadas con el total de estructuras disponibles en el Protein Data Bank. Las estructuras resueltas por cristalografía se clasifican en función del pH al que fueron obtenidas. **D.** Redundancia de estructuras Grx (1.5 promedio por cada proteína) y número de estructuras de Grx coordinando centros ferrosulfurados (5). **E.** Categorización taxonómica de las estructuras de Grx disponibles. La estructura reportada en este trabajo (PDB ID 2LTK, (Manta et al., 2013a)) constituye la primer estructura de Grx de un protozoario.

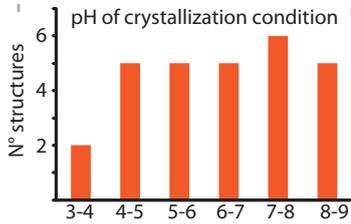
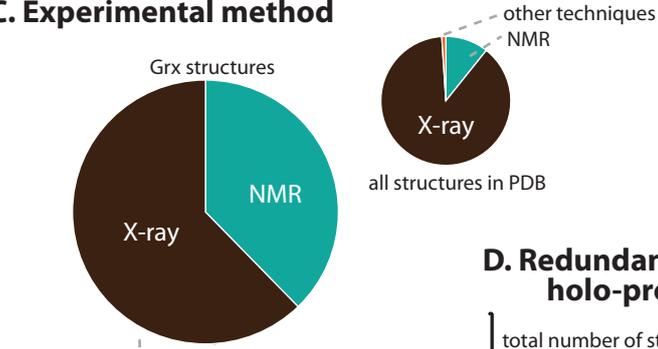
## A. Number of structures reported per year



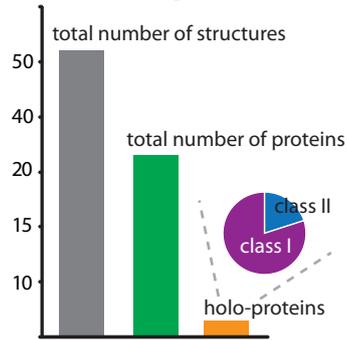
## B. Distribution by class



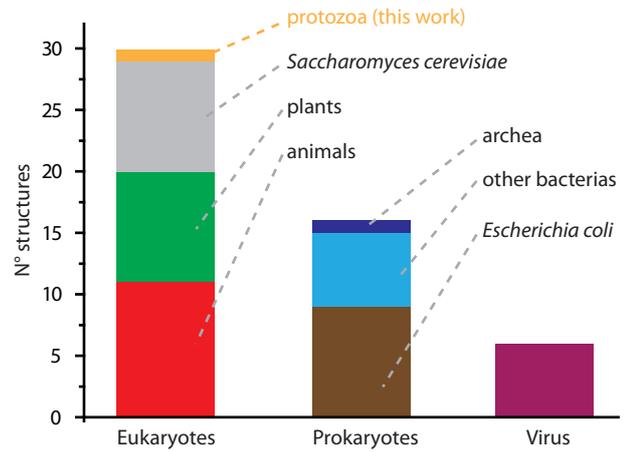
## C. Experimental method



## D. Redundancy and holo-protein

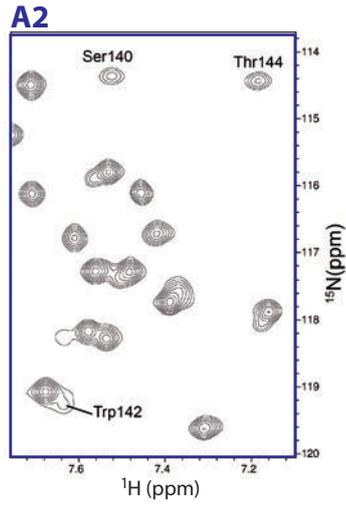
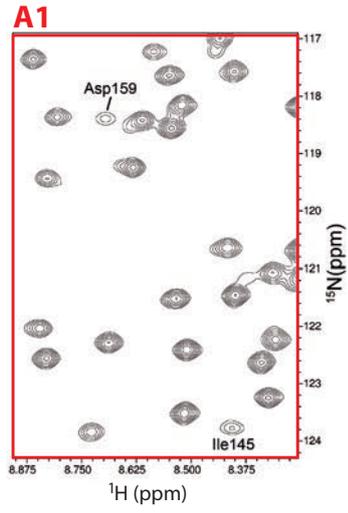
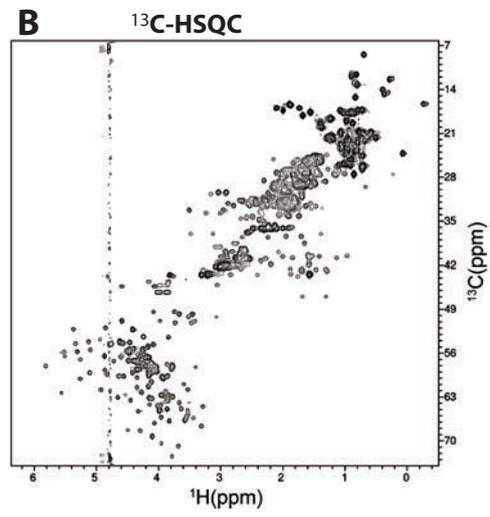
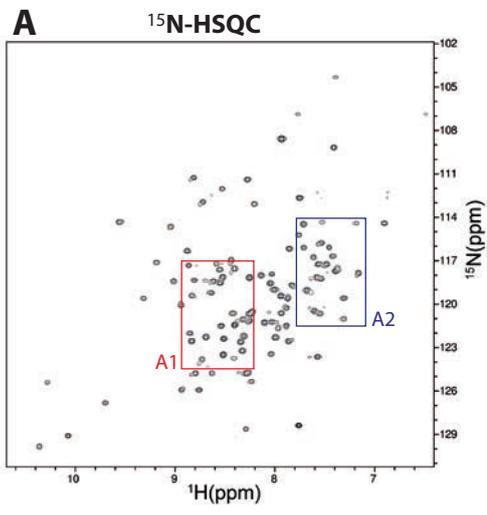


## E. Taxonomic distribution of structures



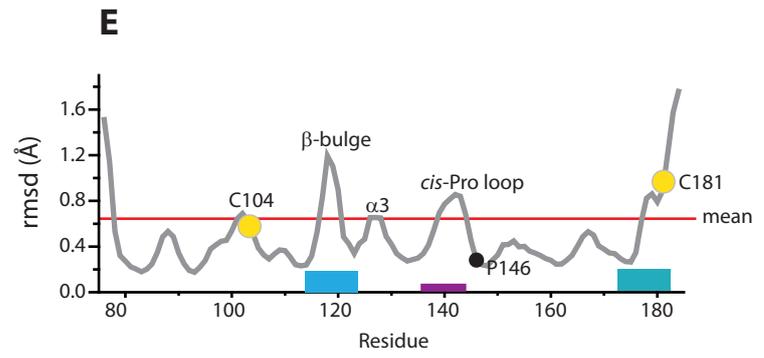
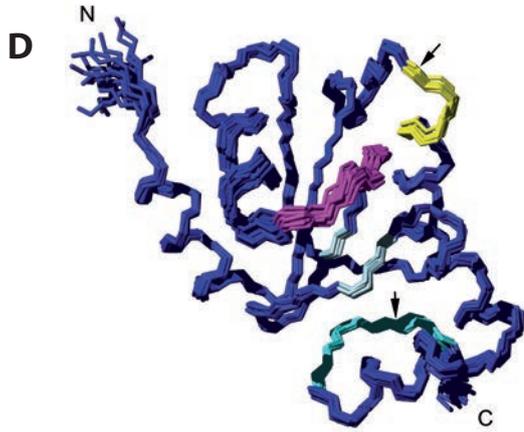
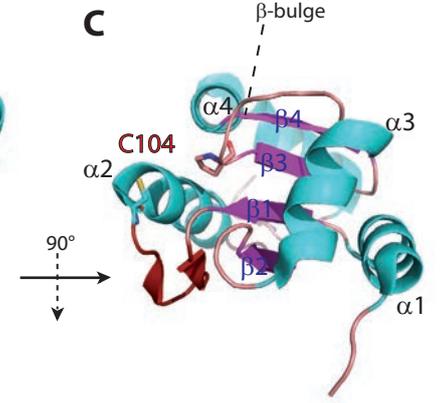
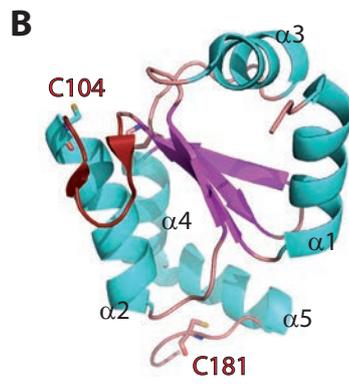
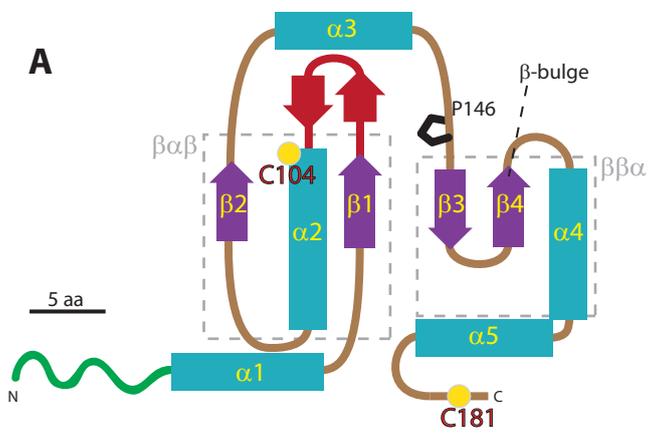
### **Figura 5.2. Espectros de NMR bidimensionales de *Tb1C-Grx1Δ76***

Espectros de  $^{15}\text{N}$ -HSQC (**A**) y  $^{13}\text{C}$ -HSQC (**B**) de 1mM *Tb1C-Grx1Δ76* uniformemente marcada con  $^{15}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}$  registrados a 900 MHz y 298 K. Los recuadros A1 y A2 (ampliados debajo) muestran regiones del espectro donde se identifican residuos con un ensanchamiento de la señal considerablemente mayor que el promedio (ver texto). Adaptado de (Manta et al., 2013a).



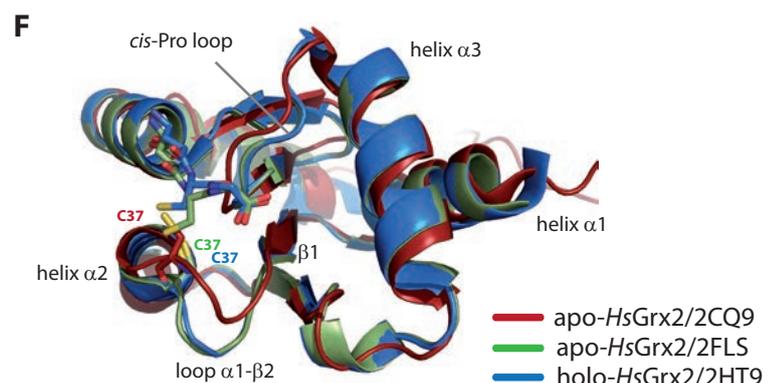
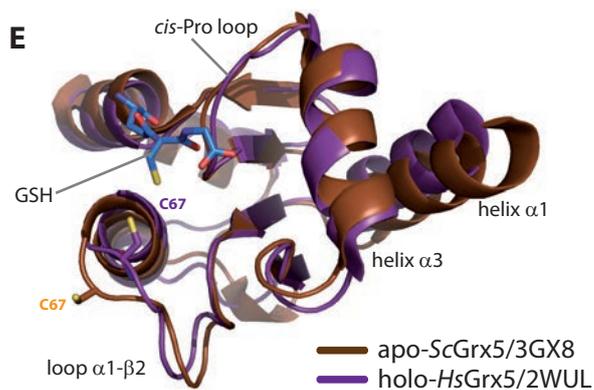
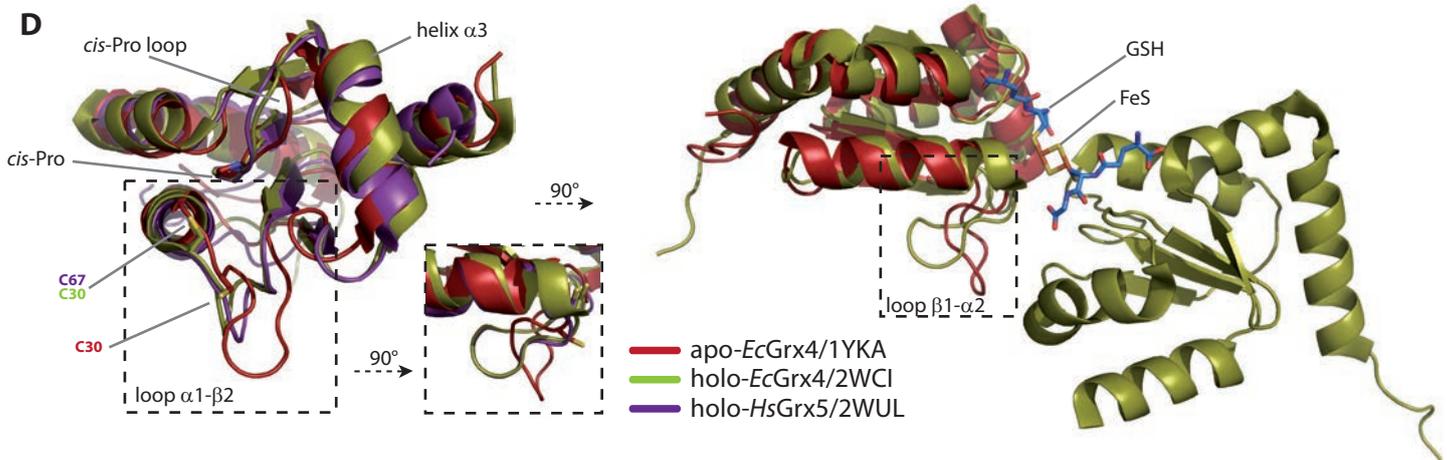
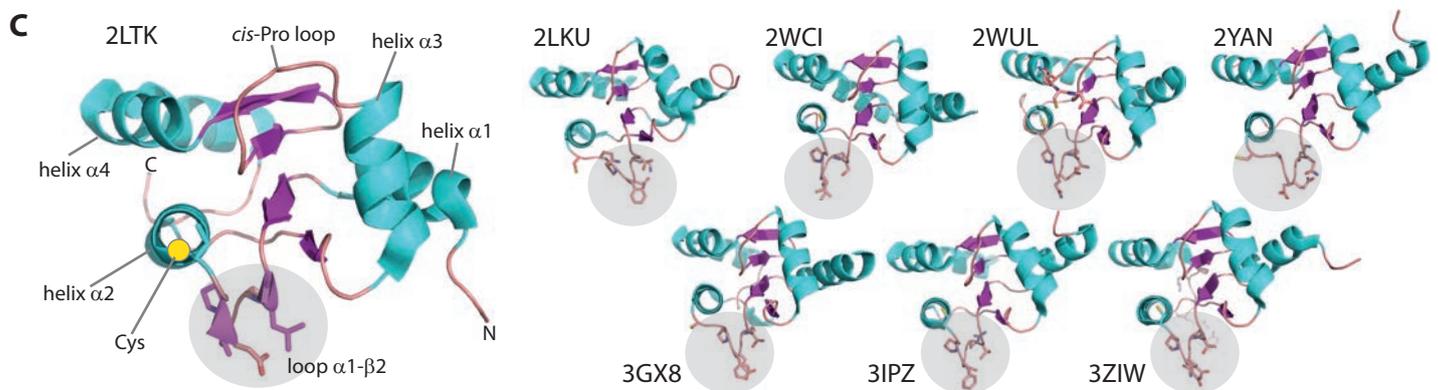
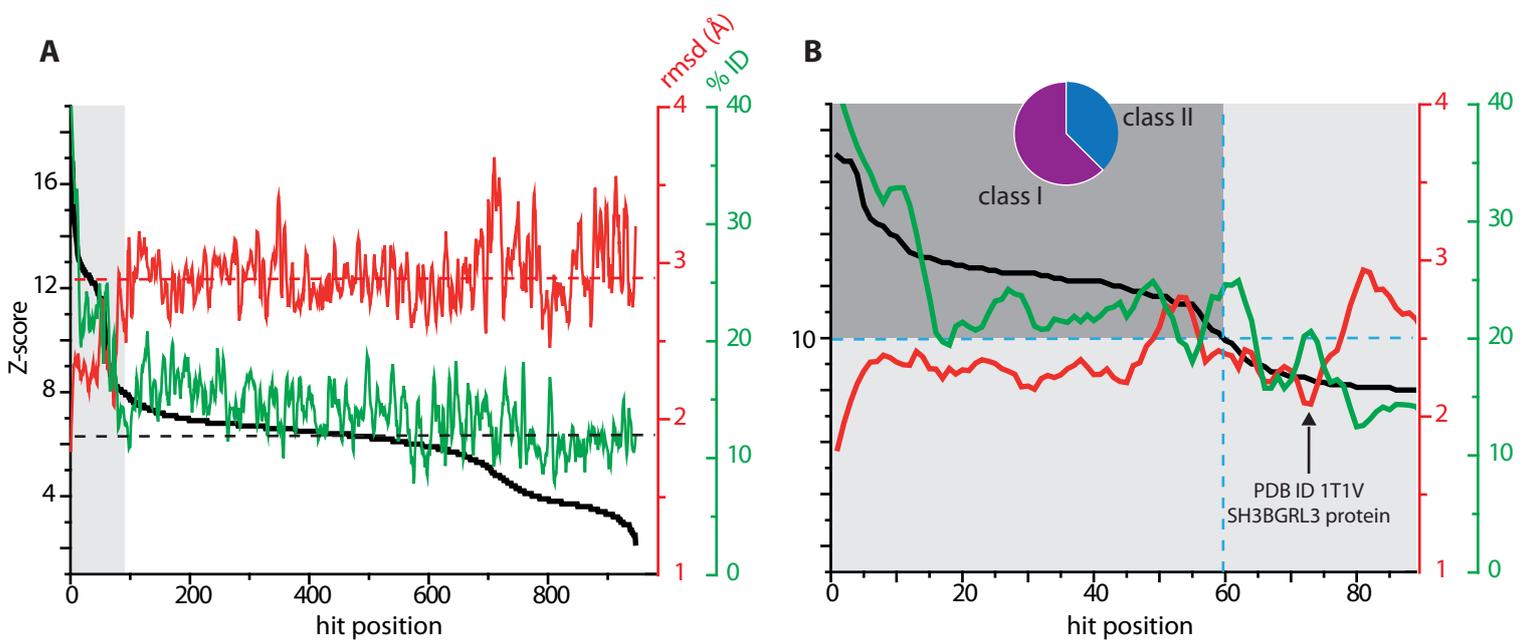
### Figura 5.3. Topología y estructura tridimensional de *Tb1-C-Grx1Δ76*

**A.** Topología de *Tb1-C-Grx1Δ76* obtenida en base a la estructura publicada en (Manta et al., 2013a) (PDB ID 2LTK). Las hebras  $\beta$  se indican en violeta y las hélices  $\alpha$  en turquesa, mientras que la conexión entre elementos de estructura secundaria se indican en marrón claro. Este criterio se conservará a lo largo de todo el capítulo cada vez que las estructuras se coloreen según estructura secundaria. Adicionalmente, sobre el esquema topológico se indica la posición de los residuos de cisteína (círculos amarillos), la *cis*-Pro (negro; P146), el " $\beta$ -bulge" y el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 previo al sitio activo (rojo oscuro). Los dos motivos del plegamiento Trx (ver Figura 1.15) se indican con cuadrantes grises y la región NTE, ausente en la estructura, se representa como un lazo flexible verde. Las estructuras secundarias regulares están a escala, según se indica en la barra negra. **B-C.** Representación de cintas de la estructura de *Tb1-C-Grx1Δ76* mostrando los elementos de estructura secundaria indicados en A, con el mismo código de colores. Los residuos de cisteína y la *cis*-Pro se indican como palos. En todo este trabajo, cada vez que los átomos de un residuo se explicitan los mismos se colorean en función de su naturaleza química según el siguiente código: azul para nitrógeno, rojo para oxígeno y amarillo para azufre, mientras que los carbonos reciben el color del resto de la molécula. La imagen de C está girada 90° respecto de B en el plano vertical. **D.** Superposición del esqueleto de los 20 mejores conformeros obtenidos luego de la minimización de la función de "score", refinados con AMBER (ver (Manta et al., 2013a)). Los residuos del sitio activo CAYS (residuos 104 a 107) se indican en amarillo, los residuos involucrados en el  $\beta$ -bulge en celeste (148, 155 y 156), el *loop* conteniendo a la *cis*-Pro en violeta y el extremo carboxilterminal (residuos 178-182) en turquesa. La posición de C104 y C181 se indica con flechas negras. **E.** Los 20 conformeros fueron analizados con el servidor "Random coil Index" ([http://randomcoilindex.com/cgi-bin/rci.cgi\\_current.py](http://randomcoilindex.com/cgi-bin/rci.cgi_current.py)) (Berjanskii and Wishart, 2005)) a partir de las coordenadas de *Tb1-C-Grx1Δ76* depositadas en "Biological Magnetic Resonance Data Bank" (<http://www.bmrb.wisc.edu>) con el código 18485. La gráfica muestra la dispersión en rmsd (Å) por residuo promedio para los 20 conformeros, donde se indican los mismos elementos que en la figura de la izquierda y, adicionalmente, la posición de P146 (círculo negro). La línea roja indica la desviación cuadrática media de los 20 conformeros.



## Figura 5.4. Búsqueda de homólogos estructurales a *Tb1-C-Grx1* por DALI

**A-B.** Homólogos estructurales de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76. En **A** se muestra la gráfica de los valores de Z-score (negro), rmsd (en Å, rojo) y porcentaje de identidad (% ID, verde) para todos los "hit" con Z-score  $\geq 2$  obtenidos realizando la búsqueda en el servidor DALI con la estructura 2LTK como sonda. **B.** Ampliación de la zona sombreada en gris en A correspondiente a las estructuras con %ID  $\geq 15\%$ . Dentro de ellas, el cuadrante gris oscuro indica aquellas estructuras con Z-score  $\geq 10$ , cuya clasificación en clase I o II se indica sobre la gráfica. **C.** Comparación de elementos de estructura secundaria y *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$  en las *Grx* de clase II. A la izquierda se muestra la estructura de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 orientada con la lámina  $\beta$  y la hélice  $\alpha 2$  perpendiculares al plano y coloreada por estructura secundaria según se indica en la Figura 5.3, indicando solo algunos elementos de estructura secundaria, los extremos y la posición de la cisteína del sitio activo. El *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$  se indica sobre fondo gris y los residuos que lo componen se detallan en forma de palos. A la derecha se muestran las estructuras de *Grx* de clase II (ver Figura 5.5), en la misma orientación que la figura de la izquierda y destacando la ubicación del *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$  con fondo gris. **D.** Comparación de las estructuras de *EcGrx4* en forma apo y holo con *HsGrx5* en forma apo. A la izquierda se muestra al alineamiento estructural de un monómero de cada estructura, orientados como en C y coloreadas según se indica en la clave. La *cis*-Pro y la cisteína aminoterminal del sitio activo se destacan en forma de palos. El marco punteado negro indica la ubicación del *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$ , el cual está girado 90° en el cuadrante de la derecha para una mejor visualización de las diferencias. En la figura de la derecha se muestra la superposición de las formas apo (PDB ID 1YKA) y holo (PDB ID 2WCI) de *EcGrx4*, destacando la ubicación del *loop*  $\beta 1$ - $\alpha 2$ . El GSH y el clúster de hierro y azufre se indican en palos. El esqueleto del GSH se colorea en azul y los átomos de hierro del clúster se indican en naranja. Los monómeros están orientados como en el cuadrante punteado. **E.** Comparación de las estructuras de *ScGrx5* y *HsGrx5*. La cadena A de holo *HsGrx5* (PDB ID 2WUL) se superpuso a la estructura de *ScGrx5* en su forma apo (PDB ID 3GX8). Se destacan algunos elementos de estructura secundaria así como la posición de la cisteína del sitio activo y GSH ubicado en la estructura de *HsGrx5*, con el código de colores indicado en la clave. **F.** Comparación de las estructuras apo y holo de *HsGrx2*. La cadena A de holo-*HsGrx2* (PDB ID 2HT9) se superpuso a la estructura de *HsGrx5* en su forma apo resuelta por cristalografía (PDB ID 2FLS) y NMR (PDB ID 2CQ9). Las moléculas de GSH presentes en las estructuras 2HT9 y 2FLS se indican en el color correspondiente.



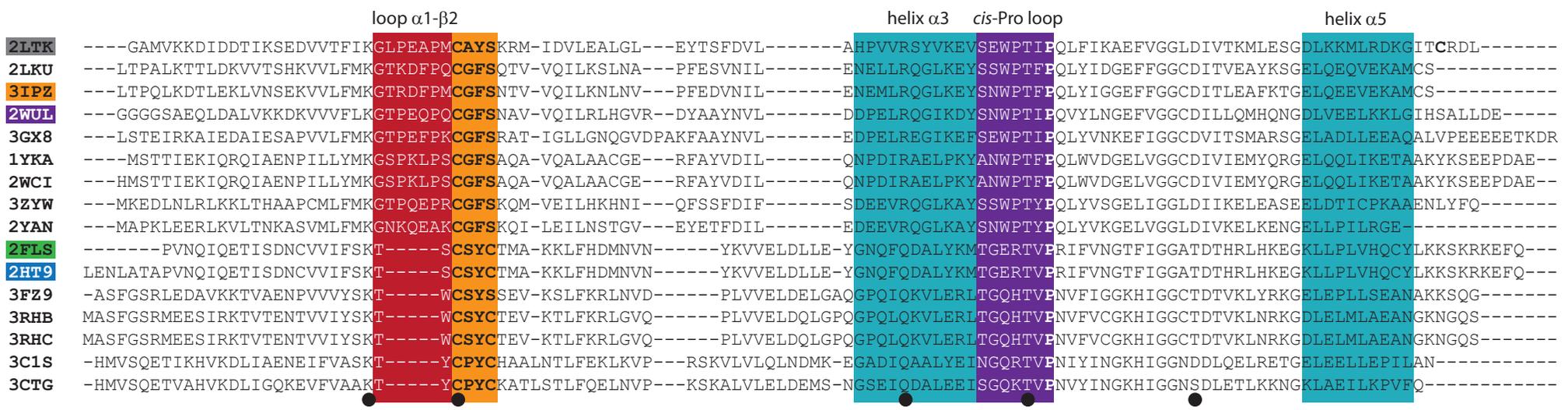
### Figura 5.5. Propiedades de las estructuras seleccionadas para el análisis estructural

En la tabla se presenta el nombre de la proteína, código UniProt, secuencia del sitio activo, técnica de resolución estructural, PDB ID, resolución (para estructuras cristalográficas), y datos sobre la presencia o no de ligandos de las estructuras de Grx identificadas como mejores homólogos estructurales de 2TLK según DALI, clasificadas en clase I y II. Los datos de la comparación con 2LTK (Z-score, rmsd y porcentaje de identidad de secuencia) se indican en las últimas 3 columnas. Es importante destacar que el porcentaje de identidad de secuencia refiere a la secuencia de las regiones cristalizadas, las cuales en muchos casos son solo el dominio Grx o versiones truncas de la proteína. Las estructuras usadas para comparación se resaltan en color y los colores indicados para cada una de ellas se conservan a lo largo de este capítulo y son: naranja para apo-*AtGrxS14*, violeta para holo-*HsGrx5*, azul marino para holo-*HsGrx2* y verde para apo-*HsGrx2*. Las otras estructuras que aparecen en este capítulo se colorean siempre en otros colores, y se indica en la clave correspondiente en cada figura. En la parte inferior se muestra el alineamiento de las proteínas mostradas en la tabla, en el mismo orden. Se destaca la ubicación del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 (rojo), sitio activo (naranja), hélices  $\alpha$ 3 y  $\alpha$ 5 (turquesa) y *cis-Pro loop* (violeta). Los residuos de cisteína y la *cis-Pro* se destacan en negrita. Algunos de los residuos involucrados en la unión de GSH se indican debajo con punto negro (ver texto).

Class	Protein name	UniProt ID	Active site	Form	PDB ID	Method	Resolution (Å)	Ligand	Z-score	rmsd (Å)	% ID
-------	--------------	------------	-------------	------	--------	--------	----------------	--------	---------	----------	------

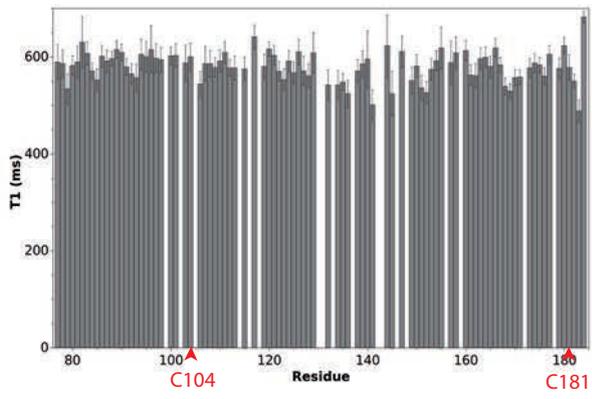
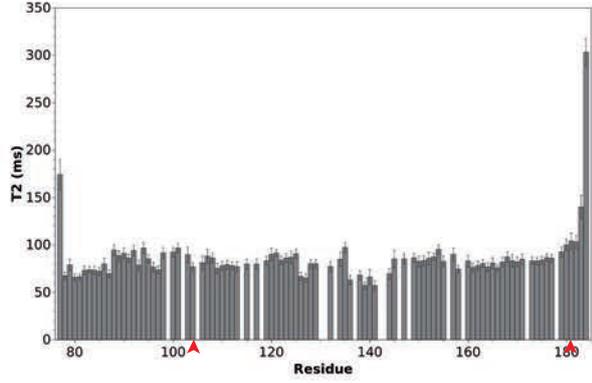
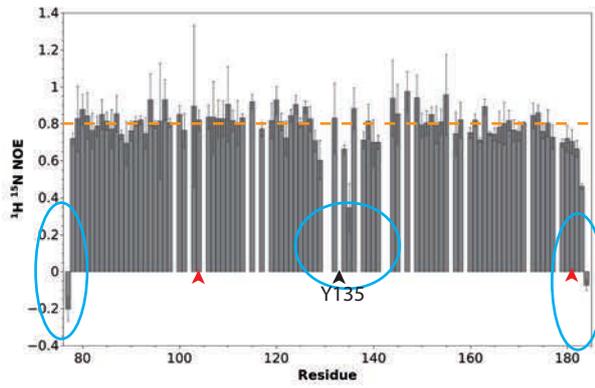
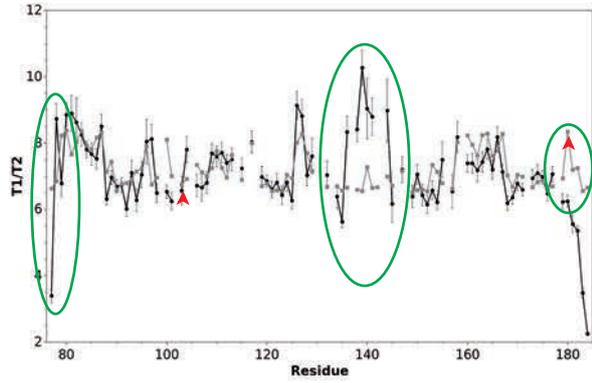
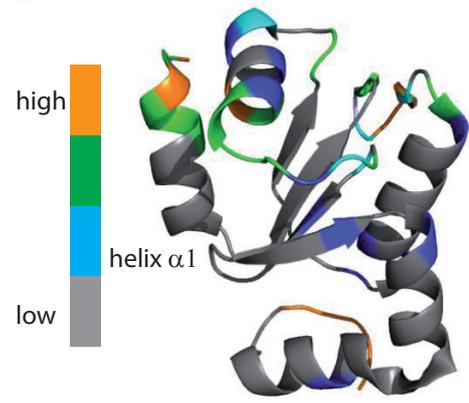
class II	<i>Tb1-C-Grx1</i>	Q2UZM9	CAYS	APO	2LTK	NMR	-	-	-	-	-
	<i>PtGrxS14</i>	B9IA39	CGFS	APO	2LKU	NMR	-	-	13.3	2.7	35.0
	<i>AtGrxS14</i>	Q84Y95	CGFS	APO	3IPZ	X-RAY	2.4	-	14.6	2.4	34.0
	<i>HsGrx5</i>	Q86SX6	CGFS	HOLO	2WUL	X-RAY	2.4	GSH + FeS	17.0	1.9	39.0
	<i>ScGrx5</i>	Q02784	CGFS	APO	3GX8	X-RAY	1.7	-	15.1	2.5	41.0
	<i>EcGrx4</i>	P0AC69	CGFS	APO HOLO	1YKA 2WCI	NMR X-RAY	- 1.9	- GSH + FeS	9.8 14.3	3.0 2.0	27.0 30.0
<i>HsPICOT</i>	O76003	CGFS	APO	3ZYW	X-RAY	1.8	EDO	15.4	2.8	30.0	
		CGFS	APO	2YAN	X-RAY	1.9	GSH (c)	13.6	2.2	38.0	

class I	<i>HsGrx2</i>	Q9NS18	CSYC	APO	2FLS	X-RAY	2.5	GSH	12.8	2.3	20.0
			HOLO	2HT9	X-RAY	1.9	GSH + FeS	12.4	2.1	19.0	
	<i>PtGrxS12</i>	ACJ60637	CSYC	APO	3FZ9	X-RAY	1.7	GSH (c)	13.1	2.3	19.0
	<i>AtGrxC5</i>	Q8GWS0	CSYC	APO	3RHB	X-RAY	1.2	GSH (c)	12.9	2.2	22.0
			HOLO	3RHC	X-RAY	2.4	GSH + FeS	12.7	2.1	22.0	
	<i>ScGrx1</i>	P25373	CPYC	APO	3C1S	X-RAY	2.5	GSH (c)	12.9	2.3	21.0
<i>ScGrx2</i>	P17695	CPYC	APO	3CTG	X-RAY	1.5	-	13.1	2.2	19.0	



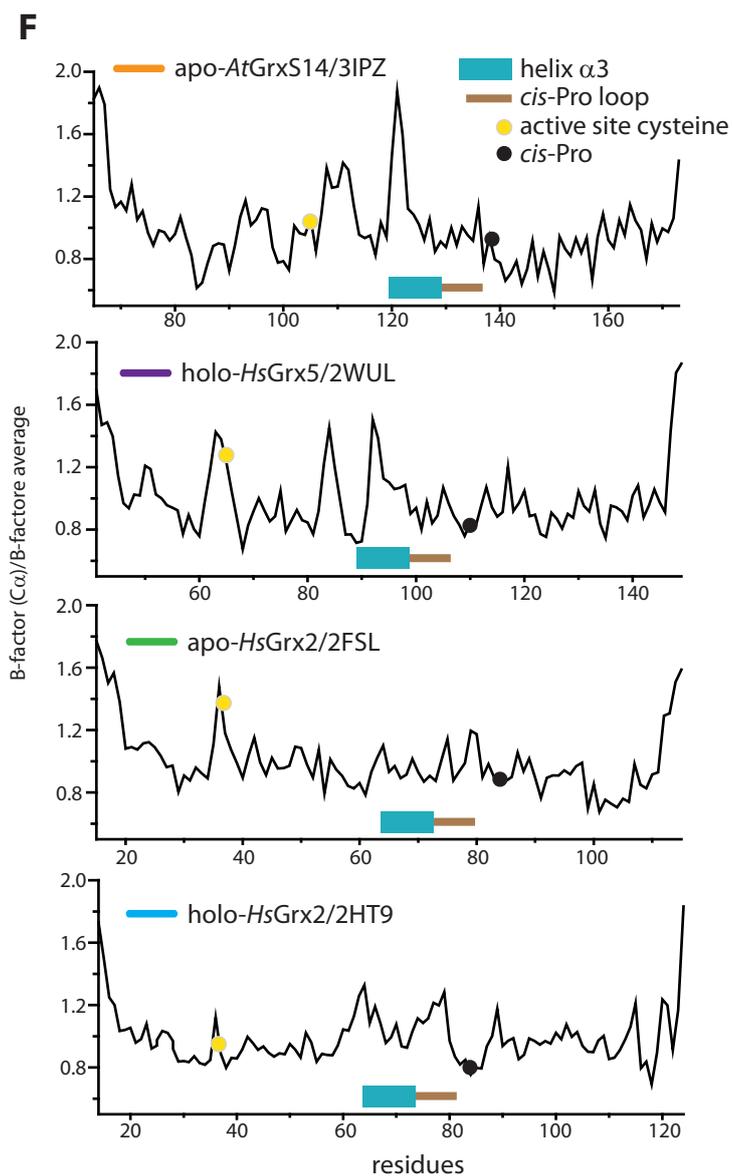
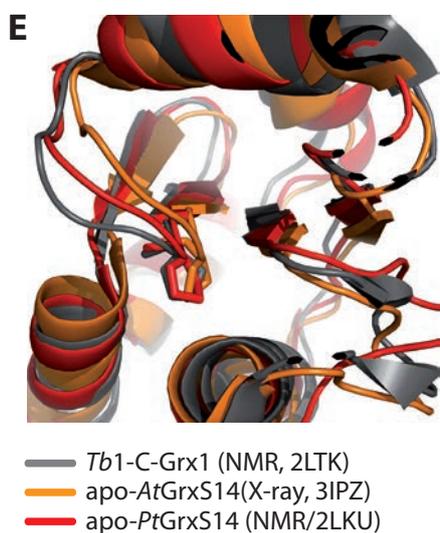
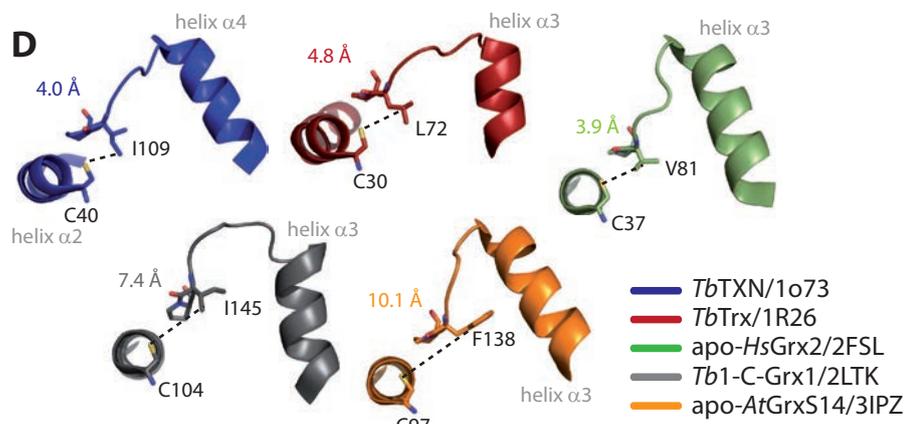
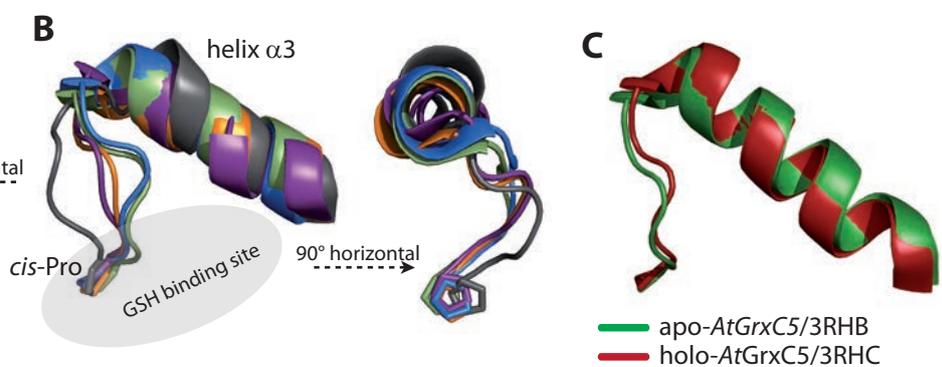
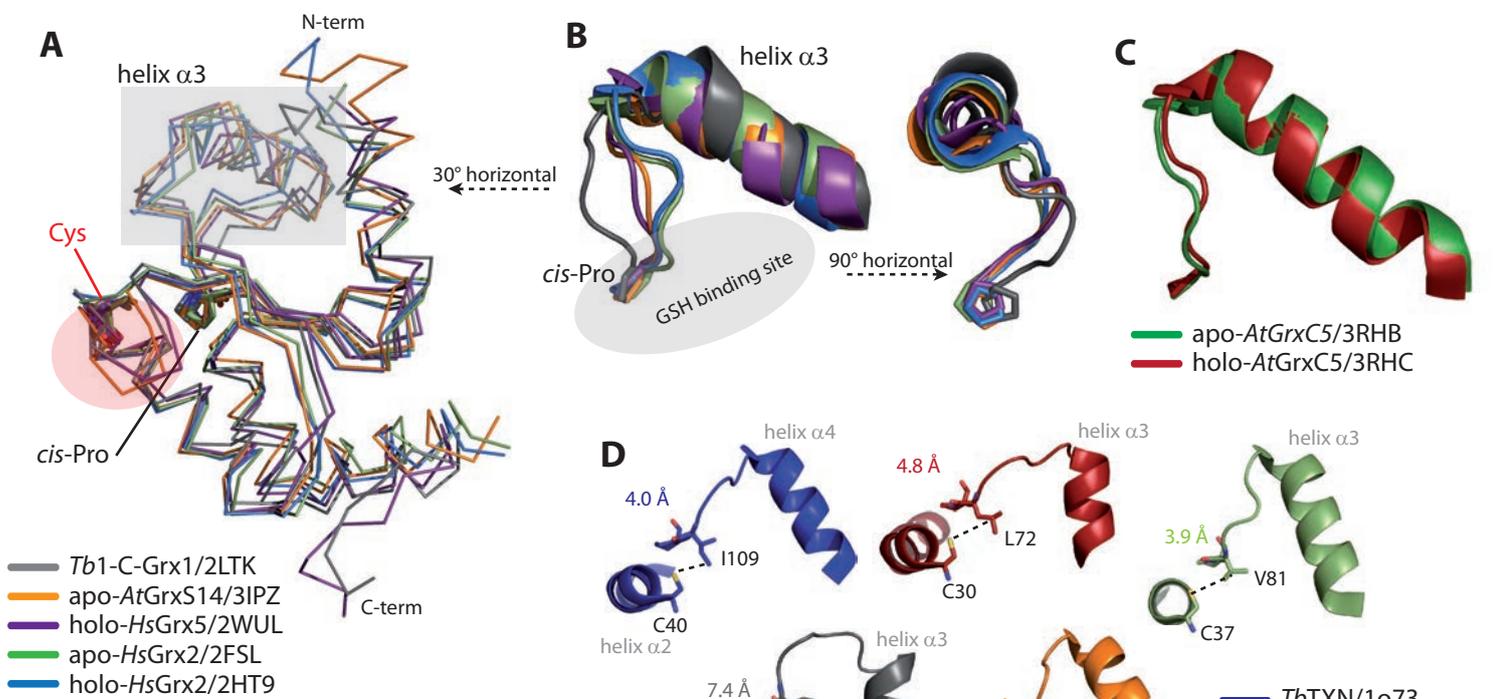
### Figura 5.6. Conformación en solución y dinámica del esqueleto de *Tb1-C-Grx1Δ76*

En la figura se muestra la relajación longitudinal,  $T_1$  (**A**) y transversal,  $T_2$  (**B**) de la señal de  $^{15}\text{N-NH}$  en *Tb1-C-Grx1Δ76*, así como la señal de  $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ -NOE (**C**), medidos a 600 MHz y 298 K según se detalla en (Manta et al., 2013a). La línea en C indica el límite por debajo del cual se considera que los residuos poseen una movilidad superior a la vibracional y los recuadros celestes señalan la región correspondiente a la hélice  $\alpha_3$  (donde se destaca la ausencia de NOE para Y135, ver texto) y los extremos de la proteína. En **D** se compara el cociente  $T_1/T_2$  obtenido experimentalmente (círculos negros) con el calculado con el programa HYDRONMR (Bernadó et al., 2002) (cuadrados grises) y el recuadro verde indica zonas donde el modelo y los datos se apartan significativamente (ver texto). Las cabezas de flecha roja en **A-D** indican la posición de las cisteínas C104 y C181. **E**. Representación gráfica sobre la estructura 2LTK del cociente  $T_1/T_2$  medido (parte **D**) según el código de colores indicado en la figura.

**A****B****C****D**helix  $\alpha$ 3**E**

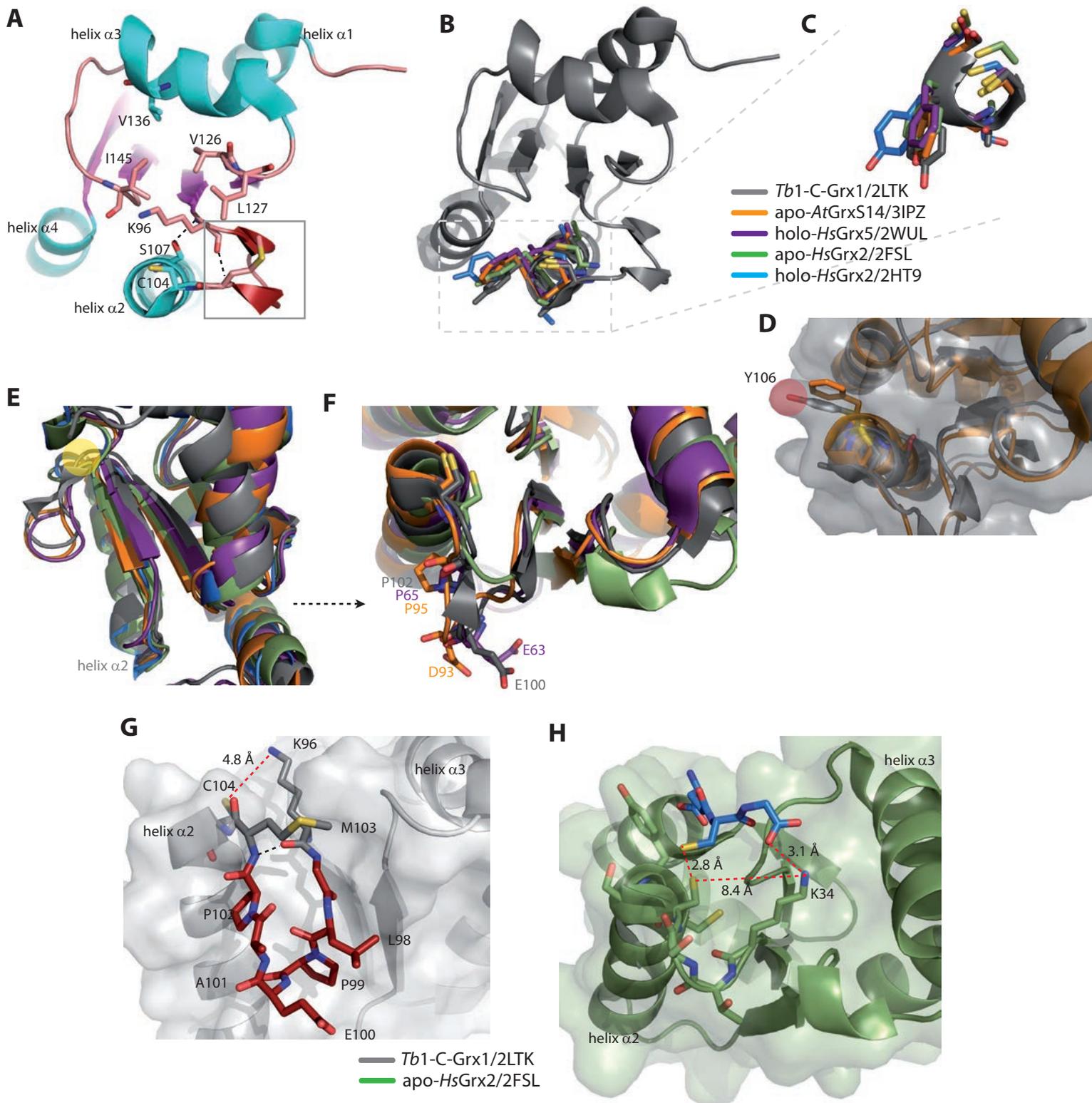
### Figura 5.7. Conformación y dinámica del *cis-Pro loop*

**A.** Superposición del esqueleto de *Tb1-C-Grx1Δ76* (gris) respecto a las estructuras de apo-*AtGrxS14* (naranja, 3IPZ), holo-*HsGrx5* (violeta, 2LWUL, cadena A, se omiten el GSH y centro ferrosulfurado), apo-*HsGrx2* (verde, 2FSL, se omite el GSH) y holo-*HsGrx2* (celeste, 2HT9, cadena A, se omite el GSH y centro ferrosulfurado). En cada estructura se destacan los residuos de cisteína del sitio activo ("Cys") y la *cis-Pro*, en el color correspondiente. La zona donde se ubica el *loop*  $\beta 1-\alpha 2$  precedente al sitio activo se resalta en fondo rojizo (ver próxima Figura) y la posición correspondiente a la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* se destaca con un cuadrante gris y se amplía en **B**, donde se muestra en modo de cintas en una orientación rotada  $30^\circ$  hacia la izquierda, dejando la hélice  $\alpha 3$  paralela al plano. La *cis-Pro* de cada estructura se indica en palos, con el color correspondiente. A la derecha se muestra la misma figura rotada  $90^\circ$  hacia la derecha, dejando la hélice  $\alpha 3$  perpendicular al plano. **C.** En la figura se muestra el alineamiento de las hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* en las estructuras apo (PDB ID 3RHB, verde) y holo (PDB ID 3RHC, rojo oscuro) de *AtGrxC5* (Couturier et al., 2011), destacando la posición de la *cis-Pro* en cada caso en el color correspondiente. **D.** En la figura se muestra la posición relativa de la *cis-Pro* y el residuo hidrofóbico inmediatamente anterior respecto de la cisteína del sitio activo en las estructuras de la triparredoxina de *T. brucei* (PDB ID 1O73, azul oscuro (Alphey et al., 2003)), tiorredoxina de *T. brucei* (PDB ID 1R26, rojo oscuro (Friemann et al., 2003)) y las estructuras de *Tb1-C-Grx1Δ76*, *AtGrxS14* y *HsGrx2* comentadas anteriormente. Los residuos se indican en forma de palos, con las distancias medidas indicadas en la figura. **E.** En la figura se muestra la región del *cis-Pro loop* entre *Tb1-C-Grx1Δ76* (gris) y las dos formas de apo-*GrxS14* obtenidas por rayos X (3IPZ, naranja) y RMN (2LKU, rojo oscuro). **F.** Representación gráfica de los factores B de las estructuras cristalográficas mostradas en la parte **A**, con el mismo código de colores. Los factores B de los carbonos  $\alpha$  de cada cadena normalizados al factor B promedio de la cadena se grafican en función de la posición del residuo, indicándose la posición de la cisteína del sitio activo (círculo amarillo) y de la *cis-Pro* (círculo negro). La ubicación de la hélice  $\alpha 3$  y el *cis-Pro loop* en cada secuencia se indican como una barra turquesa y una línea marrón, respectivamente, siguiendo el código de colores del esquema topológico de la Figura 5.3.A. Para las estructuras 2WUL y 2HT9, que poseen 4 y 2 cadenas respectivamente, se graficó el promedio normalizado de todas las cadenas.



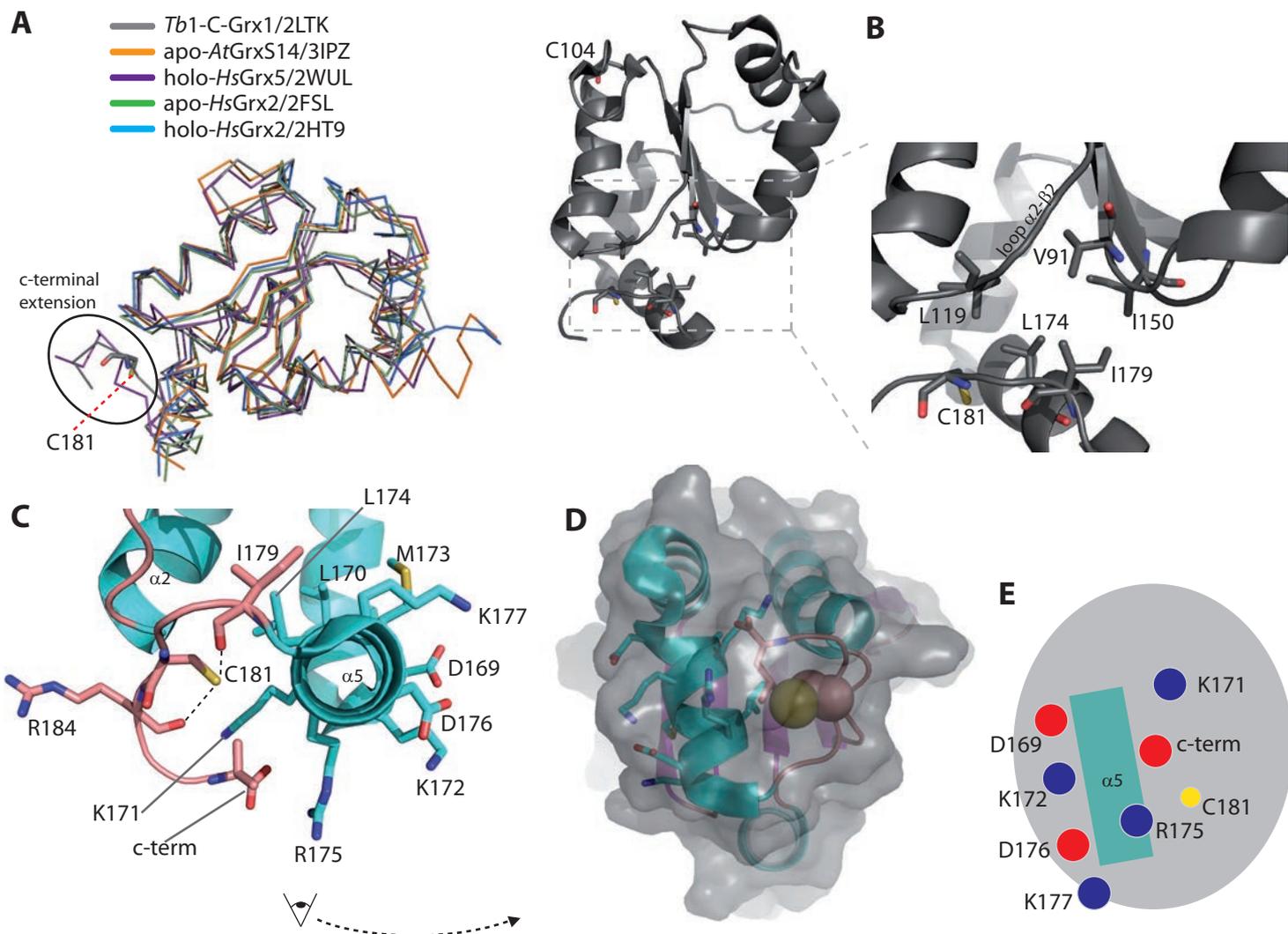
### Figura 5.8. Características del sitio activo de *Tb1-C-Grx1*

**A.** La estructura de la región del sitio activo putativo de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 se indica en modo de cintas, coloreada por estructura secundaria, según se indicó en la Figura 5.3. Los residuos indicados en el texto se destacan como palos y los enlaces de hidrógeno como líneas negras punteadas. **B.** Los residuos del sitio activo de las cinco estructuras escogidas para comparación se muestran en forma de palos y superpuestos sobre la estructura de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76, en gris, en la misma orientación que en **A.** En **C** se detalla la disposición de los mismos en una vista con mayor acercamiento, destacando las cadenas laterales. Para referencia se muestra la región de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 que contiene al sitio activo, en gris. **D.** La posición de la cadena lateral de Y106 en el sitio activo de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 (color gris) se compara con la posición de la cadena lateral de F99 en la estructura de *AtGrxS14* (PDB ID 3IPZ, color naranja). En gris se muestra la superficie de *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 sobre la cual se indica el oxígeno de la cadena lateral de Y106 en rojo. Los átomos de azufre de las cisteínas del sitio activo se destacan en color amarillo. **E.** Superposición de las cinco estructuras en modo de cintas, orientadas para mostrar la ubicación del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 respecto del *core* de las proteínas. Cada estructura se colorea según la clave mostrada en la figura y la zona marcada con amarillo indica la ubicación aproximada de la cisteína del sitio activo en todas las estructuras. **F.** Detalle de la ubicación de la prolina y los residuos cargados presentes en el *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 en las estructuras 2LTK, 2WUL y 3IPZ en comparación con la estructura de *HsGrx2* (2FLS, verde), que no posee este segmento. Los átomos de azufre de las cisteínas del sitio activo se destacan en color amarillo. La imagen corresponde a la visión de la parte E girada 90° hacia la derecha sobre la horizontal y 90° hacia abajo en el eje vertical. **G-H.** Detalle del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 en *Tb1-C-Grx1* $\Delta$ 76 (izquierda) y *HsGrx2* (PDB ID 2FLS, derecha). En cada caso se indica la estructura de la proteína en modo de cintas y la superficie en el mismo color. Los residuos del *loop*  $\beta$ 1- $\alpha$ 2 se destacan en forma de palos y el puente de hidrógeno se indica como una línea punteada negra, mientras que las distancias se indican como líneas punteadas rojas. Se indican algunos residuos relevantes en la discusión (ver texto).



### Figura 5.9. Región carboxiloterminal y cisteína 181

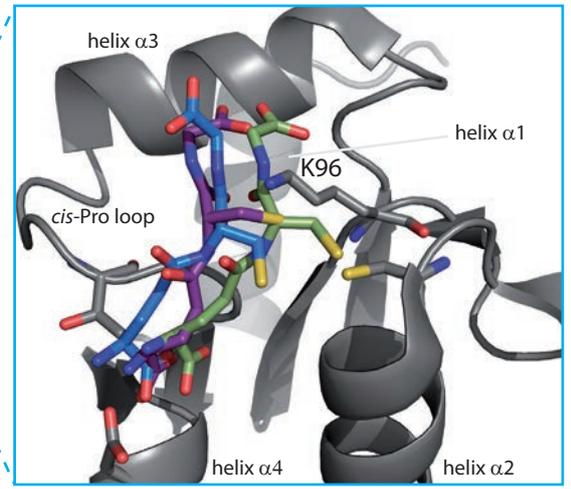
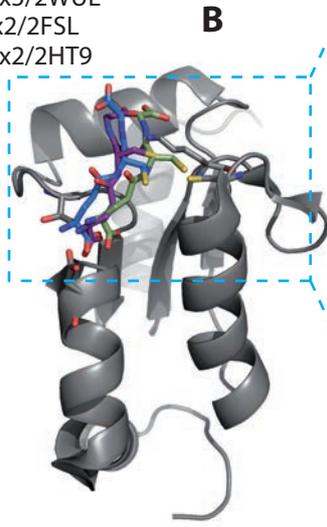
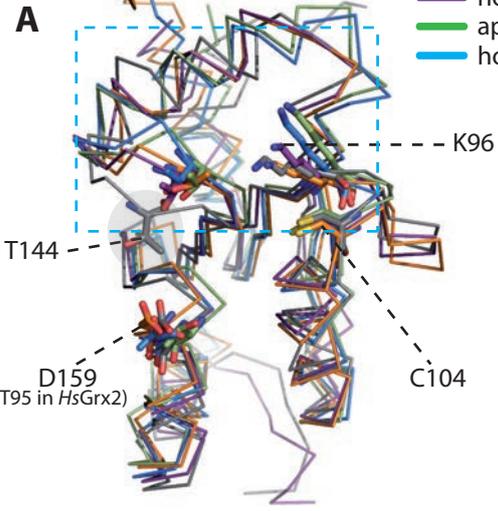
**A.** Superposición de las cinco estructuras de Grx consideradas en este capítulo, orientadas de manera de destacar la extensión posterior a la hélice  $\alpha 5$ . El código de colores se indica en la figura. La región carboxiloterminal se indica con un recuadro negro y la C181 de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* se destaca en forma de palos, con los átomos coloreados como se ha venido usando. **B.** Ubicación de los residuos que constituyen el botón hidrofóbico comentado en el texto. A modo de referencia se indica la posición de C104. La región de interés (cuadrante gris) se amplía a la derecha y los residuos se indican con su numeración correspondiente. **C.** La estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* fue orientada para mostrar la distribución de residuos hidrofóbicos y cargados en la hélice  $\alpha 5$  y su relación con el extremo carboxiloterminal. En **D** se muestra lo mismo desde una visión rotada 90° en el eje vertical y mapeando la superficie de la proteína en color gris. La posición de C181 se destaca como una bola amarilla. La distribución de cargas en esta región se esquematiza en **E** para una mejor visualización de las interacción discutidas en el texto.



### **Figura 5.10. Sitio de unión a GSH**

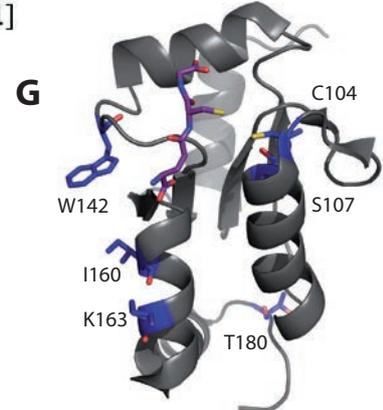
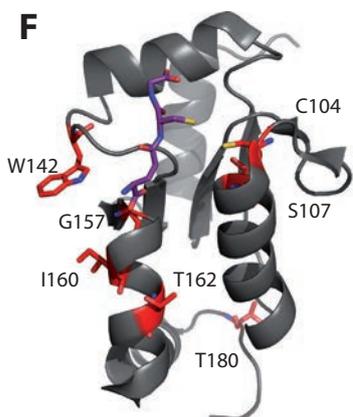
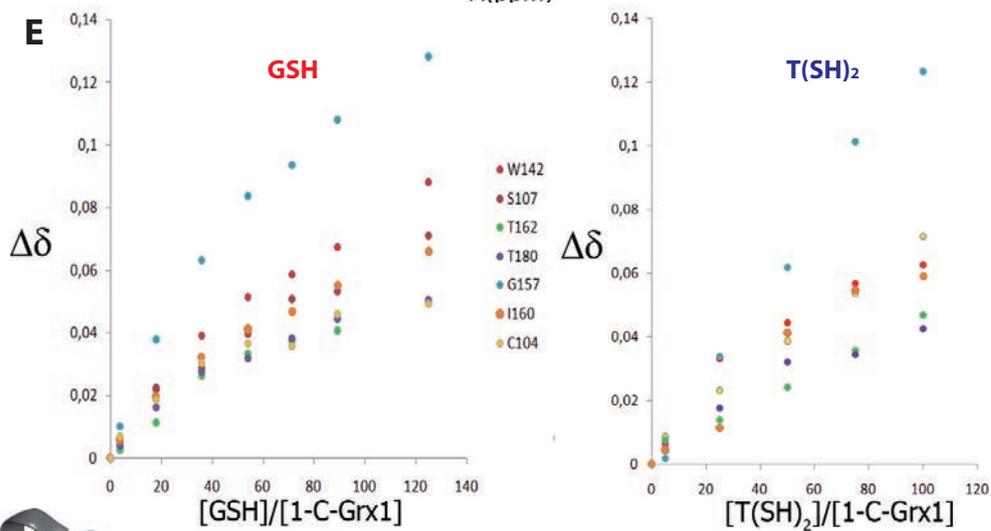
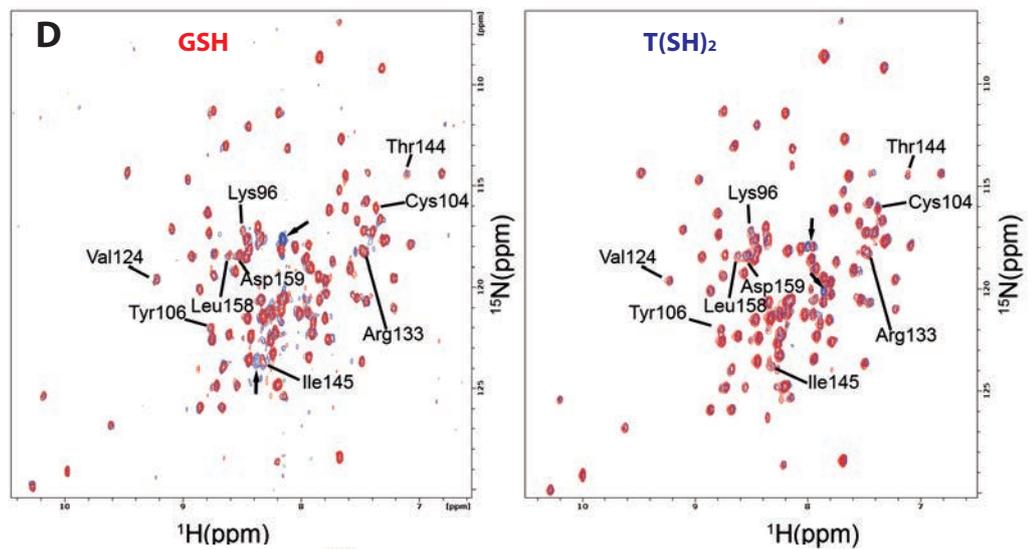
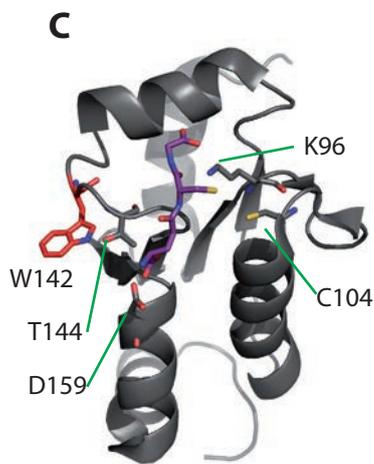
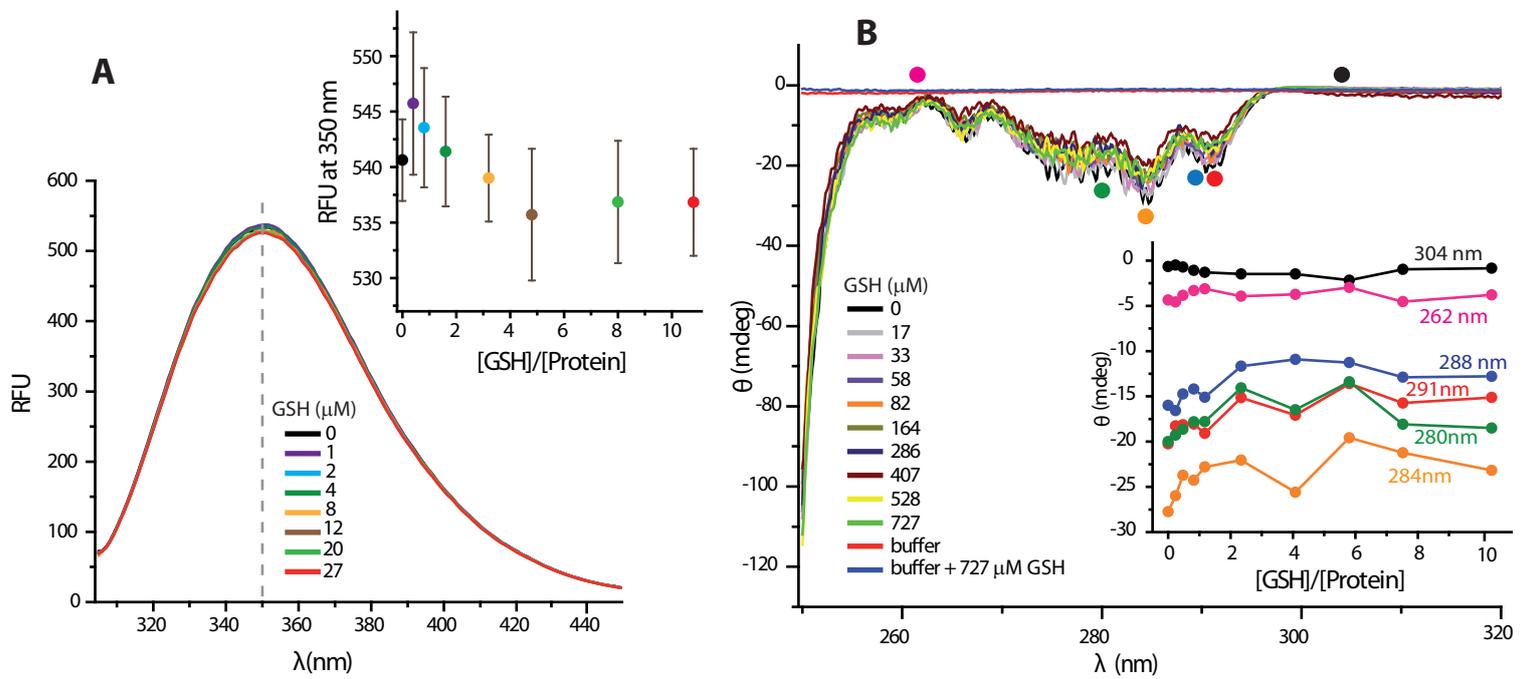
**A.** Superposición de las cinco estructuras de Grx consideradas en este capítulo, orientadas de manera de destacar el surco de unión a GSH (cuadrante celeste). Los residuos conservados comentados en el texto se indican en forma de palos. La posición de T144 en *Tb1-C-Grx1Δ76* se destaca con un sombreado gris. **B.** La ubicación de las moléculas de GSH presente en las estructuras de la forma holo de *HsGrx5* (PDB ID 2WUL, violeta) y las formas apo (PDB ID 2FLS, verde) y holo (PDB ID 2HT9, celeste) de *HsGrx2* se indican en palos sobre la estructura de *Tb1-C-Grx1Δ76* en forma de cintas (gris), en la misma orientación que A. El surco de unión a GSH (cuadrante celeste) se amplía a la derecha, indicándose los elementos de estructura secundaria que lo delimitan.

- *Tb1-C-Grx1/2LTK*
- apo-*AtGrxS14/3IPZ*
- holo-*HsGrx5/2WUL*
- apo-*HsGrx2/2FSL*
- holo-*HsGrx2/2HT9*



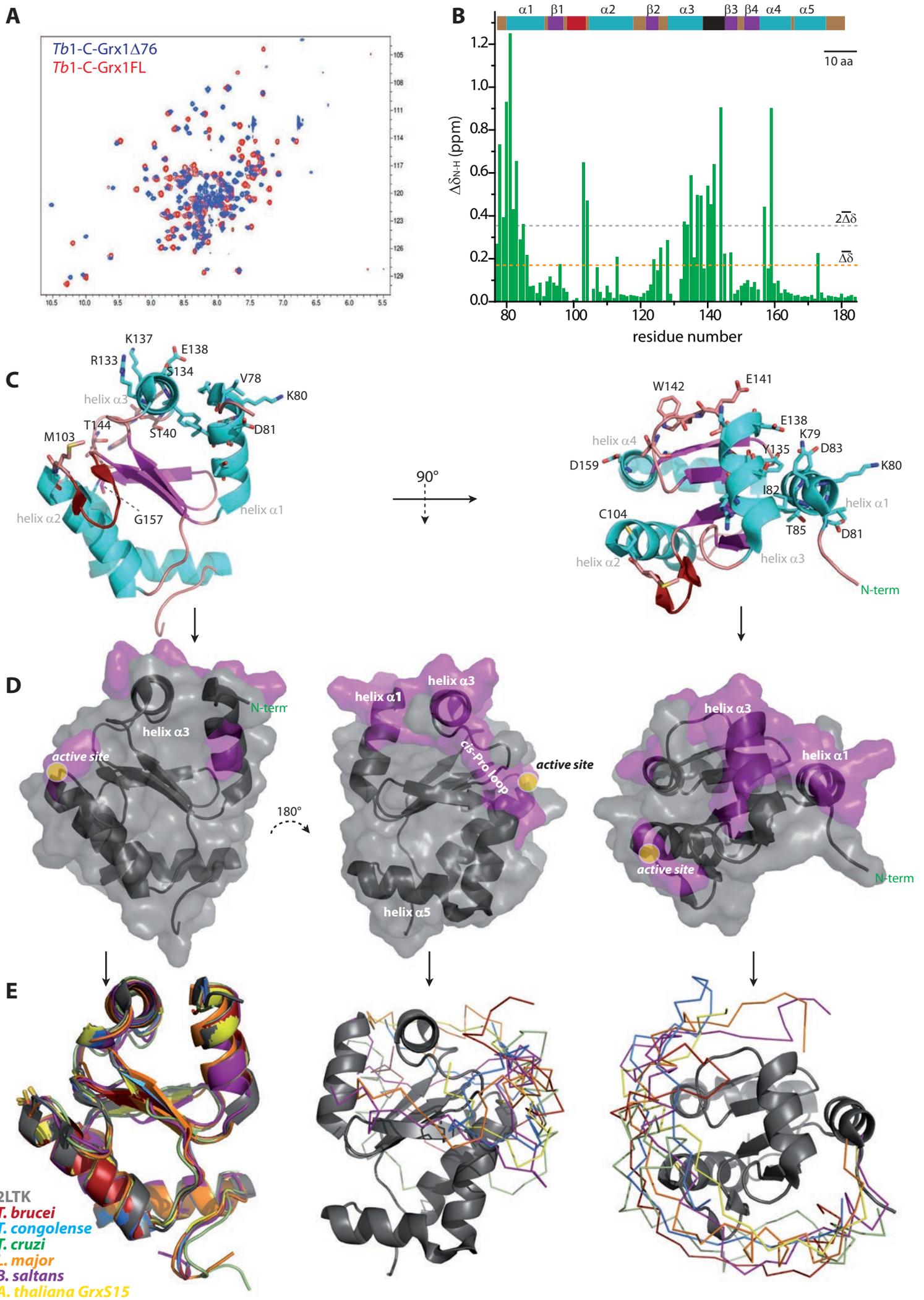
### Figura 5.11. Ensayos de unión no covalente de tioles de bajo peso molecular a *Tb1-C-Grx1 FL* y $\Delta 76$

**A.** Espectros de emisión corregidos por dilución ( $\lambda_{exc} = 295$  nm, promedio de  $n=3$ ) para la titulación de  $2.5 \mu\text{M}$  *Tb1-C-Grx1 FL WT* con GSH de  $0-27 \mu\text{M}$  en  $20$  mM Tris-HCl pH  $7.8$ . Cada concentración de GSH se representa con un color y en el inserto se indica el valor del máximo de emisión en RFU ("relative fluorescence units") en el centro de masa de cada espectro ( $\sim 350$  nm, línea de puntos gris) en función de la relación  $[\text{GSH}]/[\text{proteína}]$ , manteniendo el código de colores para cada concentración de GSH. **B.** En la figura se muestra la titulación de  $70 \mu\text{M}$  *Tb1-C-Grx1 WT FL* con GSH hasta  $727 \mu\text{M}$  en  $20$  mM fosfato de sodio pH  $7.4$  seguida mediante la determinación del espectro de CD en el ultravioleta cercano para cada punto ( $250-320$  nm, promedio de  $n=5$ ). En el inserto se grafica la elipticidad para cada relación  $[\text{GSH}]/[\text{proteína}]$  a las longitudes de onda etiquetadas, las cuales se indican con puntos del color correspondiente sobre la gráfica principal. **C.** Estructura de *Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$*  resaltando los mismos residuos que en la Figura 5.10.A y adicionalmente el W142 (rojo) en forma de palos. Se muestra la ubicación de una molécula de GSH proveniente de la estructura de la forma holo de *HsGrx5* (PDB ID 2WUL, violeta). **D.** Titulación de *Tb1-C-Grx1 $\Delta 76$*  con GSH (*izquierda*) o  $\text{T(SH)}_2$  (*derecha*) seguida por RMN. En cada figura se muestra la superposición de los espectros 2D de  $0.4$  mM proteína en fosfato de sodio  $50$  mM pH  $7.0$  con  $150$  mM NaCl y  $10$  mM DTT en  $90:10\%$  v/v  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  antes de la titulación (contornos rojos) y luego de la adición de un exceso molar de  $100$  y  $50$  veces de GSH o  $\text{T(SH)}_2$ , respectivamente (contornos azules). Los picos que derivan del GSH y  $\text{T(SH)}_2$  no marcado presente en altas concentraciones en el espectro se indican con flechas negras. **E.** Análogamente a **D**, se realizó la titulación de la forma madura de *Tb1-C-Grx1* usando  $0.3$  mM y  $0.2$  mM de proteína marcada para la titulación con GSH y  $\text{T(SH)}_2$ , respectivamente. En las gráficas se muestra la diferencia en el corrimiento químico ( $\Delta\delta$ ) de algunos residuos durante la titulación hasta excesos molares de tiol de  $\sim 100$  (ver texto). Las estructuras de debajo, son equivalentes a la mostrada en C, se indican la posición de estos residuos, marcados en rojo para los que se afectan por la unión de GSH (*izquierda*) y en azul por la unión de  $\text{T(SH)}_2$  (*derecha*).



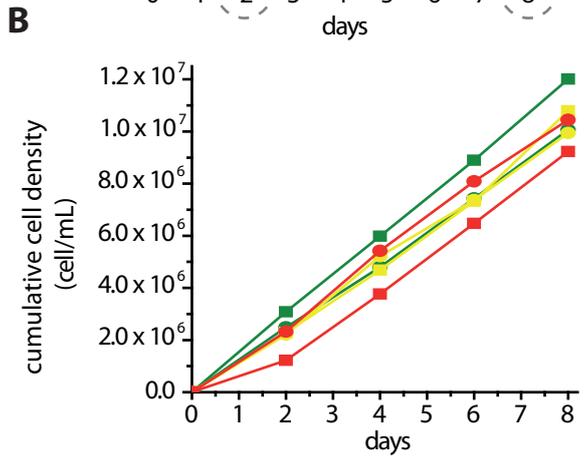
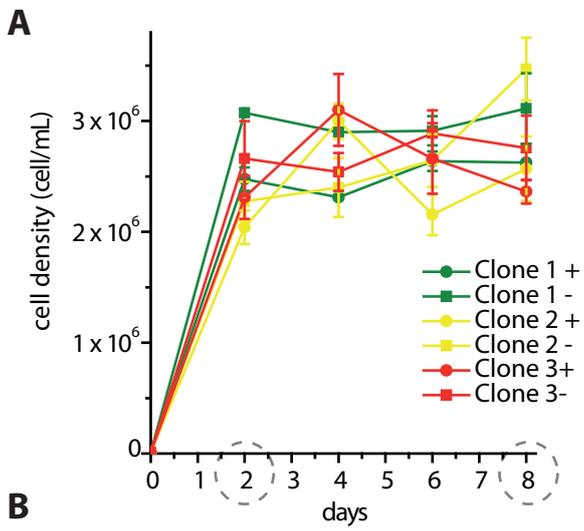
## Figura 5.12. Espectros de NMR de *Tb1-C-Grx1 FL* e interacción de la región NTE con el dominio globular

**A.** Espectros de  $^{15}\text{N}$ -HSQC *Tb1-C-Grx1 FL* (rojo) uniformemente marcada con  $^{15}\text{N}$  en comparación con el espectro para *Tb1C-Grx1 $\Delta$ 76* (azul), ambos registrados con 1 mM proteína a 900 MHz y 298 K en el mismo amortiguador. **B.** El desplazamiento en el corrimiento químico ( $\Delta\delta$ ) protón-nitrógeno (calculado según (Jensen et al., 2011)) entre el dominio Grx de la forma FL y la forma trunca se grafica en función de la posición en la cadena polipeptídica. En la parte superior de la gráfica se indican los elementos de estructura según la Figura 5.3, con el mismo código de colores, solo que en este caso el *cis-Pro loop* se indica en negro. La línea naranja punteada indica la posición del valor de  $\Delta\delta$  promedio para los 110 residuos considerados y la línea gris punteada el doble. **C.** Los residuos con  $\Delta\delta \geq 2x \Delta\delta$  promedio (línea gris en B) se indican en forma de palos sobre la estructura de *Tb1-C-Grx1FL*, indicada según el código de colores de las figuras anteriores. La figura de la derecha está rotada  $90^\circ$  sobre el eje horizontal respecto de la figura de la izquierda. **D.** Los mismos residuos de C se indican en violeta, mapeados sobre la superficie y estructura secundaria de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* (en gris). La orientación de las imágenes de la izquierda y derecha son la misma que las de la Figura C, mientras que la imagen central corresponde a la imagen de la derecha girada  $180^\circ$  sobre el eje vertical, para permitir la visualización de la otra cara de la proteína. La posición del sitio activo se indica en las tres imágenes con un punto amarillo. **E. Izquierda:** superposición de los dominios Grx de *Tb1-C-Grx1 $\Delta$ 76* (2LTK) y los modelos *in silico* generados para ella misma (*T. brucei*, rojo) y las proteínas de *T. congolense* (celeste), *T. cruzi* (verde), *L. major* (celeste), *B. saltans* (violeta) y *A. thaliana* GrxS15 (amarillo). *Centro y derecha:* disposición de las regiones NTE obtenidas de los modelos *in silico*, con el mismo código de colores mostrado a la izquierda, sobre la estructura 2LTK, en gris. La orientación de las tres imágenes es la misma que la de las figuras en C y D ubicadas en la misma posición de la Figura.

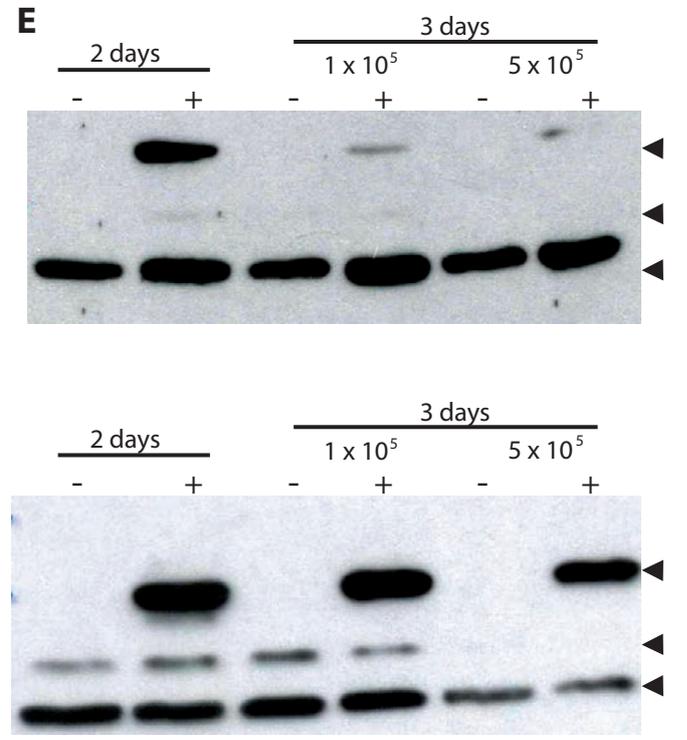
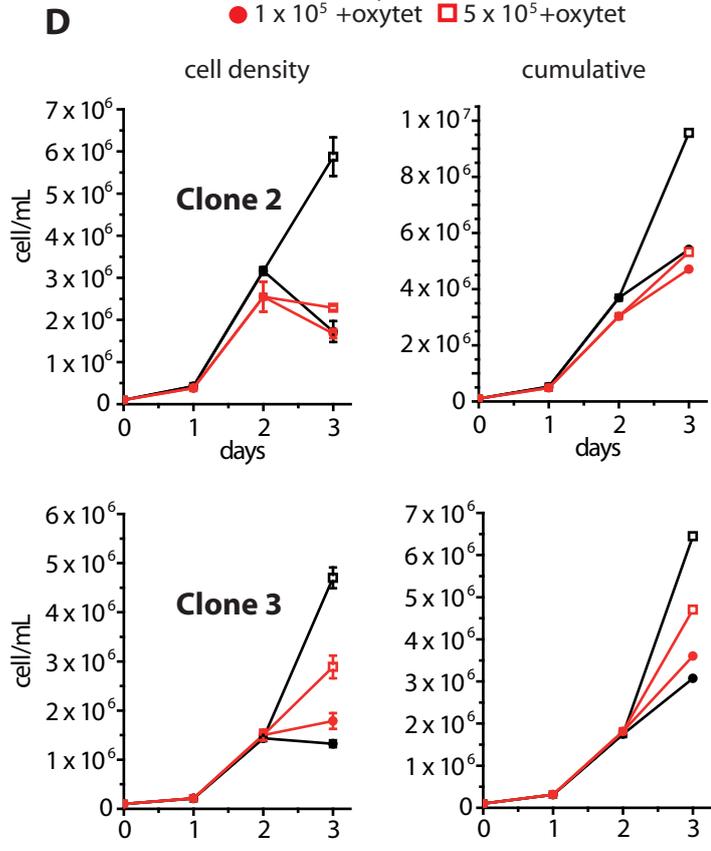
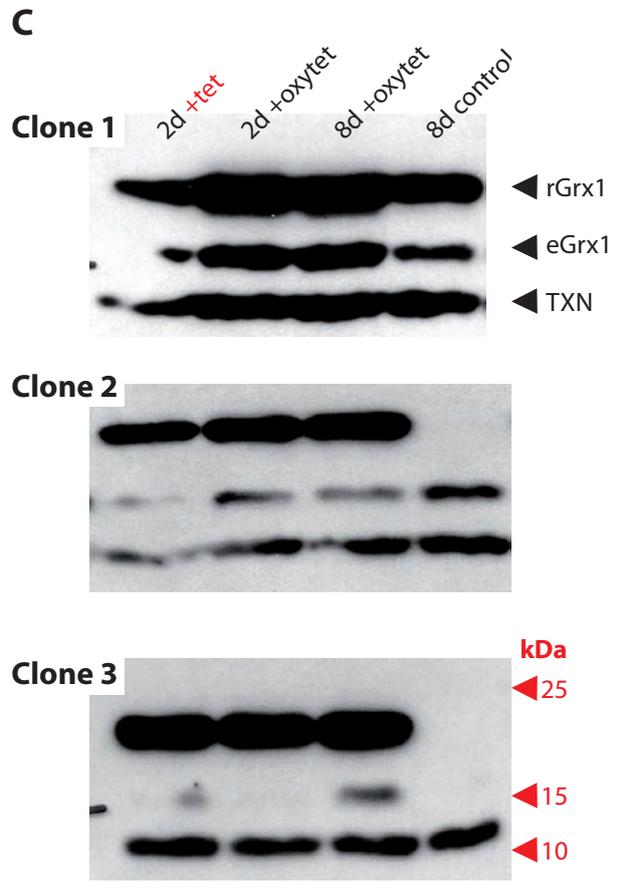


### Figura 6.1. Caracterización de línea transgénica TbC104S

**A-B.** En la figura se muestran las curvas de crecimiento de 3 clones sobreexpresantes de la copia ectópica de C104S (línea "TbC104S"), indicados en diferentes colores. Las células se sembraron a  $1 \times 10^4$  cel/mL en medio HMI-9 completo con FBS 10% con los antibióticos fleomicina 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , gentamicina 2.5  $\mu\text{g/mL}$  e higromicina 5  $\mu\text{g/mL}$ , en presencia (+, círculos) o ausencia (-, cuadrados) de oxytetraciclina 10  $\mu\text{g/mL}$  (curvas en A) o tetraciclina 1  $\mu\text{g/mL}$  (no mostrado). El antibiótico se repone diariamente a la misma concentración final. Estas condiciones de cultivo y reposición de antibiótico fueron las estándar usadas en este trabajo y no se detallarán en las próximas figuras. La densidad celular se determina por recuento manual cada 48 hrs y los cultivos se resiembran a la misma densidad inicial, manteniendo las condiciones de inducción cuando correspondiera. En **A** se muestra la densidad celular en cada recuento y en **B** la densidad celular acumulada. El resultado mostrado es el promedio de dos determinaciones independientes hechas en 2 réplicas biológicas ( $n=4$ ). **C.** La expresión de la copia ectópica en cada uno de los clones luego de 2 días de inducción por tetraciclina ("2d tet") u oxytetraciclina ("2 d oxytet") así como luego de 8 días de cultivo en presencia de oxytetraciclina ("8d oxytet") se analizó por SDS-PAGE en gel al 15 % y WB (anticuerpos primarios:  $\alpha$ -Grx1 1/500 y  $\alpha$ -TXN 1/5000). Las muestras corresponden a los días de recuento indicados en A con círculos de línea gris punteada. Como control se muestra el cultivo no inducido mantenido en iguales condiciones durante 8 días. Para el caso del clon 1 se sembraron  $8 \times 10^6$  parásitos por carril y para los clones 2 y 3 se sembraron  $6 \times 10^6$  parásitos por carril. Las flechas negras indican la posición de las proteínas identificadas como la copia ectópica recombinante sobreexpresada (rGrx1), la 1-C-Grx1 endógena (eGrx1) y la triparredoxina usada como control de carga (TXN). Este criterio se conserva en las figuras subsiguientes. Las flechas rojas indican la posición de MWM, no mostrados en el WB. **C-D.** Curvas de crecimiento (*izquierda*) y densidad celulares acumuladas (*derecha*) de los clones 2 y 3 de TbC104S sembrados a  $1 \times 10^5$  cel/mL en medio con (+, símbolos rojos) o sin (-, símbolos negros) el agregado de oxytetraciclina 10  $\mu\text{g/mL}$ . La densidad celular se determina por recuento manual a las 24 y 48 hrs. A las 48 hrs se procedió a la resiembra de las líneas a  $1 \times 10^5$  cel/mL (círculos) o  $5 \times 10^5$  cel/mL (cuadrados) manteniendo las condiciones de inducción cuando correspondiera y los cultivos fueron cuantificados y cosechados 24 hrs después. El resultado mostrado es el promedio de 2 réplicas biológicas cuantificadas 2 veces cada una de manera independiente. **E.** La expresión de la copia ectópica fue analizadas por SDS-PAGE en gel al 15 % y WB (anticuerpos primarios:  $\alpha$ -Grx1 1/500 y  $\alpha$ -TXN 1/5000) a las 48 y 72 hrs sembrando  $5 \times 10^5$  parásitos por carril. Parte de estos resultados fueron publicados en (Manta et al., 2013a).

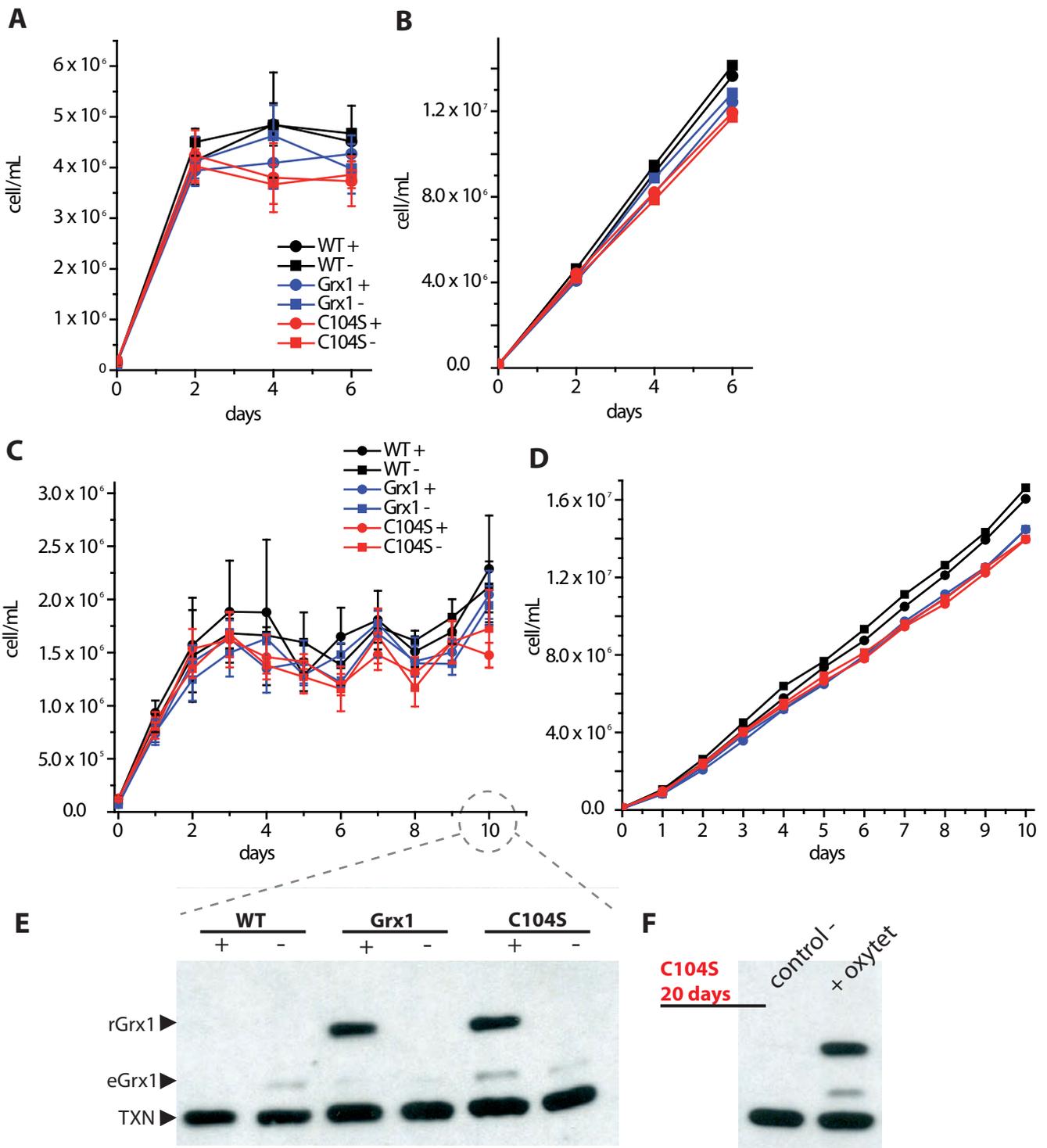


●  $1 \times 10^5$  - oxytet    □  $5 \times 10^5$  - oxytet  
 ●  $1 \times 10^5$  + oxytet    □  $5 \times 10^5$  + oxytet



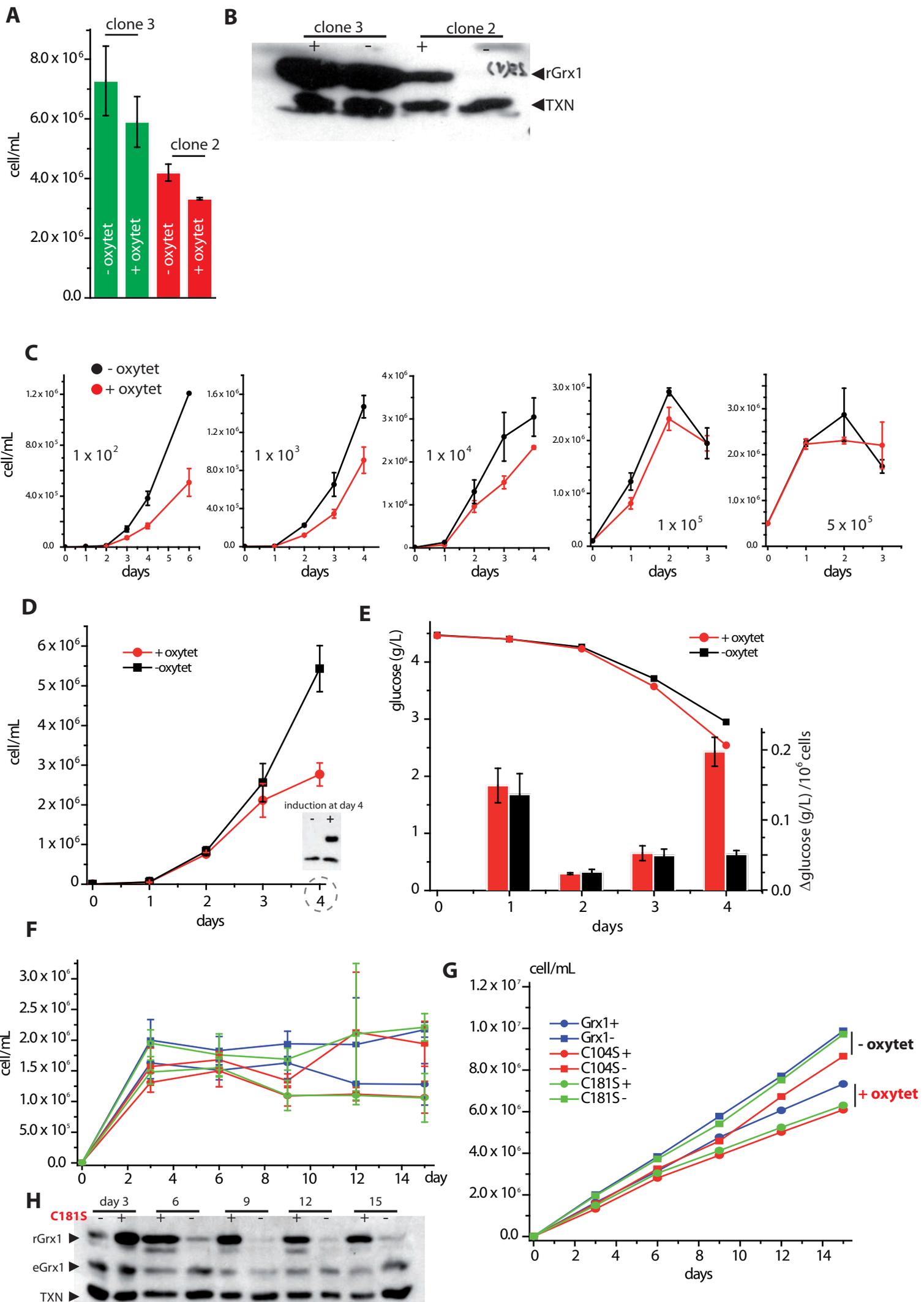
## Figura 6.2. Comparación de la línea transgénica TbC104 con TbGrx1 y la línea parental

En **A** y **C** se muestra el recuento y en **B** y **D** la densidad celular acumulada de curvas de crecimiento de línea parental *T. brucei* 514-1313 (TbWT) y las líneas transgénicas TbGrx1 (Comini et al., 2008) y TbC104 (clon 3 en Figura 6.1), en presencia (círculos) o ausencia (cuadrados) de 10  $\mu$ /mL de oxytetraciclina. Las células fueron sembradas a  $1 \times 10^5$  cel/mL en medio completo con antibióticos, contadas cada 48 hrs (**A-B**) o 24 hrs (**C-D**) y resembradas a la misma densidad inicial. Los resultados son el promedio de 2 réplicas biológicas cuantificadas 2 veces cada una de manera independiente. **E**. WB de la inducción de las 3 líneas al día 10 (indicado en **C**), sembrando  $2.5 \times 10^6$  células por carril. En **F** se muestra el WB de la inducción de la copia ectópica en la línea TbC104S luego de 20 días de cultivo en presencia o ausencia de oxytetraciclina. Estos cultivos se mantuvieron en un régimen de repique y resiembra a  $1 \times 10^5$  cel/mL cada 48 hrs, en presencia o ausencia de oxytetraciclina (no mostrado). En ambos casos los lisados celulares fueron resueltos en SDS-PAGE al 15% y revelados con  $\alpha$ -Grx1 1/500 y  $\alpha$ -TXN 1/5000. Parte de los resultados presentados en esta figura fueron publicados en (Manta et al., 2013a).



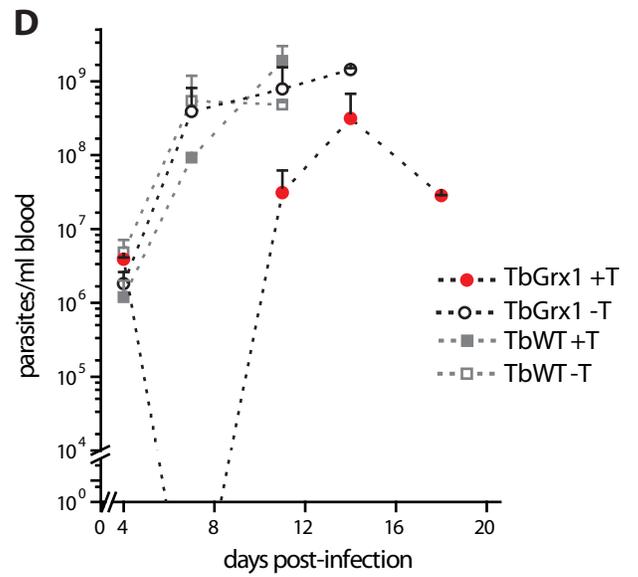
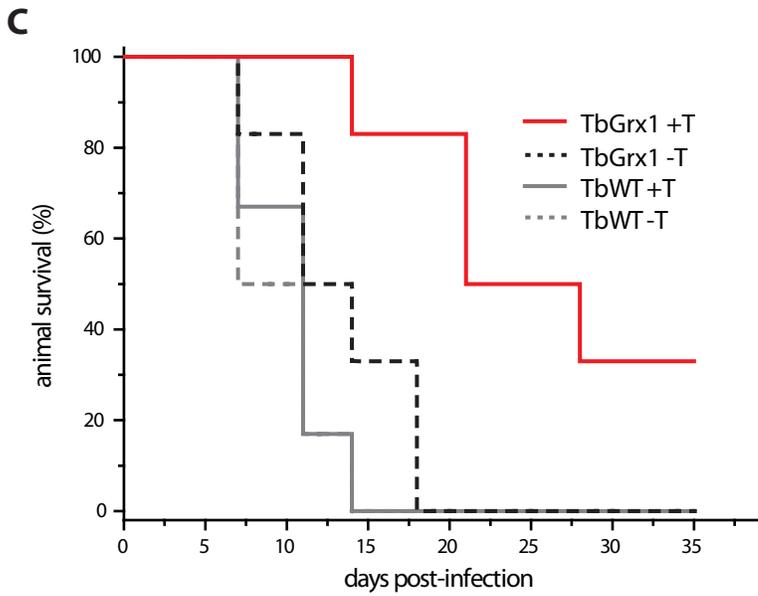
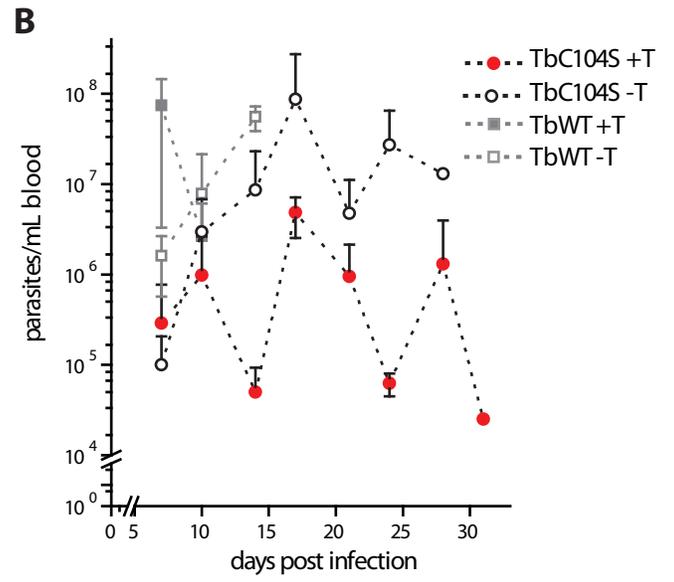
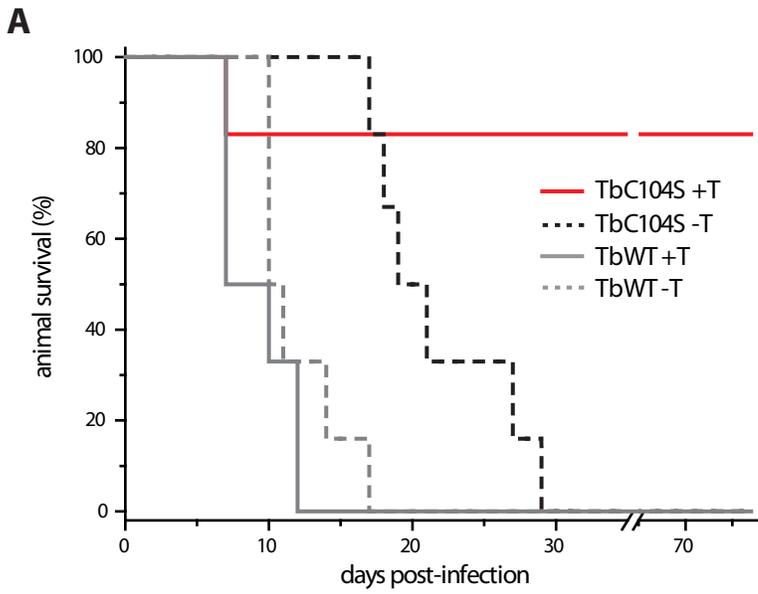
### Figura 6.3. Caracterización de línea transgénica TbC181S

Las células de la línea TbC181S (clones 2 y 3) fueron inoculadas a  $1 \times 10^5$  cel/mL en medio con (+) o sin (-) el agregado de 10 µg/mL de oxytetraciclina y crecidas durante 48 hrs. Cumplido este tiempo la densidad celular fue ensayada por recuento manual (**A**) y WB (**B**) sembrando  $8.3 \times 10^6$  células por carril en SDS-PAGE al 12% de entrecruzamiento y revelando el WB con  $\alpha$ -Grx1 1/500 y  $\alpha$ -TXN 1/5000. Los marcadores indican la posición de la copia ectópica de Tb1-C-Grx1 (rGrx) y el control de carga (TXN). **C**. Células de la línea TbC181S (clon 2) fueron inoculadas a diferentes densidades iniciales (indicada en la figura) en medio completo en presencia (rojo) o ausencia (negro) de 10 µg/mL de tetraciclina y crecidas en cultivo continuo. La densidad celular fue determinada por recuento manual en base diaria mientras el cultivo no presentara síntomas de avejentamiento. **D-E**. Células de la línea TbC181S (clon 2) fueron sembradas a  $5 \times 10^3$  cel/mL en medio HMI-9 completo en presencia (+, símbolos rojos) o ausencia (-, símbolos negros) de oxytetraciclina 10 µg/mL. La densidad celular (**D**) y la concentración de glucosa en el medio (**E**) se determinaron diariamente por recuento manual y métodos electroquímicos, respectivamente, como se detalla en Materiales y Métodos. El WB inserto en D muestra la expresión de la copia ectópica al día 4 post-inducción y la gráfica de barras insertada en la parte E muestra la tasa diferencial de consumo por cada  $10^6$  células para períodos de 24 hrs. **F-H**. La línea transgénica TbC181S (clon 2) fue comparado TbC104S (clon 3, Figura 6.1) y la línea TbGrx1 (Comini et al., 2008) en idénticas condiciones de cultivo. Se inocularon  $5 \times 10^3$  células de cada líneas en medio con (círculos) o sin (cuadrados) el agregado de 10 µg/mL de oxytetraciclina y crecidas en cultivo continuo. La densidad celular fue determinada por recuento manual cada 72 hrs y las células resembradas a la densidad inicial. El resultado mostrado es el promedio de 2 réplicas biológicas cuantificadas 2 veces cada una de manera independiente. En **F** se muestra la densidad celular y en **G** la densidad celular acumulada. **H**. WB de la inducción de la copia ectópica de C181S durante los días de recuento mostrados en F. Se sembraron  $4 \times 10^6$  parásitos por carril en SDS-PAGE al 15% y el WB se reveló como se indica más arriba.



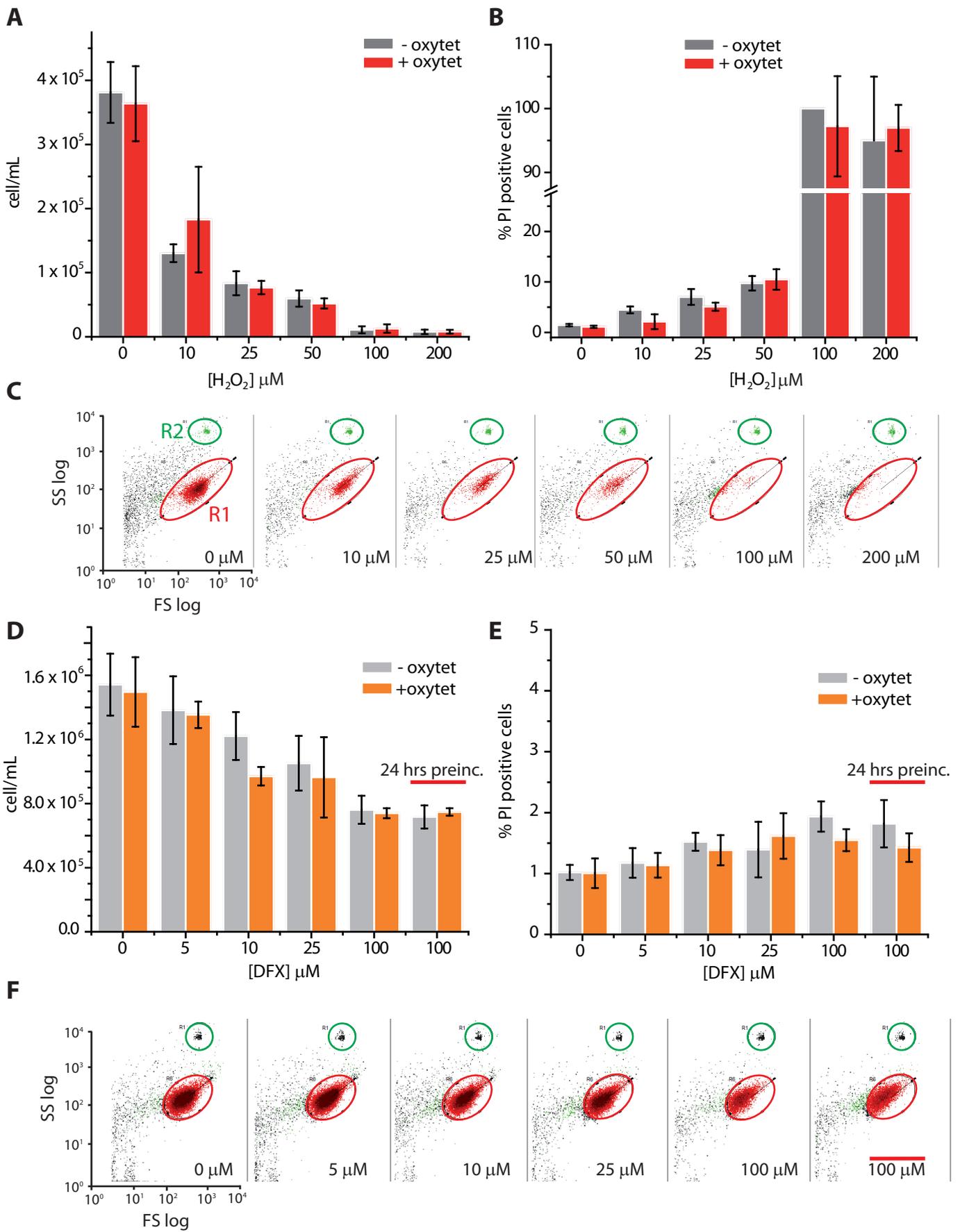
**Figura 6.4. Sobrevida y análisis de parasitemia en ratones infectados con la línea parental y las líneas transgénicas TbGrx1 y TbC104S**

Grupos de 6 ratones hembras de la cepa BALBc/J de 6-8 semanas de edad fueron infectados intraperitonealmente con  $10^4$  parásitos de la línea parental (*T. brucei* 514-1313, TbWT) o las líneas transgénicas TbC104S (**A-B**) o TbGrx1 (**C-D**). Cada experimento contó con 4 grupos de ratones mantenidos en idénticas condiciones con la única diferencia de que dos de ellos recibieron agua con 1 mg/mL de oxytet desde el día 3 previo a la infección (+T). La sobrevida fue monitoreada diariamente y los resultados se muestran como curvas de sobrevida Kaplan-Meier en base porcentual (A y C). Los niveles de parasitemia (B y D) fueron monitoreados regularmente por recuento manual de parásitos por microscopía y se indican en parásitos/mL de sangre. Estos resultados fueron publicados en (Manta et al., 2013a).



### Figura 6.5. Efecto del tratamiento con quelantes y oxidantes en el desarrollo de la línea transgénica TbC104S

Las células de la línea TbC104S fueron sembradas a  $1 \times 10^5$  o  $5 \times 10^5$  cel/mL en medio HMI-9 en las condiciones indicadas anteriormente y crecidas durante 24 hrs en ausencia o presencia de 10  $\mu\text{g/mL}$  de oxytetraciclina. Cumplido este tiempo las células sembradas a  $1 \times 10^5$  cel/mL fueron tratadas con diferentes concentraciones finales de deferoxamina (0, 5, 10, 25 y 100  $\mu\text{M}$ ) y las sembradas a  $5 \times 10^5$  cel/mL fueron tratadas con diferentes concentraciones finales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0, 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) en un volumen total de 1 mL, conservando las condiciones de inducción en los cultivos preinducidos. La densidad celular fue determinada 24 hrs después por citometría de flujo con perlas fluorescentes como se describe en Materiales y Métodos, agregando ioduro de propidio (PI) inmediatamente antes de su análisis para determinar la viabilidad celular. A modo de control, todos los pocillos fueron analizados por inspección por microscopía previamente a su cuantificación y la densidad celular en un punto de cada experimento fue determinada por recuento manual (no mostrado). **A.** Densidad celular luego del tratamiento por 24 hrs con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y **B** células positivas para PI en cada condición (promedios de  $n=8$ ). **C.** Resultados representativos para cada una de las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indicadas en **A.** Las gráficas muestran la distribución de la población celular analizada en función de su tamaño (eje X, FS log) y granularidad (eje Y, SS log), así como las regiones seleccionadas para el recuento de eventos correspondientes a células viables (R1) y perlas fluorescentes (R2, 200 eventos). Las células PI positivas se contaron en el canal de fluorescencia correspondiente (no mostrado). **D.** Densidad celular luego del tratamiento por 24 hrs con DFX y **E** células positivas para PI en cada condición (promedio de  $n=8$ ). Para los experimentos de DFX se usó también una muestra de suero fetal bovino tratado 24 hrs con DFX 1 mM a  $37^\circ\text{C}$  en estufa la cual se usó para generar medio completo con suero "pretratado" al 10% determinando una concentración final de DFX de 100  $\mu\text{M}$  final (barra roja). **F.** *idem C.*



### **Figura 6.6. Localización subcelular de 1-C-Grx2 y caracterización fenotípica de la línea transgénica TbGrx2**

**A.** Localización subcelular de 1-C-Grx2 en la forma infectiva para el mamífero (BSF) y procíclica (PCF). Las imágenes de inmunofluorescencia corresponden a células transgénicas generadas por transfección con el vector pHD1700-Tb1-C-Grx2-c-myc y seleccionadas por higromicina y crecidas según se detalla previamente (Comini et al., 2008). La inducción de la copia ectópica se realizó tratando las células durante 48 hrs con 1 µg/mL (BSF) o 10 µg/mL (PCF) de tetraciclina en el medio. Cumplido este tiempo las células fueron cosechadas y preparadas para inmunofluorescencia como se indica en la sección Materiales y Métodos. En los diferentes paneles se muestra la imagen de las células BSF (arriba) o PCF (abajo) en contraste de fase y revelando diferentes marcadores. El anticuerpo monoclonal en ratón contra *c-myc* (clon 9E10, Roche, dilución 1/450) reconoce la etiqueta de afinidad presente en la copia recombinante de 1-C-Grx2, mientras que el Mitotracker™ se concentra en la mitocondria y el DAPI tiñe ácidos nucleicos. La imagen de la derecha en cada columna muestra la superposición de los cuatro paneles previos. Se realizaron controles de localización mitocondrial usando  $\alpha$ -lipoamida deshidrogenasa (preparado en conejo, (Roldán et al., 2011)) o anticuerpos específicos contra 1-C-Grx2 realizados en cobayo (no mostrado). Los anticuerpos secundarios usados fueron  $\alpha$ -cobayo-Alexa 488,  $\alpha$ -ratón-Alexa 594 y  $\alpha$ -conejo-Alexa 594, todos a una dilución 1/250. **B.** Células de la línea parental (TbWT) y TbGrx2 (clones 1-3) fueron inoculadas a  $1 \times 10^4$  cel/mL en medio HMI-9 completo en presencia (rojo) o ausencia (negro) de 1 µg/mL de tetraciclina y crecidas en cultivo continuo. La densidad celular fue ensayada en base diaria por recuento manual. Los resultados son el promedio de dos determinaciones realizadas sobre un único experimento sin réplica biológica.



**Figura 7.1. Biogénesis de centros ferrosulfurados en la forma sanguínea de *T. brucei* y ubicación de Tb1-C-Grx1 en esta ruta biosintética.**

En la figura se representa una propuesta de estructura del metabolismo de centros ferrosulfurados a nivel mitocondria (maquinaria ISC) y citosolico (maquinaria CIA) en la forma sanguínea de *T. brucei* realizada en base a la información disponible en la literatura y a los resultados obtenidos en este trabajo. Todas las proteínas indicadas en colores de la gama del rojo han sido demostradas experimentalmente como esenciales para la forma infectiva de *T. brucei*, mientras que para las proteínas indicadas no se posee aún información experimental. En verde se indica *Tb1-C-Grx1* en la maquinaria ISC y *Tb1-C-Grx3* en la maquinaria CIA. En azul se indica proteínas que representan aceptores finales de los centros ferrosulfurados. La figura se elaboró en base a las Figuras 1.7 y 1.9 presentadas anteriormente y a las referencias correspondientes presentadas en el Capítulo 1 (sección 1.2.6). Los datos respecto a la maquinaria CIA fueron gentilmente aportados por el Dr. J. Lukes (comunicación personal).

