

Diversidad funcional de la unidad de plegamiento tiorredoxina en platelmintos

Lic. Hugo Bisio

Tesis de maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Orientador: Dr. Gustavo Salinas - Co-orientadora: Dra. Mariana Bonilla

Laboratorio de Biología de gusanos

Instituto Pasteur Montevideo

Agosto de 2015

Tabla de contenido

Resumen	4
1 Introducción	6
<u>1.1 Echinococcus granulosus: generalidades, ciclo de vida y patología asociada</u>	7
<u>1.2 Sistemas Tiorredoxina y Glutación</u>	9
1.2.1 <u>GSH y el sistema del GSH</u>	10
1.2.2 <u>Sistema de la Trx</u>	14
1.2.3 <u>Sistemas ligados</u>	15
<u>1.3 Unidad de plegamiento Trx</u>	18
1.3.1 <u>Trxs</u>	19
1.3.2 <u>Grxs</u>	21
1.3.2.1 <u>Trxs y Grxs en gusanos chatos</u>	24
<u>1.4 Centros ferrosulfurados</u>	26
1.4.1 <u>Función, naturaleza y proteínas ferrosulfuradas</u>	26
1.4.2 <u>Síntesis</u>	28
1.4.2.1 <u>Síntesis de Fe/S mitocondrial</u>	29
1.4.2.2 <u>Síntesis de Fe/S citosólico y nuclear</u>	31
2 Justificación y Objetivos	34
<u>2.1 Justificación</u>	35
<u>2.2 Objetivo general</u>	35
<u>2.3 Objetivos específicos</u>	36
3 Resultados	37
<u>3.1 Adentrándonos en los sistemas ligados de la tiorredoxina y del glutación: tiorredoxinas y glutarredoxinas monodominio</u>	38
3.1.1 <u>Análisis filogenético y de expresión de Trxs en platelmintos parásitos.</u>	38
3.1.2 <u>Las Trxs de E. granulosus son redox activas y poseen blancos solapantes y diferenciales.</u>	40
3.1.3 <u>Análisis filogenético y de expresión de Grxs en platelmintos parásitos.</u>	43
3.1.4 <u>Las Grxs monodominio de clase I son capaces de deglutationilar y reciben electrones tanto del GSH como de los dominios TR de la TGR.</u>	46
3.1.5 <u>Discusión y Perspectivas.</u>	48
3.1.6 <u>Materiales y Métodos.</u>	53

<u>3.2 Ajustes de la unidad de plegamiento tiorredoxina en platelmintos parásitos: nuevas formas de unir centros ferrosulfurados</u>	56
3.2.1 <u>Una nueva clase de proteína relacionada a la tiorredoxina es capaz de unir centros ferrosulfurados.</u>	56
3.2.1.1 <u>Proceso de revisión</u>	57
3.2.2 <u>La Grx5 es capaz de coordinar Fe/S de manera GSH-independiente.</u>	64
4 Discusión general y Perspectivas	67
4.1 <u>¿Podrá ser la IsTRP un nuevo blanco farmacológico?</u>	69
4.2 <u>¿Cómo acercarnos a dilucidar la función de IsTRP?</u>	74
4.3 <u>¿Qué sucede con el GSH en platelmintos parásitos? ¿Por qué acumular adaptaciones para independizar procesos del uso de GSH?</u>	72
5 Bibliografía	78
Agradecimientos	85

Resumen

Los platelmintos parásitos son un problema de salud global tanto en el área médica como veterinaria, afectando fundamentalmente a poblaciones de nivel socioeconómico bajo y generando importantes pérdidas económicas. En particular, un subgrupo de estos parásitos es responsable de cuatro de las diecisiete enfermedades tropicales desatendidas priorizadas por la Organización Mundial de la Salud y, como el nombre de este grupo anticipa, se dispone de muy pocas drogas efectivas. La tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), única responsable en estos parásitos de proveer los equivalentes de reducción a las vías de la tiorredoxina (Trx) y del glutatión (GSH: forma reducida, GSSG: forma oxidada), ha sido validada como un blanco promisorio para la generación de drogas destinadas al tratamiento de virtualmente todas las infecciones causadas por platelmintos parásitos. En este trabajo, se planteó realizar un estudio genérico sobre los blancos proteicos canónicos de la TGR, es decir: Trxs y glutarredoxinas (Grxs), usando a *Echinococcus granulosus* como parásito modelo. Se caracterizó la actividad reductora de disulfuros proteicos de Trxs y se comenzó con la identificación de blancos de tres de las Trxs codificadas en el genoma de *Echinococcus granulosus* (parásito modelo que hemos utilizado para este estudio), observándose tanto blancos diferenciales como solapantes. Además, se identificó que las Grxs de clase I de estos parásitos poseen actividad deglutationilasa y pueden ser reducidas por la TGR directa o indirectamente.

Cabe destacar que el descubrimiento más interesante en esta tesis fue la identificación y caracterización bioquímica de una nueva clase de proteínas relacionadas a la Trx (IsTRP), presente en algunos de estos parásitos y ausente en cualquier otro linaje, la cual representa un potencial nuevo sitio de quiebre en la biología de estos gusanos. Este nuevo tipo de proteína es único en su clase al unir centros ferrosulfurados (Fe/S) y especulamos acerca de la posibilidad de un rol en la protección y almacenamiento de dicho cofactor durante la infección. A su vez, este hallazgo condujo a relizar los primeros avances en el estudio de la biogénesis de Fe/S en estos parásitos, involucrando el minado de genes asociados la biosíntesis y la demostración experimental de la función de Grx5 en el transporte de dichos cofactores, a pesar de poseer una inserción linaje específica en un sitio poco común de la unidad de plegamiento.

En suma, el trabajo presentado aquí permitió un mayor entendimiento de la homeostasis redox y del hierro de estos organismos y en particular de la vía que involucra a uno de los blancos más promisorios al momento para el desarrollo de nuevas drogas destinadas al tratamiento de las infecciones causadas por estos parásitos. Desde un punto de vista básico, los resultados aquí

presentados aportan nuevos conocimientos que contribuyan a entender, a nivel molecular, la diversidad funcional asociada a la unidad de plegamiento Trx.

Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*: generalidades, ciclo de vida y patología asociada

Echinococcus granulosus es un platelminto parásito, del grupo de los cestodos, cuyo ciclo de vida incluye a cánidos como hospederos definitivos, y a herbívoros tales como ovinos, bovinos y porcinos, y accidentalmente al hombre, como hospederos intermediarios. Su distribución geográfica es prácticamente global, más frecuentemente ubicada en zonas rurales donde el pastoralismo es el medio de vida, y se estima que más de 1 millón de personas estarían infectadas [1-2]. A nivel mundial, se calcula una pérdida total aproximada de US\$ 200 millones al año debida exclusivamente a la infección por *E. granulosus* en humanos y US\$ 3.000 millones si se considera además la industria ganadera [2]. En Uruguay la hidatidosis es una de las infecciones por platelmintos más importantes para el área médica y veterinaria, produciendo importantes pérdidas económicas.

El ciclo de este parásito puede observarse de forma esquemática en la (Fig. 1.1 A). El adulto de *E. granulosus* mide entre 3 y 6 mm de largo y anatómicamente puede dividirse en tres regiones: el escólex (armado con ventosas y ganchos), el cuello y la estróbila (compuesta por tres proglótides) (Fig 1.1 B). Éste reside en el intestino delgado de sus hospederos definitivos y desprende proglótides grávidos, las cuales liberan los huevos al exterior con las heces. Una vez ingeridos por el hospedero intermediario los huevos eclosionan en el intestino delgado y liberan las oncosferas, que penetran la mucosa intestinal y migran vía sistema circulatorio a otros órganos, fundamentalmente hígado y pulmón, en donde la oncosfera se desarrolla, por reproducción asexual, a quiste (Fig 1.1 C). El quiste aumenta su tamaño gradualmente, produciendo protoescólex o gusanos larvarios que permanecen en el interior del mismo. El ciclo se completa cuando el hospedero definitivo es infectado tras ingerir el quiste contenido en órganos del hospedero intermediario. Luego de la ingestión, el protoescólex se activa y adhiere a la mucosa intestinal, desarrollándose a la etapa adulta en un período de 32 a 80 días; alcanzada la madurez, el gusano puede vivir por períodos prolongados en el intestino del hospedero [3].

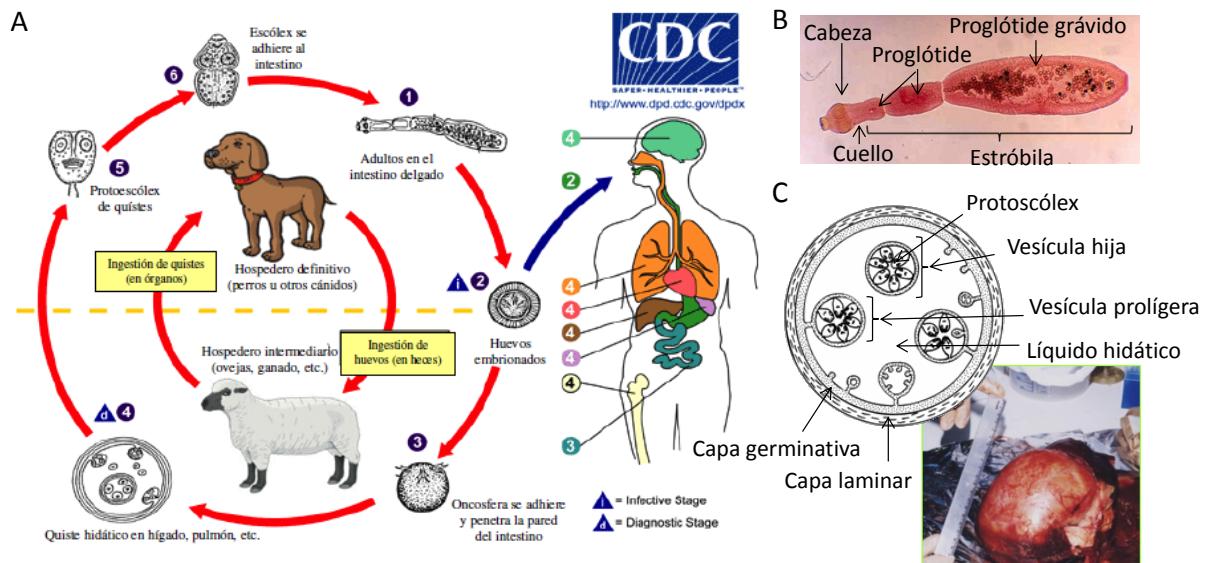


Figura 1.1 Biología y ciclo de vida del platelminto parásito *E. granulosus*. A. Ciclo de vida de *E. granulosus*. El adulto sobrevive en el intestino de cánidos (hospederos definitivos) y libera huevos (1). Los huevos son eliminados por las heces (2), y luego de ser ingeridos por el hospedero intermediario, las oncosferas se liberan en el intestino (3) y enquistan en otros órganos (4). Una vez que el hospedero definitivo ingiere tejido infectado, los protoescólex contenidos en quistes evaginan (5), se adhieren a la mucosa del intestino y desarrollan a adultos (1), donde el ciclo comienza nuevamente. Imagen adaptada de la web de Centers for Disease Control and Prevention (EEUU) disponible en <http://www.dpd.cdc.gov>. B. Gusano adulto. Imagen al microscopio óptico del gusano adulto teñido con hematoxilina-eosina. El gusano adulto mide entre 3 y 6 mm de longitud. Posee un escólex o cabeza con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos. La estróbila posee tres proglótides, siendo la última grávida y conteniendo entre 500 y 800 huevos. C. Metacestodo. El quiste hidático se encuentra rodeado por pared quística, compuesta por la capa laminar (exterior) y la capa germinativa (interior). La capa germinativa produce los protoescólices y el líquido hidático hacia el interior. En la esquina inferior derecha se muestra una imagen de un quiste extirpado de un vacuno.

En humanos los quistes se desarrollan más frecuentemente en el hígado (50-80%) y el pulmón (5-30%) [4-5], aunque también han sido detectados en otros órganos tales como bazo, riñón, corazón, músculos y cerebro [5]. La infección puede permanecer asintomática durante años hasta que el crecimiento del quiste produce opresión y disfuncionalidad de los órganos. La ruptura mecánica del quiste, que contiene líquido hidático y protoescólex, puede generar fiebre, urticaria, eosinofilia y una respuesta inflamatoria sistémica, conocida como choque anafiláctico, que puede llevar a la muerte del individuo [6].

El consenso para el tratamiento de la hidatidosis involucra cuatro opciones [7]: 1) cirugía, 2) esterilización percutánea, 3) tratamiento con drogas o 4) "observar y esperar".

1) La cirugía es el tratamiento clásico pero, a pesar de ser curativo, no previene de la recurrencia. La cirugía es la opción para quistes grandes o infectados, quistes proclives a romperse o para aquellos quistes alojados en órganos de importancia. 2 % de los pacientes mueren después de la operación.

2) Este procedimiento involucra la punción, aspiración, inyección y reaspiración. Esto destruye la capa germinal del quiste y permite evacuar *a posteriori* el quiste con mayor seguridad. La inyección suele contener soluciones 20% de cloruro de sodio o 95% etanol como sustancia protoscolicida y es reaspirada luego de 15-20 min. La anafilaxis es un riesgo y suele coadministrarse benzimidazol para evitar la aparición de quistes secundarios.

3) Los benzimidazoles son generalmente las drogas más efectivas. El albendazol es una droga de este grupo y actúa sobre las formas larvarias y adultas alterando la polimerización de tubulina [8-10]; induciendo el bloqueo de la absorción de glucosa y provocando alteraciones degenerativas en el retículo endoplasmático y mitocondria de la capa germinal, aumentando la actividad lisosomal y provocando la autofagia [11]. La eficacia del tratamiento es variable, no es efectivo contra quistes grandes (mayores a 10 cm) y no debe usarse durante el comienzo del embarazo o con quistes propensos a romperse. El praziquantel es otra droga antihelmíntica que provoca el aumento de la permeabilidad de la membrana celular del parásito al calcio, provocando parálisis espástica (mediante un mecanismo desconocido). Dicha droga se utiliza para el tratamiento del hospedero definitivo mientras que en el hombre sólo se utiliza para el tratamiento de hidatidosis en combinación con el albendazol o en casos de toxicidad por albendazol [12].

4) Aquellos quistes sin complicaciones (particularmente aquellos calcificados) pueden dejarse sin tratar y monitorearse por ultrasonido ya que no comprometen la función del órgano.

1.2 Sistemas Tiorredoxina y Glutación

En la mayoría de los organismos vivos, incluyendo los hospederos mamíferos de los platelmintos parásitos, la síntesis de desoxirribonucleótidos, las defensas antioxidantes, la homeostasis y el control redox están sustentados por dos vías metabólicas dependientes de tioles: los sistemas del glutación (GSH) y de la tiorredoxina (Trx), tripéptido y proteína de bajo peso molecular, respectivamente, que contienen tioles. Estas vías funcionan de manera independiente pero relacionada y poseen blancos y funciones solapantes y diferenciales [13]. El NADPH abastece de equivalentes de reducción a ambos sistemas vía piridín-nucleótido tiol-disulfuro óxidorreductasas, las cuales transfieren los electrones a proteínas/moléculas con un mayor potencial redox a través de óxidorreducciones reversibles de tioles [14].

Las enzimas centrales de estas vías son las flavoenzimas tiorredoxina reductasa (TR) y glutatión reductasa (GR) que oxidan el NADPH y reducen las formas oxidadas de la Trx y del GSH (GSSG, dímero en el que dos moléculas de GSH están unidas por un enlace disulfuro), respectivamente [15-17]. La representación esquemática del flujo de electrones para ambas vías se muestra en la Fig. 1.2.

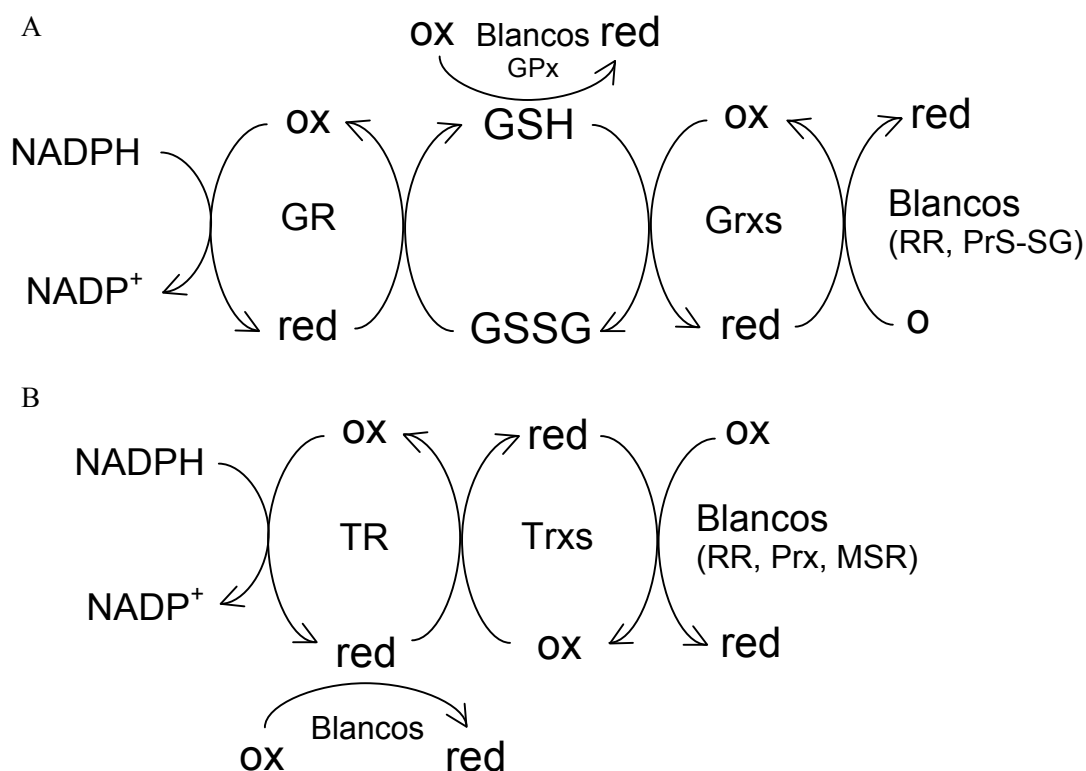


Figura 1.2. Sistemas canónicos del GSH y la Trx. Aquí se observa el flujo de electrones desde el NADPH hasta los blancos de las respectivas vías. De izquierda a derecha aumenta el potencial redox de cada par, es decir la afinidad por los electrones de la forma oxidada del par redox. Como se verá más adelante en el texto, estas vías se ven modificadas en platelmintos parásitos. RR: ribonucleótido reductasa, Prx: peroxirredoxina, MSR: metionil sulfóxido reductasa, GPx: glutatión peroxidasa, PrS-SG: proteína glutathionilada.

1.2.1 GSH y el sistema del GSH

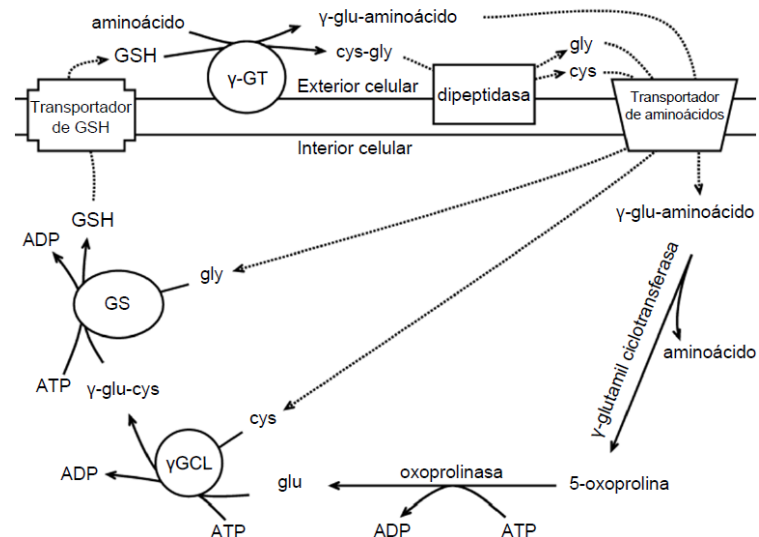
El GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de la mayoría de los organismos y juega un rol fundamental en las defensas antioxidantes, en la detoxificación de xenobióticos y metales, transporte de aminoácidos, señalización y el ensamblaje de centros ferrosulfurados (Fe/S, se abordará en el apartado 1.4 por lo que no se comentará aquí) [18-20]. El GSH se encuentra mayoritariamente en la forma reducida en el

interior celular (>98%) [20-21], localizándose mayoritariamente en el citosol de la célula (80-85%) aunque también puede encontrarse en la mitocondria (10-15%) [22], núcleo, peroxisomas y retículo endoplásmico [21, 23]. El enlace entre el residuo glutamato y cisteína del GSH (incluyendo el grupo γ -carboxilo del glutamato) solo puede ser hidrolizado por la enzima γ -glutamyltransferasa (GGT), la cual está presente únicamente en la superficie externa de ciertos tipos celulares. De hecho, el GSH virtualmente no es degradado intracelularmente y sólo puede ser metabolizado extracelularmente por las células que expresan GGT (Fig. 1.3 A) [24]. Por otro lado, la síntesis de GSH es exclusivamente citosólica e incluye dos reacciones enzimáticas dependientes de ATP: la formación de γ -glutamylcisteína a partir de glutamato y cisteína y la formación de GSH a partir de γ -glutamylcisteína y glicina (Fig. 1.3 A) [20]. El primer paso es el limitante para síntesis de GSH y es catalizado por la γ -glutamylcisteína ligasa (GCL). Esta enzima consta de dos subunidades en mamíferos: la subunidad pesada o catalítica y la subunidad liviana o reguladora. En comparación con la holoenzima, la subunidad catalítica por sí sola es completamente funcional pero menos eficiente y más fuertemente inhibida por GSH. En condiciones fisiológicas, la GCL es regulada por GSH (inhibidor competitivo del glutamato) y la disponibilidad de cisteína [24-25]. El segundo paso para la síntesis de GSH es catalizado por la GSH sintetasa (GS), enzima homodimérica [26].

Como ya se mencionó, el GSH es un componente importante de la homeostasis redox y es considerado como el principal “buffer” redox de las células [18]. La función antioxidante del GSH involucra la actividad de GSH peroxidasas (GPx), reduciendo peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos a expensas de la oxidación de GSH a GSSG (Fig 1.3 B), aunque los equivalentes de reducción pueden provenir también del sistema Trx [27]. El GSSG es reducido por la GR, que recibe electrones del NADPH (Fig 1.2 A y Fig 1.3 B). Además, algunas GSH S-transferasas (GSTs) también se encuentran involucradas en el control de peróxidos orgánicos [20]. Debido a que estas reacciones involucran GSH y dan como producto GSSG, el potencial redox de este par debe ser finamente controlado e influye altamente en la eficiencia de catálisis y remoción de agentes oxidantes [24]. En las células, el potencial redox del par GSH/GSSG puede ser controlado mediante: 1) reducción del GSSG a GSH por la GR (control cinético), 2) exportación activa de GSSG fuera de las células o a compartimientos de reserva (ej. vacuola) o 3) siendo el GSSG consumido mediante reacción con el grupo sulfhidrilo de proteínas y generando disulfuros mixtos (Pr-SS-G, proceso conocido como glutathionilación) (Fig 1.3 B) [28]. Las glutarredoxinas (Grxs, ver apartado 1.3.2), enzimas de la superfamilia de las óxidorreductasas con dominio Trx, pueden catalizar tanto la formación (aunque esta puede producirse espontáneamente) como la

ruptura de estos enlaces mixtos entre tioles proteicos y el GSH [18]. La glutathionilación es una modificación post-traducciona que afecta la funcionalidad de muchas proteínas, como por ejemplo proteínas del proteosoma, p53 y la actina; por lo que se ha propuesto a las Grxs como importantes actores en la regulación y señalización celular referente a la homeostasis redox [18].

A



B

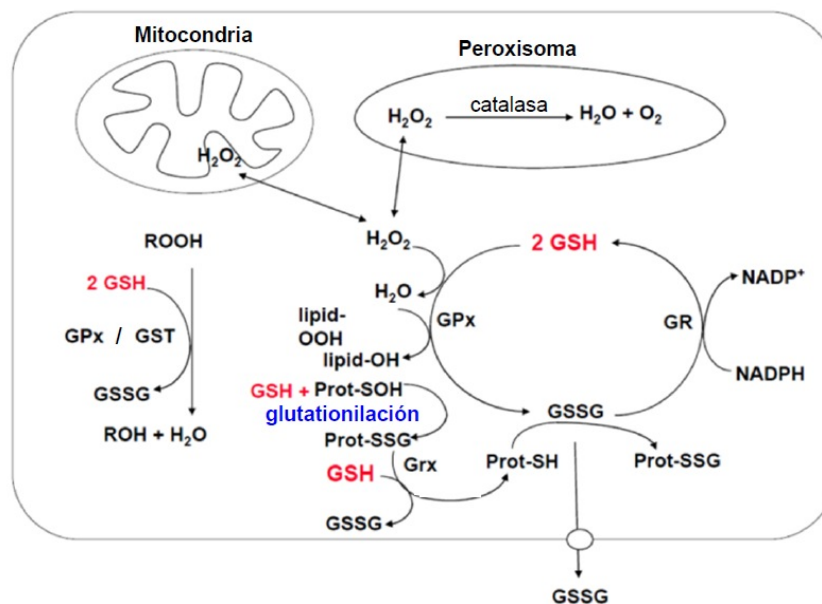


Figura 1.3. Metabolismo del GSH. A. La síntesis de novo y degradación de glutatión se muestran de forma esquemática. La síntesis de novo incluye dos enzimas γ -glutamilcisteína ligasa (γ GCL) y la GSH sintetasa (GS). La enzima capaz de hidrolizar GSH es la γ -glutamil transferasa (γ -GT) y cataliza la transferencia del residuo γ -glutamato a otro aminoácido, haciendo posible el transporte de este aminoácido al interior celular, subsecuentemente clivado por la enzima γ -glutamil ciclotransferasa para formar 5-oxoprolina y el aminoácido libre. La dipeptidasa hidroliza el dipéptido cisteinilglicina en el exterior celular. Imagen

adaptada de [29]. B. Las reacciones de oxidorreducción que involucran al GSH se muestran esquemáticamente. El H_2O_2 , los peróxidos lipídicos u otros peróxidos orgánicos (ROOH) pueden ser metabolizados por GSH peroxidasas (GPx) y/o GSH S-transferasas (GST) a expensas de GSH. Posteriormente, utilizando NADPH como poder reductor, la GR puede reducir al GSSG a GSH. La formación de ácido sulfénico en proteínas (Prot-SOH) permite al GSH formar disulfuros mixtos Prot-SSG, cumpliendo un rol de protección contra oxidación irreversible o permitiendo la regulación funcional. Las Grx pueden reducir las Prot-SSG a Prot-SH. Para prevenir cambios en el equilibrio redox, bajo condiciones extremas de estrés oxidativo, el GSSG puede ser transportado fuera de la célula o reaccionar con Prot-SH para formar Prot-SSG. Cabe mencionar que los platelmintos parásitos carecen de catalasa, y no es claro que posean lisosomas [30]. Figura adaptada de [20].

Las GRs (EC 1.6.4.2), enzimas responsables de la reducción de GSSG, son piridín-nucleótido tiol-disulfuro óxidoreductasas muy relacionadas con las TRs (EC 1.8.1.9) de alto peso molecular (Ver apartado 1.2.2), con una alta similitud de estructura y mecanismo de catálisis, perteneciendo a la misma familia de proteínas. Una de las principales diferencias entre estas TRs y las GRs es la falta en estas últimas de la extensión C-terminal que contiene un centro redox activo adicional (Fig. 1.4) [31].

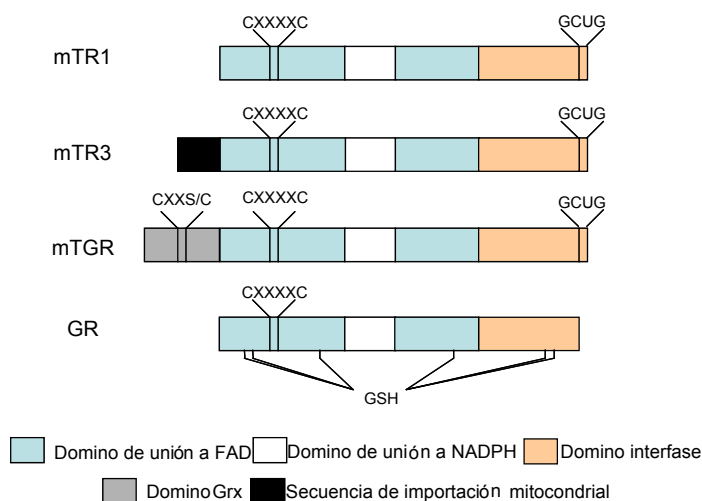


Figura 1.4. Estructura de dominios de las TRs de mamíferos (mTR1, mTR3 y mTGR(también conocida como mTR2)) y de la GR. Los dominios de estas proteínas se encuentran señalados con código de colores (indicado debajo). El sitio de unión a GSH es discontinuo en la GR. La TGR posee un dominio Grx N-terminal ausente en la GR y la TR. También se muestran residuos que participan en el mecanismo catalítico. Imagen adaptada de [32]. La mayoría de las TR y TGR de metazoarios contienen el 21º aminoácido selenocisteína (Sec, U) en el motivo redox C- terminal.

1.2.2 Sistema de la Trx

El sistema de la Trx, ampliamente distribuido en organismos vivos, cumple numerosos roles en la biología celular. Los principales actores en esta vía, como ya se mencionó anteriormente, son las TRs y las Trxs (Fig. 1.2 B).

En mamíferos las TRs son enzimas complejas (TRs de alto peso molecular) que se encuentran más relacionadas a las GRs que a las TRs de bacterias y levaduras (TRs de bajo peso molecular) (Fig. 4). Dichas enzimas son proteínas homodiméricas de la superfamilia de las piridín-nucleótido tiol-disulfuro óxidoreductasas de clase I, en las cuales cada monómero contiene un FAD como grupo prostético, un sitio de unión a NADPH y dos o más centros redox activos [33-34]. Los electrones son transferidos desde el NADPH a través del grupo prostético FAD a un par de residuos de Cys N-terminales.

A diferencia de las GRs, como se mencionó, las TRs de alto peso molecular contienen un centro redox adicional C-terminal, que en la mayoría de los organismos contiene el aminoácido selenocisteína (Sec) (análogo natural de la Cys, que contiene selenio en lugar de azufre) [35]. Los electrones son transferidos ulteriormente desde el centro N-terminal al centro redox que contiene el residuo de Sec, en el extremo C-terminal de la otra subunidad [36]. El motivo C-terminal reducido es el responsable de reducir los blancos de la TR. El residuo de Sec es esencial para la actividad catalítica de la TR y se encuentra en un motivo Gly-Cys-Sec-Gly-COOH, presente en todas las isoenzimas de TR de mamíferos y conservado entre distintas especies [37]. La incorporación de Sec es codificada por un codón UGA (más frecuentemente utilizado como codón de terminación de la traducción). La decodificación de UGA como Sec depende de la presencia de una estructura secundaria específica en la región 3' no traducida (3'-UTR) del ARNm, conocida como elemento SECIS (selenocysteine insertion sequence) [38].

Existen tres genes que codifican para isoformas de TR en el genoma de los mamíferos: TR1, TR3 y TGR (a veces referida como TR2) (Fig. 4). TR1 posee localización subcelular citosólica y TR3 posee localización mitocondrial [39-40]. La TGR es expresada casi exclusivamente en los testículos, y su función está vinculada a la espermatogénesis [41-42]. La TGR (EC 1.8.1.B1) es una fusión de un dominio Grx N-terminal a los dominios de una TR. El dominio Grx recibe electrones a partir del centro activo C-terminal de los dominios TR [43].

En mamíferos la TR es capaz de reducir otros blancos además de las Trxs entre los que se encuentran el ácido lipoico, hidroperóxidos lipídicos, el péptido citotóxico NK-lisina, vitamina K3, ácido dehidroascórbico, el radical derivado del ácido ascórbico y la proteína supresora de tumores p53 (revisado en [15]), aunque la relevancia fisiológica de algunas de estas actividades

es desconocida. Este amplio espectro de especificidad de sustrato puede explicarse, al menos en parte, por la fácil accesibilidad al sitio activo redox que contiene Sec [15].

Las Trxs son óxidoreductasas de bajo peso molecular, involucradas en diversas funciones, fundamentalmente en procesos de óxidoreducción de tioles. Estas proteínas son de especial interés en este trabajo por lo que sus características y funciones se comentarán en mayor detalle en el apartado 1.3.1.

1.2.3 Sistemas ligados

E. granulosus [44], así como otros platelmintos parásitos tales como *Schistosoma mansoni* [45], *Taenia crassiceps* [46], *Fasciola hepatica* [47-48] y *Mesocostoides vogae* [49], a diferencia de sus hospederos mamíferos, carecen de sistemas Trx y GSH convencionales y presentan sistemas Trx-GSH ligados. En estos organismos ambas vías dependen de una misma enzima, la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR, EC 1.8.1.B1), que es la única responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH a la Trx oxidada y al GSSG (Fig. 1.6). Por otro lado, en platelmintos de vida libre no se repite el mismo escenario; éstos poseen en su genoma genes que codifican para TR y GR además de TGR, por lo que parecería que los platelmintos parásitos perdieron durante la evolución la redundancia en la primer etapa de entrada de electrones a estas vías [50].

La TGR es una piridín-nucleótido óxidoreductasa homodimérica que posee los dominios y centros redox de la TR y un dominio Grx N-terminal (Fig. 4) [51]. Es esta fusión de dominios la que permite la reducción de las Trx y del GSSG. A diferencia de las Grxs convencionales que reciben electrones del GSH, el dominio Grx de la TGR recibe electrones del módulo TR y los cede al GSSG [43, 52]. Se ha demostrado además que la TGR es capaz de reducir disulfuros mixtos proteína-GSH (actividad deglutatiónilasa), la cual puede realizarse tanto de forma dependiente como independiente del GSH, siendo en el último caso el dominio TR quien cede los electrones liberando GSH [44, 53]. *E. granulosus* y *S. mansoni* poseen un único gen que codifica para TGR; las variantes citosólica y mitocondrial expresadas en este organismo se producen a partir de este único gen mediante sitios alternativos de inicio de la transcripción, dando lugar a ARNm *trans*-empalmados que codifican para las variantes mencionadas [44, 50]. Cabe destacar que a diferencia de mamíferos donde el dominio Grx de la TGR es monotiólico en su sitio activo, el dominio Grx de las TGR de platelmintos posee el sitio activo típico CPYC y un comportamiento atípico de inhibición temporal de la actividad GR en presencia de concentraciones elevadas de GSSG [46-48, 52, 54] (no descrito en TGR de mamíferos). Por otra parte, la TGR es inhibida por

concentraciones μM de Ca^{2+} [55]. Estos comportamientos de la TGR sugieren que es una enzima importante para el control metabólico en respuesta a cambios en las condiciones celulares.

Correspondiente con la falta de redundancia en el primer paso de estas vías, la TGR es una proteína esencial para platelmintos parásitos. Esto se ha demostrado mediante ensayos de silenciamiento de ARNm [56] en *S. mansoni* y por inhibición por auranofina (potente inhibidor de enzimas que contienen Sec) en *E. granulosus* [52] y otros platelmintos parásitos [57]. Estos resultados proponen a la TGR como un blanco de acción terapéutica para el desarrollo de nuevas drogas efectivas contra dichos parásitos y, de hecho, la acción de un inhibidor específico de la TGR es igualmente efectivo que la droga de referencia praziquantel para tratar la infección por *Mesocostoides vogae* en ratones [49]. Si bien la TGR también está presente en mamíferos, su expresión está restringida a los testículos, y existe evidencia que indica que su función específica es la isomerización de disulfuros [42]. Una visión esquemática de estas redes se muestra en la Fig. 1.6.

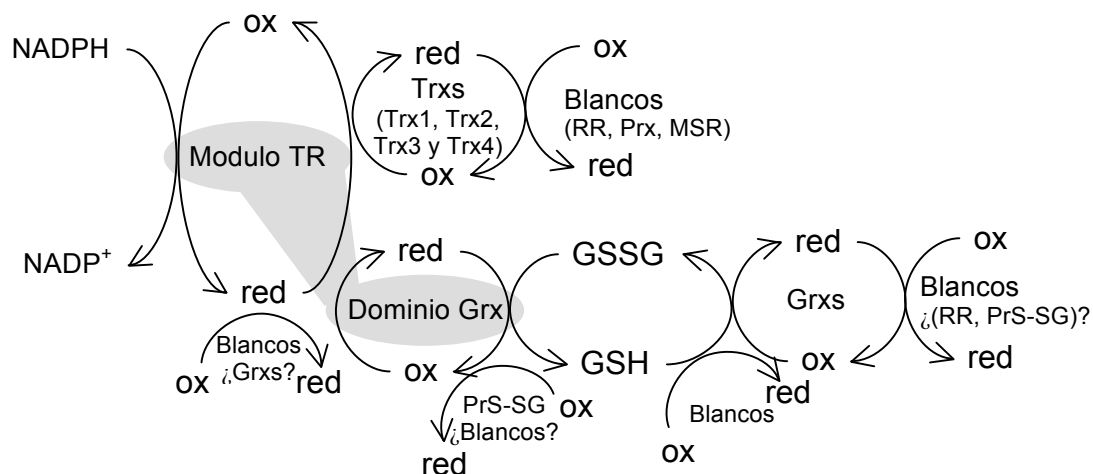


Figura 1.6. Sistemas de la Trx y del GSH en *E. granulosus*. La entrada de electrones a estas vías se encuentra catalizada por una única enzima: la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR). Esta enzima es una proteína homodimérica en la que cada monómero corresponde a la fusión de un dominio Grx a los dominios de una TR. Se ha demostrado que los dominios TR catalizan la reducción de dos Trx citosólicas (Trx2 y Trx3) y una Trx mitocondrial (Trx4) de *E. granulosus* ([52] y datos no publicados), y por analogía con otras TRs posiblemente sea capaz de reducir otros blancos. Existe otra Trx codificada en el genoma de este parásito la cual se cree también aceptaría electrones de los dominios TR de la TGR (Trx1). Dada la diversidad de las Trxs presente, el estudio comparativo de blancos reviste especial interés. Por otro lado, se ha demostrado que el dominio Grx posee, además de actividad GR (recibiendo electrones del módulo TR) [44, 52], actividad deglutatiónilasa [53]. Otras proteínas con dominio Grx (mono y multidominio) codificadas en el genoma de *E. granulosus* podrían recibir electrones del GSH o de los dominios TR de la TGR, al igual que el dominio Grx de TGR.

[illegible]

En los sistemas ligados, así como en las vías canónicas del GSH, el GSH es una molécula central que puede utilizarse para diversas funciones (Fig. 1.7) [58]. Como ya se mencionó, la TGR es la única responsable de la reducción de GSSG (directamente o vía Trx [52]). Al tratarse *Taenia crassiceps* con la auranofina, potente inhibidor de selenoproteínas, se observó una masiva exportación de GSSG hacia el exterior, indicando la presencia de transportadores para GSSG y la necesidad de mantener el potencial redox del par GSH/GSSG [58]. Por otro lado, el efecto causado por la auranofina puede ser parcialmente compensado por la adición de N-acetilcisteína, demostrando la capacidad de *T. crassiceps* para sintetizar GSH de novo [58], concordantemente con la presencia de los genes que codifican para las enzimas de dicha vía en los genomas de éstos parásitos [30]. Además, se han identificado transportadores de GSH y de las enzimas responsables de la degradación de GSH [58]. De hecho, el uso de GSH para la captación de aminoácidos ha sido propuesto en [59] para *Gigantocotyle explanatum* y *Gastrothylax*.

crumenifer, sin ser clara aún la importancia de dicho transporte. Finalmente, estos parásitos codifican para la enzima fitoquelatina sintasa [60], enzima encargada de generar polímeros de γ -glutamilcisteína que, al menos en plantas y algunos otros organismos como la lombriz de tierra *Lumbricus rubellus*, sirven para la detoxificación de metales [61-62]. En estos parásitos se ha propuesto además la posibilidad de que dicha enzima pueda catalizar la ruptura del enlace peptídico entre la cisteína y la glicina en el GSH, una vez el GSH se encuentra unido a algún compuesto xenobiótico. Dicha actividad aumentaría la solubilidad de xenobióticos por la glutathionilación, favoreciendo la excreción [63].

1.3 Unidad de plegamiento Trx

Las Trxs y Grxs forman parte de una superfamilia de proteínas que comparten una misma unidad de plegamiento, denominada dominio Trx. Esta unidad de plegamiento forma parte de la estructura de diversas proteínas y consta de 80 residuos, aunque cada proteína puede poseer modificaciones propias [64]. En su forma más básica este dominio está compuesto por una lámina β conformada por cuatro hebras β y tres hélices α que conectan las hebras. El dominio puede dividirse en un subdominio N-terminal (compuesto por $\beta_1\alpha_1\beta_2$) y un subdominio C-terminal (compuesto por $\beta_3\beta_4\alpha_3$) unidos por α_2 (Fig. 8A). Las hebras β del motivo N-terminal se disponen de forma paralela mientras que las hebras β del motivo C-terminal lo hacen de forma anti-paralela [65]. El dominio Trx forma la estructura completa de las Grxs y forma parte de la estructura de las Trxs, peroxirredoxinas, disulfuro isomerasas, disulfuro oxidasas como DsbA, del transportador de electrones DsbD, GSH S-transferasas, GSH peroxidasas y canales intracelulares de cloruro; conteniendo estos algunas modificaciones típicas del dominio (revisado en [64]). El sitio activo para toda esta gama de proteínas se encuentra ubicado en el extremo N-terminal de α_1 del dominio Trx. Los sitios donde se encuentran más comunmente inserciones de aminoácidos, manteniendo el fold Trx intacto, se observan en la Fig. 1.8 A. La estructura terciaria característica de esta unidad de plegamiento se muestra en la Fig. 1.8 B. A efectos de esta tesis solo nos interesaremos en las familias de la Trx y la Grx, por lo que solo entraremos en detalles en estos subgrupos.

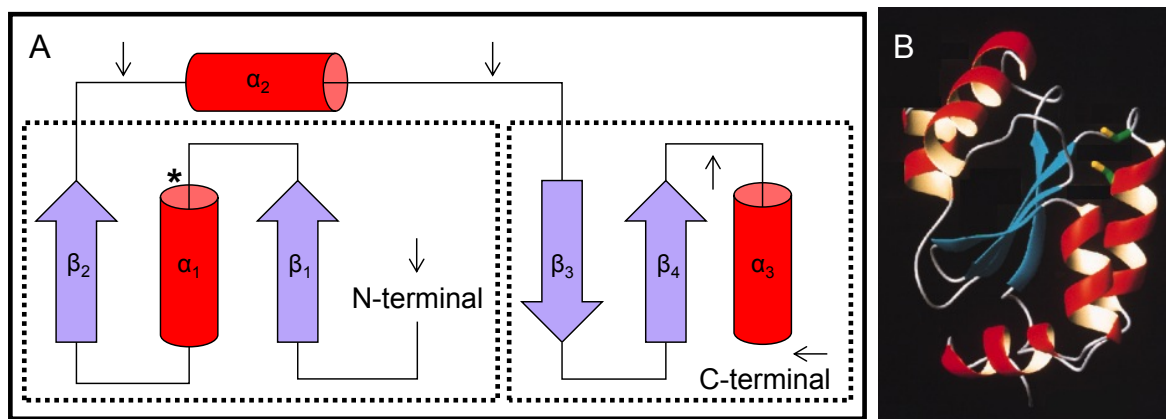


Figura 1.8. Unidad de plegamiento Trx. A. Estructura secundaria del dominio Trx. El dominio se compone de cuatro hojas β y tres hélices α . El asterisco muestra la ubicación del sitio activo y los rectángulos punteados muestran la división en motivos N-terminal y C-terminal. Las flechas indican los sitios más frecuentes de inserciones de aminoácidos encontradas en las diferentes proteínas que presentan este dominio. Imagen adaptada de [65]. B. Estructura terciaria determinada por resonancia magnética nuclear de Grx1 humana, tomada de [66]. Se observan como bastones las Cys del sitio activo.

1.3.1 *Trxs*

Las tiorredoxinas (Trxs) son tiol-disulfuro óxidoreductasas distribuidas en una amplia gama de organismos, desde arqueas a mamíferos, con una larga historia evolutiva [65]. Estas enzimas contienen un sitio redox activo CxxC, típicamente CGPC. Muchas Trxs que poseen este sitio activo típico, incluyendo las Trx1 y Trx2 de mamíferos, dependen del mismo para su función [15]. Estructuralmente, las Trxs poseen un dominio Trx extendido, de aproximadamente 108 residuos, agregando una hebra β y una hélice α al extremo N-terminal de la molécula; el sitio activo se encuentra ubicado en el extremo N-terminal de α_2 (notar que la numeración de estructuras secundaria cambia respecto al dominio Trx básico, debido a la extensión N-terminal, sin embargo la posición del sitio activo es idéntica) [64].

Las funciones fisiológicas de las Trxs han evolucionado hasta alcanzar un gran número de actividades especializadas, algunas ampliamente distribuidas entre organismos mientras que otras se encuentran específicamente en determinados linajes [67]. La primera Trx fue descubierta en *E. coli* por su acción como dadora de electrones a la ribonucleótido reductasa (RR), enzima requerida para la síntesis de ADN [68]. Desde entonces, las Trxs han sido involucradas en la reducción de otros blancos concretos tales como metionil sulfóxido reductasas (MSR), enzimas encargadas de la reducción del sulfóxido de metionina,

peroxirredoxinas (Prxs), las cuales catalizan la reducción de peróxidos, e isomerasas de disulfuros proteicos (PDIs), enzimas encargadas de la formación y ruptura de enlaces disulfuro; así como la participación en numerosos procesos tales como la señalización redox, plegamiento proteico, la regulación de la apoptosis y denitrosilación de tioles [67, 69].

En general, las funciones de las Trxs se encuentran relacionadas con su capacidad óxidorreductora [67]. Las Trxs juegan un rol esencial en la generación y mantenimiento de un ambiente intracelular reductor, por ejemplo cediendo electrones a Prxs, previniendo así el estrés oxidativo [70], y reduciendo disulfuros proteicos intracelulares [31].

En bacterias y levaduras las Trxs funcionan además como dadores de electrones para las 3'-fosfoadenosilsulfato reductasa (PAPS reductasa), involucrada en la asimilación de azufre por estos organismos [71]. En plantas las Trx se han diversificado funcionalmente, participando en la regulación de enzimas fotosintéticas de cloroplastos vía ferredoxina [72]. Por otro lado el estado redox del cloroplasto, regulado por las Trxs, regula la actividad de la ATP sintasa así como la actividad de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCo) [73]. En mamíferos varios factores de transcripción como p53, NF-κB y AP-1 son regulados por las Trxs [15]. Además algunas Trxs previenen la apoptosis vía unión inhibitoria a ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) cuando la Trx se encuentra en estado reducido y perdiéndose dicha unión cuando la Trx se encuentra en estado oxidado [74].

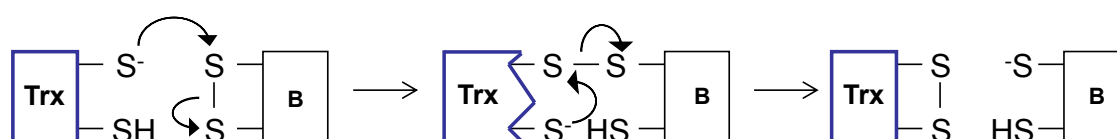


Figura 1.9. Mecanismo de acción involucrado en la reducción de disulfuros por las Trxs. Mecanismo convencional ditiólico de catálisis por las Trxs. Este mecanismo involucra dos sustituciones nucleofílicas donde el primer paso de la catálisis se realiza mediante ataque de la Cys nucleofílica de la Trx sobre el blanco (B, representado por el rectángulo de borde negro). Luego de la formación del intermediario Trx-B unido covalentemente, la Cys resolutive es deprotonada [31], aumentando así su nucleofilia; permitiendo resolver este intermediario, liberando así la proteína reducida y generando un enlace disulfuro entre ambas Cys de la Trx. Esta forma oxidada de la Trx es luego reducida por la TR.

Las Trxs utilizan un mecanismo ditiólico ping-pong para la reducción de sus blancos, el cual involucra las dos Cys del sitio activo: la Cys nucleofílica (Cys N-terminal), que se encuentra

como tiolato en una gran proporción ($pK_a \sim 7$) y que es responsable del primer paso de la reacción (formando un intermediario unido covalentemente a su blanco mediante un enlace disulfuro), y la Cys resolutive (Cys C-terminal), la cual permite resolver el intermediario atacando el enlace disulfuro blanco-enzima y generando como productos el blanco reducido y la enzima en su forma oxidada (con las Cys del sitio activo formando un enlace disulfuro) (Fig. 1.9), que posteriormente es regenerada por la TR [31]. Si bien la Cys resolutive se encuentra mayoritariamente protonada ($pK_a \sim 9$) y por ende es un mal nucleófilo, cuando la Trx se encuentra reducida, la formación del intermediario Trx-blanco unido covalentemente induce un cambio conformacional en el sitio activo que disminuye el pK_a de esta Cys. La Trx oxidada es más estable que la Trx reducida. Esta diferencia de energía es la que permite el avance de la reacción [31].

1.3.2 Grxs

Las Grxs son proteínas de la familia de proteínas con dominio Trx, las cuales se caracterizan por su capacidad de utilizar GSH para sus funciones biológicas [17]. Existen tres grupos principales de Grxs, siendo los de clase I y II los más ampliamente distribuidos [75]. Las Grxs de clase I poseen un sitio canónico CPYC y participan mayoritariamente en funciones redox, recibiendo electrones de la GR o TGR (en los sistemas ligados), vía GSH [15]. La reducción de blancos por parte de las Grxs de clase I puede realizarse mediante dos mecanismos, monotiólico o ditiólico (Fig. 1.10). El mecanismo monotiólico se utiliza para reducir disulfuros mixtos Prot-SSG y, como ya se mencionó, las Grxs pueden catalizar tanto la formación como ruptura de estos enlaces [18]. Esta clase de Grxs presentan funciones fisiológicas variadas entre las que se encuentran ceder electrones a la RR, reducción de arsenato y dehidroascorbato [17]. Por otro lado, dado que la glutathionilación es una modificación post-traducciona que afecta la funcionalidad de muchas proteínas, las Grxs juegan un rol importante en la regulación y señalización celular referente a la homeostasis redox [18, 76]. En células humanas se ha demostrado la regulación mediante glutathionilación de procesos tales como la polimerización de actina y de blancos concretos tales como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la creatina kinasa, c-Jun, p50, caspasa 3 y la proteasa de VIH. Además, el transporte de electrones en la cadena respiratoria podría estar regulado mediante glutathionilación. En plantas, procesos tales como el pasaje de fase G1 a S y el florecimiento se encuentran regulados por glutathionilación (revisado en [18]).



Figura 1.10. Mecanismos catalítico de acción de Grxs. A. Mecanismo ditiólico de reducción de disulfuros proteicos. El mecanismo comienza con el ataque nucleofílico de la Cys N-terminal del sitio activo, la cual posee un pKa ácido, dando como resultado el intermediario Grx-B. El blanco reducido es liberado por acción de la Cys resolutive. Dos moléculas de GSH son necesarias para regenerar la proteína al estado reducido. B. Mecanismo catalítico monotiólico de reducción de disulfuros mixtos Prot-SSG. El mecanismo comienza con el ataque nucleofílico de la Cys N-terminal del sitio activo, resultado en la glutathionilación de Grx y la liberación de B reducido. Una molécula de GSH se necesita para regenerar a Grx al estado reducido. Cabe destacar que dichos mecanismos no son excluyentes, es decir, Grxs ditiólicas pueden utilizar el mecanismo esquematizado en A para determinadas reacciones y el mecanismo B para deglutathionilaciones.

Por otro lado, las Grxs de clase II poseen un sitio canónico CGFS, una inserción característica de cinco aminoácidos anterior al sitio activo y se diferencian funcionalmente con las Grxs de clase I: exhiben baja o nula actividad redox [77-78] y su principal función involucra la homeostasis del hierro [79]. Además, estas proteínas, así como algunas Grxs de clase I, son capaces de unir directamente Fe/S. El mecanismo de unión de estas proteínas involucra la única cisteína del sitio activo (en Grxs de clase II, y la cisteína análoga en Grxs de clase I), la formación de holo- o heterodímeros con otras Grxs y el uso de GSH como cofactor para la unión (Fig. 1.11) [80]. En cuanto a las funciones de estas proteínas, comentaremos brevemente aquí los fenotipos asociados a la deficiencia de alguna de ellas. Abordaremos con mayor detalle los mecanismos moleculares conocidos que subyacen a estos fenotipos en el apartado 1.4. Esta clase de Grxs está compuesta básicamente por dos grupos de proteínas: aquellas homólogas a la proteína mitocondrial Grx5 de levaduras (presentes en la mayoría de los organismos) y aquellas homólogas a las Grxs citosólicas 3 y 4 de levaduras (presentes exclusivamente en organismos eucarióticos) [81-82]. La Grx5 de levaduras es una Grx monodominio y es requerida para la generación en la mitocondria de Fe/S como cofactor para la maduración de holoproteínas, tanto mitocondriales como citosólicas y nucleares, que necesitan dicho cofactor (ver apartado 1.4) [79, 83]. Las

levaduras knock out en dicha proteína presentan un fenotipo severo con disminución en la tasa de crecimiento, incapacidad de crecimiento utilizando como fuente de carbono sustratos no fermentable como el glicerol (reflejo directo de la necesidad de Fe/S para enzimas del ciclo de Krebs y cadena respiratoria), alta tasa de mutación (Fe/S también es necesario para la reparación del ADN), acumulación de hierro intracelular (reflejo de una pérdida en la regulación de la internalización de hierro) y una baja en la actividad de proteínas ferrosulfuradas [83]. Por otro lado, estos fenotipos solo se reflejan en condiciones de normoxia, mientras que en condiciones de hipoxia estas levaduras k.o. presentan un fenotipo silvestre. Se sabe además que la función de dicha proteína se encuentra altamente conservada en distintos linajes ya que este fenotipo puede rescatarse efectivamente expresando proteínas homólogas en estas levaduras k.o. [84].

La función de las proteínas Grx3/4 de levaduras y sus proteínas homólogas es menos clara aunque sin dudas se encuentra relacionada con la homeostasis del hierro en la célula. Las levaduras k.o. para estas proteínas presentan un grave fenotipo, cuando no letal, el cual se caracteriza por un desajuste en todas las reacciones que requieren hierro (tanto en el citosol, mitocondria y núcleo), incluyendo la síntesis de Fe/S, grupo hemo y centros di-hierro, causado por la incapacidad de insertar el hierro en proteínas o transportarlo a la mitocondria (indicando que el hierro no podría ser utilizado a pesar de encontrarse en concentraciones más altas en la célula) [85].

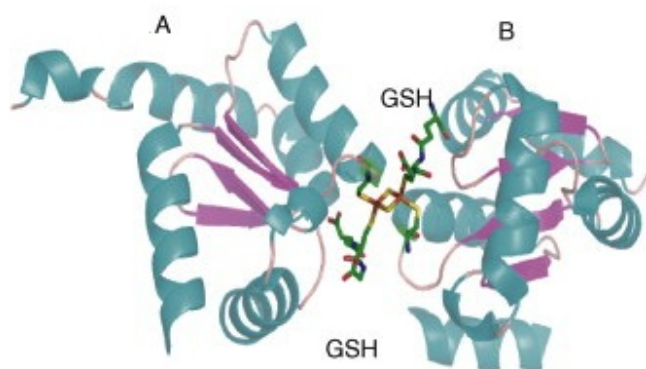


Figura 1.11. Mecanismo de unión de Fe/S descrito para Grxs. Se muestra la estructura cristalográfica obtenida para la GrxC1 de álamo [86]. Como se describe en el texto, el mecanismo de unión involucra la dimerización de la proteína (cada una de las cadenas identificadas como A y B), la utilización de GSH como cofactor y una cisteína por molécula de proteína.

Finalmente las Grxs de clase III son específicas de angiospermas, poseen un sitio activo característico CCxC/S y se encuentran involucradas en la resistencia de estas plantas a diversas condiciones de estrés [75]. Sin embargo, debido a la ausencia de esta clase de proteínas en

platelmintos parásitos, no se ahondará en sus funciones y características, de por sí menos claras que las descritas para Grxs de clase I y clase II.

1.3.2.1 Trxs y Grxs en gusanos chatos

A partir de los genomas de *E. granulosus* y *E. multilocularis*, se identificaron 4 Trxs monodominio, 4 Grxs (2 Grx de clase I: Grx1 y Grx2 y 2 Grx de clase II: Grx3 y Grx5; todas monodominio excepto Grx3, Grx fusión a dominio tipo Trx) y varias TRP, una de ellas de interés para esta tesis, (Fig 1.12) [30].

Las cuatro Trxs de *E. granulosus* han sido estudiadas, en diferente profundidad en nuestro laboratorio: Trx1, Trx2, Trx3 y Trx4 ([52] y datos no publicados). Tres de estas cuatro Trxs (Trx2, Trx3 y Trx4) poseen actividad óxidorreductasa y reciben electrones a partir del módulo TR de la TGR (Fig. 1.6). Respecto a la Trx1 no se dispone de información ya que la proteína recombinante no pudo ser expresada de manera satisfactoria (ref: Bisio, tesis de Licenciatura). La localización subcelular para la Trx2 y Trx4 ha sido determinada experimentalmente, citosólica y mitocondrial respectivamente, y se ha propuesto a estas proteínas como una vía alternativa para la reducción de GSSG o Prot-SSG en estos parásitos.

Independientemente, una Trx (Trx1) ha sido estudiada en *S. mansoni*. Esta proteína se expresa en todos los estadios del parásito y es además secretada, generando una respuesta de anticuerpos específica en ratones infectados [87]. Esta proteína posee además actividad óxidorreductasa y es capaz de donar equivalentes de reducción a la peroxirredoxina 1 del mismo organismo [87]. Se dispone de una estructura cristalográfica para esta Trx [88]. Resultados análogos se reportaron *a posteriori* con las proteínas homólogas en *Fasciola hepatica* [89] and *Opisthorchis viverrini* [90]. Finalmente, la interacción entre Trxs y la TGR parecería involucrar parches de carga opuesta en estas dos proteínas, mecanismo similar al previamente descrito para TR de humanos y de *Plasmodium falciparum* [91].

Poco se sabe sobre las Grxs presentes en *E. granulosus* u otros parásitos. Es razonable especular sin embargo, que de las cuatro Grxs expresadas en el genoma de *E. granulosus*, las dos Grxs de clase I actuarían directamente en la red redox de estos parásitos, mientras que las dos Grxs de clase II estarían involucradas en el homeostasis del hierro en el citosol y en la mitocondria.

A	
Trx2	-----MSVEA---VVKQVDGDALE---AAIKGDKLLVCD 28
Trx3	-----MSGEPSTAVRHVDAEGLK---RVLGDNRLVVIN 31
Trx1	-----MEAKDAEAPPLITEINDENDMES-LKEMSHKCLVIVD 36
Trx4	MLGQKLVAFAARIHAIRTPRYFTSTARCFGKDCGIVNIQDPADFA--EKVTQNELPVLVD 58
IsTRP	-----MPEILKIISRGQLEY-AIKRSYSQPVVIL 28
Trx2	FFATW CGPC KSLAPKLDAMAK--ENEKVIFVKLDVDECQDVAEKYRV TAMPTLIVFKNGC 86
Trx3	FCAPW CGPC RLLAPKVEQLAK--QHQDIIFVKVDIDECEEVSAQYNVSALPTLI A VRNGH 89
Trx1	FFATW CGPC KSVKVAYEKLAE--QETSVKFAKLDIDVYEDAPSDYSIVAMPTFM A FKNGE 94
Trx4	FHATW CNPCK MLGPRLNGVMKN-HMEKVLLAKVDIDSLEDLATQFKVA AVPTVVGMRG GK 117
IsTRP	VTTTN CFAC CFAESSIKSRAE--RSPHAYYAILDGSKFSDVVQQFRIEYYPAYLLFRHGK 86
Trx2	EIGRVVG-ANEAGIRELIQANA----- 107
Trx3	IVGRVVG-ASEADLQQMVNANRDQC----- 113
Trx1	MVDSVVG-PHIEQVKQMVARLK----- 115
Trx4	EVSRTGLKEEAEIEKFIQELCK----- 140
IsTRP	LQKSTFG-INAEGVDAFFNSF----- 106
B	
Grx1	-----
Grx2	-----
Grx5	-----MSLRAFSKLRILPLSA 16
Grx3	MPLSHLKSEEEVDSFLKDCKQLTLLYLFAPWAAECQQITEVFQTLAEDCENRSVRFGMVN 60
Grx1	-----MWRFLSSSPPEIAAYVQKEI 21
Grx2	-----MAKSRKKDLSIGRFIADRI 19
Grx5	LGLAQGSVSFLHSSTLPVQFSKTVRPTFAALP---TRISVRSSSEASSPELDKALRNRL 73
Grx3	AEEVQDFCRKNEVSSVPVVLFFKDGESVARVQGAADLTKTVASLRDKHDDQESLNARL 120
Grx1	QSA---HVVLFTKS---Y CPYC VKAIEILRSY--IGSSFTCNDLRIIDIGTRADCSK 70
Grx2	NSK---KVVLFTKY---Y CPYC KKVKKIFRKH--LGRDSYKEYCDVIDVTATLYEEE 68
Grx5	TELTRTRVVVLMKGDPM EPR CGFS NAVCRILEAHGVLGKHDPATAPLLSSFDVLS DSE 133
Grx3	KALINKAPIMLFMKGTP EEAR CGFS RRMLEILHKHN-----VKFDSFNVLSD ET 169
Grx1	VQDYLESITGARTVPRIFIGKQCIGGCSDLEHFHSMKALAEELLEQK----- 116
Grx2	IMNELKKMTGARTVPRVFINGKCIGGCDDTIKAHESGLIWKM LSR----- 113
Grx5	VREAAKLFSDWPTFPQVFFDGEFIGGCDILDMHRSGKLAAELERRGIGSL LTEREKGKK 193
Grx3	VREGLKIYSDWPTY PQLYANGELIGGV D IVTQLAESNGLLSALGLQ----- 215
Grx1	--
Grx2	--
Grx5	N-
Grx3	--

194

Figura 1.12. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las Trxs/TRP (A) y Grxs (B) codificadas en el genoma de *Echinococcus granulosus*. Dichas secuencias fueron obtenidas de los genomas/transcriptoma de *E. granulosus* y el alineamiento se realizó con el programa ClustalW. En amarillo se muestra el sitio activo de cada una de estas proteínas. (A) La Trx2 y Trx4 (única Trx con localización mitocondrial) fueron previamente caracterizadas en *E. granulosus* y ambas poseen actividad disulfuro reductasa [52]. La Trx3 fue estudiada durante mi tesis de licenciatura y posee actividad disulfuro reductasa. (B) La Grx1 y la Grx2 son proteínas con sitio activo ditiólico canónico CPYC, de presunta localización citosólica, que estarían involucradas directamente en la red redox de platelmintos parásitos. La Grx3 y la Grx5 poseen sitio activo CGFS, canónico para funciones de movilización y ensamblaje de clusters ferrosulfurados, y poseen

presunta localización subcelular citosólica y mitocondrial respectivamente. Grx3 es una fusión de un dominio Trx-like a un dominio Grx monotiólico.

1.4 Centros ferrosulfurados

1.4.1 Función, naturaleza y proteínas ferrosulfuradas

Los Fe/S son versátiles cofactores inorgánicos compuestos por un número variable de átomos de hierro y azufre. El número de átomos que componen a dicho cofactor definen su naturaleza y pueden observarse en la Fig. 1.13. Los más comunes y simples son los Fe/S de tipo rómbico (Fe_2S_2) y cúbico (Fe_4S_4). Además, la pérdida de un átomo de Fe en un Fe/S cúbico puede generar Fe/S del tipo Fe_3S_4 (cuboidal o eventualmente lineal). Mediante fusión, estos tipos de Fe/S pueden generar otros más complejos los cuales generalmente incluyen otros metales, como el cofactor Ferro-molibdeno (FeMo) en la nitrogenasa de bacterias fijadoras de nitrógeno (Fig. 13) [92]. El hierro puede alternar entre los estados de oxidación +2 y +3 y generalmente es coordinado de forma tetraédrica por cuatro moléculas de azufre con estado de oxidación -2 (S^{-2}). Como grupos prostéticos, los Fe/S generalmente son coordinados por residuos de cisteína, aunque pueden encontrarse unidos también a residuos de histidina, arginina, serina o a pequeñas moléculas como el cianuro. El potencial redox de Fe/S es amplio y altamente moldeable por el entorno, pudiendo variar entre los +300 mV hasta los -500 mV [93]. Un ejemplo excepcional lo ilustra el complejo I de la cadena respiratoria, la cual transporta electrones sucesivamente a ocho Fe/S, acoplando así a pequeñas variaciones de energía el bombeo de protones hacia la matriz mitocondrial [94].

Los Fe/S se encuentran presentes en virtualmente todos los organismos y su uso podría haber comenzado durante los orígenes mismos de la vida en la tierra. En la atmósfera anaeróbica de la tierra primitiva los Fe/S podrían ensamblarse espontáneamente y encontrarse disponibles cediendo poder reductor para la generación de moléculas orgánicas y ser incorporados en las primeras vías metabólicas. Incluso ha sido propuesto que la primera célula no se encontraba rodeada de una membrana lipídica sino de una cubierta de Fe/S [95]. Esto permitió la acumulación de químicos en un sistema compartimentarizado y altamente reductor y, con el tiempo, los lípidos se acumularon en la superficie generando una procélula con membrana (y volviéndose independiente para dejar el sitio original de formación). Este proceso pudo ocurrir más de una vez, generando bacterias y arqueas [95]. Sin embargo, cuando la oxigenación de la atmósfera se produjo, la disponibilidad de Fe/S habría disminuido dada la labilidad del cofactor al oxígeno, provocando así la aparición de vías de síntesis de Fe/S altamente conservadas.

Además, la regulación fina de estas vías fue de alta importancia dada la toxicidad asociada a sus componentes libres (hierro y sulfuro) [96]. Estas vías de biosíntesis serán abordadas en el siguiente apartado.

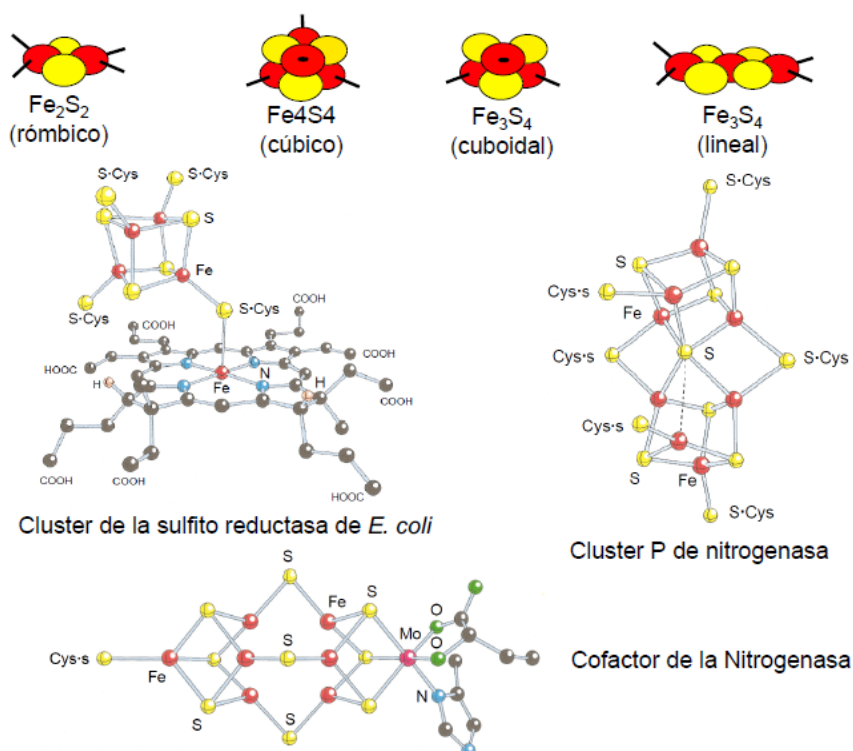


Figura 1.13. Esquema representativo de estructura de diferentes Fe/S. Los átomos de azufre se muestran en amarillo, mientras que los átomos de hierro en rojo. Los átomos de carbono se muestran en gris, nitrógeno azul, molibdeno rosado y oxígeno verde. Imagen adaptada de [92].

En cuanto a su función, los Fe/S pueden actuar como dador y aceptor de electrones en reacciones de oxidorreducción, estabilizar una conformación particular de la proteína, unir sustratos y participar en la catálisis o regular la actividad de una enzima. Las funciones de las holoproteínas que contienen Fe/S no son menos diversas e incluyen la reparación del ADN, la síntesis proteica, la fijación de nitrógeno, fotosíntesis y respiración [97]. A modo ilustrativo se muestran en la siguiente tabla (adaptada de [97]) algunas proteínas ferrosulfuradas y su función asociada.

Proteínas ferrosulfuradas	Función asociada
Citosol	
Leu1, Ecm17	Síntesis de aminoácidos
IRP1	Regulación de la internalización de Hierro
Rli1	Iniciación de la transcripción

Elp3, Tyw1	Modificación de ARNt
Nar1, Dre2	Síntesis de Fe/S
SPROUTY	Señalización mediada por receptor
Núcleo	
Pri2	Síntesis de ADN
Ntg2, Rad3	Reparación de ADN
Rli1	Ensamblado de ribosoma
Mitocondria	
Aco1, complejo I, complejo II, complejo III	Ciclo del ácido cítrico y respiración
Glt1, Lys4	Síntesis de aminoácidos
Yah1	Biosíntesis de Fe/S
Lip5, Bio2, MOCS1A	Biosíntesis de otros cofactores

1.4.2 Síntesis

El proceso biosintético de Fe/S puede ser dividido en dos etapas genéricas: 1) La síntesis de novo de Fe/S en una proteína andamio y 2) la transferencia desde la proteína andamio a apoproteínas blanco. Si bien este proceso parece sencillo a primera vista existen diversos sistemas (que en su mayoría pueden ser intercambiables en condiciones de laboratorio) que permiten la biosíntesis de Fe/S: 1) el sistema bacteriano de fijación de nitrógeno (NIF), 2) la maquinaria de ensamblaje de centros hierro-azufre (ISC) bacteriana y mitocondrial, 3) el sistema de movilización de azufre (SUF) en bacterias y plástidos y la maquinaria citosólica de ensamblaje de Fe/S (CIA) en el citosol y núcleo de eucariotas.

El sistema NIF fue el primero en ser descubierto y se encuentra dedicado enteramente al ensamblaje de cofactor Fe/S de la nitrogenasa, la cual es responsable de la conversión del nitrógeno atmosférico a amoníaco en bacterias fijadoras de nitrógeno. Por otro lado, el sistema ISC es requerido para la generación de la mayoría de las proteínas ferrosulfuradas. El sistema SUF fue descubierto como un sistema de ensamblaje independiente que podría ser utilizado predominantemente bajo condiciones limitantes de hierro o de estrés oxidativo. La mayoría de las bacterias poseen tanto ISC como SUF, mientras que otras solo poseen uno de estos sistemas (revisado en [94]).

En eucariotas, la mitocondria posee proteínas homólogas (probablemente inherentes al precursor endosimbionte) a la maquinaria de ISC bacteriana [98]. Por otro lado, los plástidos

poseen proteínas homólogas de la maquinaria SUF (probablemente obtenido a partir de precursor cianobacteria) [98]. La síntesis de proteínas ferrosulfuradas en el núcleo y citosol requiere de la maquinaria ISC [19] y de la maquinaria especializada citosólica CIA (altamente conservada en eucariotas).

Aquí, nos centraremos en los mecanismos de síntesis de Fe/S en células eucariotas y citaremos principalmente los trabajos realizados en levadura debido a que el entendimiento que se posee es ampliamente más vasto. En cuanto a mamíferos y otros eucariotas, los mecanismos de síntesis de Fe/S se encuentran conservados y por tanto no distan de lo descrito para levaduras. Sin embargo, pequeñas variaciones pueden ser encontradas y se mencionarán a lo largo del texto.

1.4.2.1 Síntesis de Fe/S mitocondrial

El ensamblaje inicial de hierro y azufre para generar Fe/S se produce en la mitocondria. Como ya se mencionó, proteínas homólogas a las constituyentes a la maquinaria ISC en bacterias se encuentran presentes en la mitocondria de eucariotas y son las responsables (formando un complejo multimérico) de esta primera etapa en la síntesis (Fig. 1.14). Isu1, proteína andamio, permite el ensamblaje de Fe/S sobre ella. El azufre inorgánico es generado a partir de L-cisteína por una cisteína desulfurasa (Nfs1) y su proteína accesoria Isd11 (necesaria para la estabilidad de Nfs1). El mecanismo catalítico de esta proteína es dependiente de piridoxal-fosfato e involucra la formación de un intermediario persulfuro sobre una cisteína de NFS1 (Fig. 1.14). Por otro lado la fuente de hierro aún no ha sido dilucidada.

La proteína frataxina (Yfh1) también esta involucrada en la formación de Fe/S, teniendo un rol regulatorio y controlando la producción de Fe/S. Yfh1 es un regulador alostérico de Nfs1, controlando la producción de sulfuro, e interacciona con el complejo Nfs1/Isd11/Isu1, acelerando la producción de Fe/S al controlar la entrada de hierro.

Además, la formación de Fe/S requiere la reducción de S^0 (en forma de persulfuro sobre Nfs1) a sulfuro (S^{2-}). Este transporte de electrones es llevado a cabo, aunque menos claramente en mamíferos, por la ferredoxina Yah1, transfiriendo electrones desde el NADPH a través de la ferredoxina reductasa (Arh1). Yah1 interacciona directamente con Nfs1 y transfiere electrones a ésta en presencia de L-cisteína (Fig. 14).

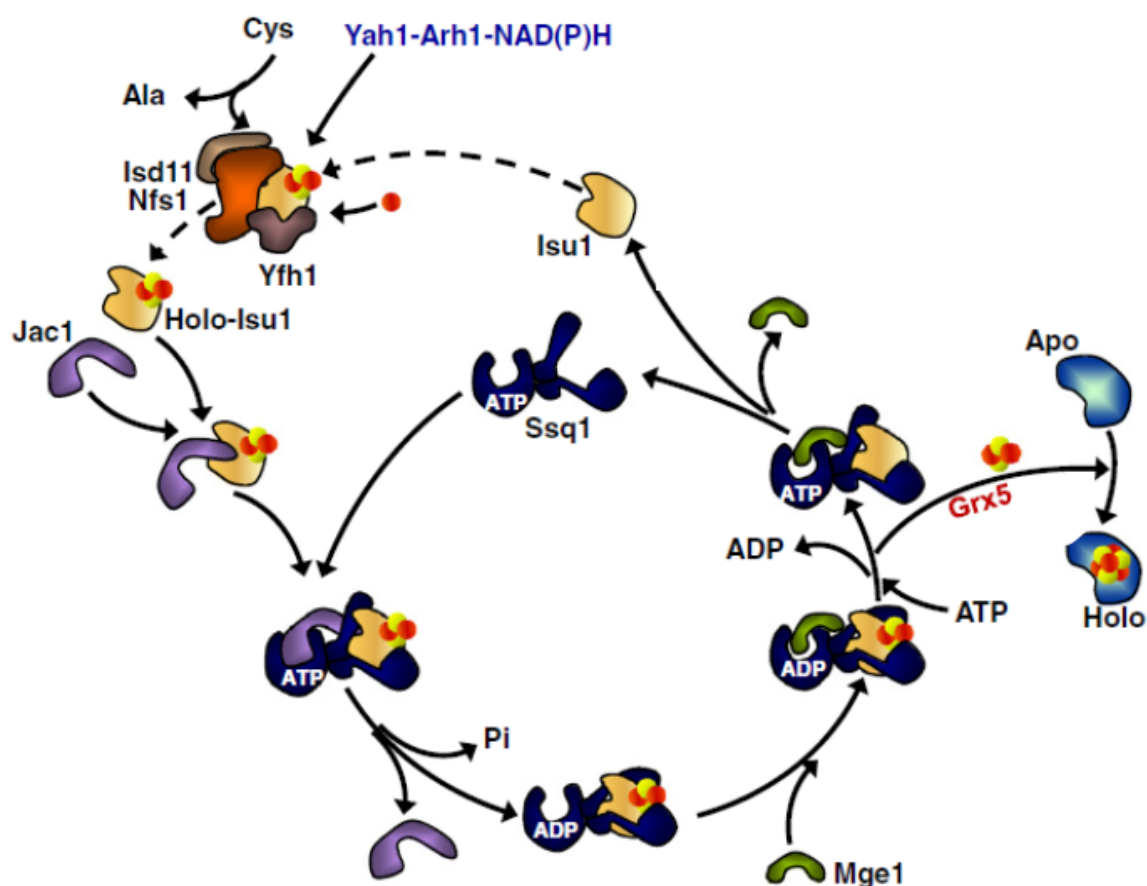


Figura 1.14. Modelo del proceso de biosíntesis de Fe/S en la mitocondria. La biogénesis de Fe/S se lleva a cabo por la maquinaria ISC en la mitocondria. Inicialmente, el cluster Fe_2S_2 se sintetiza en la proteína andamio Isu1. El azufre proviene de la cisteína, liberado por el complejo desulfurasa Nfs1-Isd11, vía un intermediario persulfuro. Dicho proceso requiere además de electrones para reducir el intermediario persulfuro, los cuales provienen del NAD(P)H vía la ferredoxina reductasa Arh1 y la ferredoxina (Yah1). Este proceso además necesita de la ferredoxina Yfh1, la cual es un activador alostérico de la desulfurasa. Posteriormente, la cochaperona Jac1 recluta a la holo-Isu1 y la entrega a la chaperona Ssq1 (unida a ATP). La hidrólisis de ATP induce un cambio conformacional generando una unión fuerte con la proteína andamio Isu1. Finalmente, el intercambiador de nucleótidos Mge1, permite un nuevo cambio conformacional que favorece la transferencia del Fe/S a Grx5 o directamente a apoproteínas blanco. Imagen tomada de [79].

El Fe/S recién formado es posteriormente transferido a apoproteínas con auxilio de una proteína chaperona (Ssq1) y una proteína co-chaperona (Jac1). El intercambiador de nucleótidos Mge1 es además necesario para el ciclo de hidrólisis de esta chaperona. La actividad de Ssq1 induce un cambio conformacional en Isc1 y permite la desestabilización del Fe/S unida para ser transferido directamente a proteínas blanco o a Grx5, intermediario en el transporte. Grx5

interacciona con Ssq1 mediante un sitio de unión cercano al sitio de unión para Isc1 por lo que la transferencia sería favorecida dada la cercanía.

Otras proteínas se encuentran además involucradas en la síntesis de Fe/S pero solo las anteriormente nombradas han demostrado ser esenciales.

1.4.2.2 Síntesis de Fe/S citosólico y nuclear

En principio, la síntesis de Fe/S citosólico y nuclear depende la síntesis mitocondrial y es precedida por la exportación desde la mitocondria de un intermediado sulfurado. En mamíferos, la presencia de algunos miembros de la maquinaria ISC en el citosol ha generado la interrogante de si el Fe/S podría generarse de manera mitocondria-independiente. Sin embargo, aún no se dispone de evidencia contundente que apoye esta idea.

En el modelo de síntesis mitocondria-dependiente (Fig 1.15), una vez el Fe/S ha sido sintetizado por maquinaria central de ISC (descrita en el apartado anterior), un compuesto que contiene azufre (X-S), de naturaleza aún desconocida, es exportado de la mitocondria en un proceso dependiente del transportador ABC mitocondrial Atm1, GSH y la sulfhidril oxidasa Erv1 [19]. La depleción de Atm1 en levaduras se encuentra asociada a defectos en la homeostasis del hierro y la acumulación mitocondrial de hierro [99]. En humanos, esta proteína se encuentra asociada a una severa enfermedad caracterizada por un incremento en la concentración de Fe mitocondrial y la aparición de sideroblastos (glóbulos rojos anormales como consecuencia de la acumulación de gránulos de hierro) [99]. Atm1 une GSH, concordantemente con la esencialidad de GSH para la producción de Fe/S extra mitocondrial [100], y sugiriendo que el GSH podría estar directamente involucrado en el proceso de exportación [19]. En cuanto a Erv1 su participación en la exportación es desconocida, pudiendo ser directa (oxidación del compuesto transportador de X-S) o indirecta (asociada a la función de oxidación de proteínas en el proceso de importación y plegamiento proteico en el espacio intermembrana mitocondrial) [101].

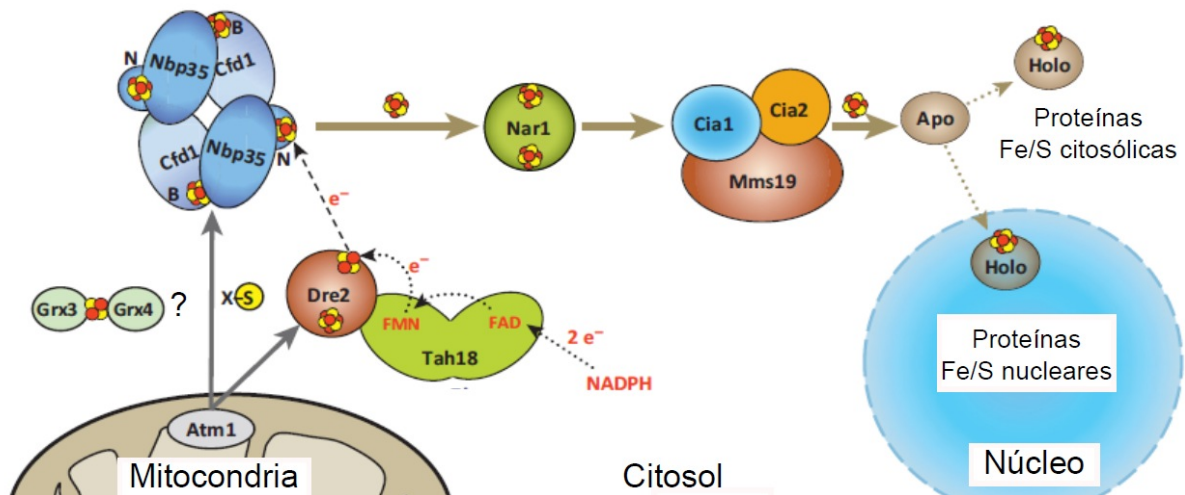


Figura 1.15. Modelo de maduración de proteínas ferrosulfuradas citosólicas y nucleares en levadura. La mitocondria es requerida, aportando la fuente inicial de azufre (X-S) generada por la maquinaria de ISC y exportada por el transportador Atm1, y genera un Fe_4S_4 (Fe/S marcado como B, el Fe/S marcado como N es cofactor de Nbp35 y no será transferido) sobre la proteína andamio heterodimérica Cfd1-Nbp35. Este proceso depende de la flavoproteína Tah18 y de Dre2 (proteína ferrosulfurada) como transportadores de electrones, los cuales provienen del NADPH. Cuál es el blanco de reacción es aún desconocido pero podrían necesitarse electrones en caso de que X-S fuera un persulfuro o en caso de que la síntesis involucrara el pasaje de un Fe_2S_2 a Fe_4S_4 . Posteriormente, este Fe/S es transportado a apoproteínas en un proceso mediado por Nar1 y el complejo Cia1-Cia2-Mms19 (el cual interacciona con las proteínas blanco y asegura la especificidad en la entrega del cofactor). Las Grx3 y Grx4 se encuentran involucradas en las primeras etapas de esta maquinaria pero su rol específico aún resta por dilucidar. Imagen adaptada de [102].

Una vez X-S alcanza el citosol, este es transformado en Fe_4S_4 sobre la proteína andamio heterotetramérica Cfd1-Nbp35 [98]. El mecanismo molecular por el cual este proceso se lleva a cabo es aún desconocido pero involucra la transferencia de electrones mediante el sistema Tah18-Dre2 y probablemente la acción de la Grx3/4. *A posteriori*, el Fe/S es transferido vía Nar1 y el complejo Cia1, Cia2 y Mms19 a las apoproteínas blanco (revisado en [98]). Interesantemente Nar1 y Dre2 son proteínas ferrosulfuradas y dependen de este cofactor para su función. La maduración de las formas apo de Dre2 y Nar1 no depende de la maquinaria de CIA o únicamente de la primer etapa de ensamblaje sobre Cfd1-Nbp35 respectivamente, pero es absolutamente dependiente de Grx3/4. Por último, el ensamblaje de Fe/S Grx3/4 solo depende de la maquinaria de síntesis mitocondrial. Así, un escenario probable para la primer etapa de síntesis de Fe/S en el

citosol es que X-S interaccione con Grx3/4, sea transformado de alguna forma en Fe_2S_2 , el cual *a posteriori* será transferido a la proteína andamio Cfd1-Nbp35 y transformado en Fe_4S_4 [19].

Justificación y Objetivos

2.1 Justificación

Las infecciones por platelmintos parásitos constituyen un problema de salud global, siendo la hidatidosis y la fasciolosis especialmente importantes en Uruguay, desde el punto de vista sanitario y económico. Es así que la búsqueda de blancos para la generación de drogas más efectivas para combatir dichas infecciones, las cuales afectan principalmente a países subdesarrollados, se vuelve de especial importancia.

Como ya se mencionó, la TGR ha sido recientemente validada como un blanco promisorio para la generación de drogas destinadas al tratamiento de las infecciones por platelmintos parásitos. Sin embargo, poco se sabe acerca de qué procesos controlados por la TGR, enzima multifuncional, son los esenciales para estos parásitos y, por tanto, los responsables de la letalidad causada por inhibidores de la TGR. Es así que los estudios planteados en este proyecto permitirán un mayor conocimiento de los blancos de esta enzima y, eventualmente, podrían derivar en la identificación de nuevos sitios de quiebre en la biología redox de estos parásitos.

Desde un punto de vista básico, poco se sabe acerca de las funciones específicas de las Trxs y Grxs expresadas en estos parásitos y menos aún sobre el entendimiento del grado de diversificación y redundancia alcanzado para estas proteínas en particular. Así, los experimentos realizados en esta maestría aportan a la comprensión de la diversidad funcional asociada a la unidad de plegamiento Trx (que incluye Trxs, Grxs y TRPs) y específicamente sobre las vías de óxido-reducción y ensamblaje de Fe/S en platelmintos parásitos. Cabe destacar que las vías de ensamblaje de Fe/S no han sido estudiadas en platelmintos parásitos.

Por último, el estudio de la capacidad de TRP para coordinar Fe/S podría aportar datos valiosos acerca de las señas moleculares necesarias para la unión de Fe/S dentro de la superfamilia Trx y podría llevar a la identificación de una nueva clase de TRP no descrita hasta el momento.

2.2 Objetivo general.

Obtener un mayor conocimiento global sobre las vías redox dependientes de tioles en platelmintos parásitos, generando una base de conocimiento que permita una mejor comprensión de la importancia de cada rama de dicha red, así como aportar nuevos conocimientos que permitan entender, a nivel molecular, la diversidad funcional asociada a la unidad de plegamiento tipo Trx.

2.3 Objetivos específicos:

1. Generar una plataforma de proteínas recombinantes (nativas y mutantes) para poder realizar ensayos funcionales.
2. Realizar una caracterización bioquímica básica de las Grxs ditiólicas, en particular actividad óxidoreductasa, incluyendo la regeneración de la forma reducida de estas proteínas por la TGR.
3. Caracterizar funcionalmente y evaluar blancos de las Trxs Grx ditiólicas de *E. granulosus*.
4. Confirmar la capacidad de coordinar Fe/S y rol biológico de Grx5.
5. Evaluar actividades redox y de unión de Fe/S, de IsTRP.

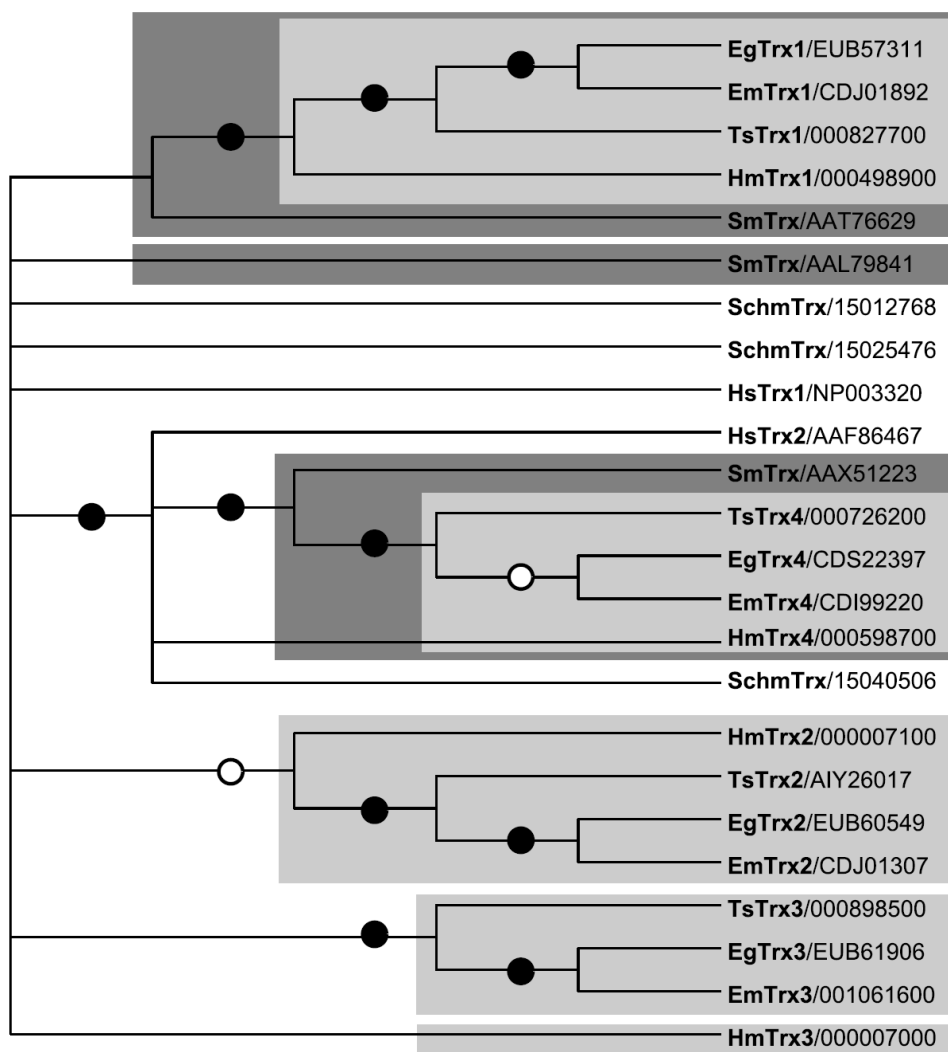
Resultados

3.1

Adentrándonos en los sistemas ligados de la tiorredoxina y del glutatión: tiorredoxinas y glutarredoxinas monodominio

3.1.1. Análisis filogenético y de expresión de Trxs en platelmintos parásitos.

El genoma de *E. granulosus* codifica cuatro Trxs monodominio, dos Grxs de clase I monodominio y dos Grxs de clase II (una de ellas fusión a dominio Trx) [30]. Además el genoma de *E. granulosus* codifica para una proteína relacionada a las Trxs (TRP), de la que se comentará en detalle en el siguiente capítulo. En la Fig. 3.1 se muestra el análisis filogenético incluyendo el minado de Trxs en otros gusanos chatos, incluyendo los ténidos *Echinococcus multilocularis*, *Taenia solium* e *Hymenolepis microstoma* (cestodos); el tremátodo *Schistosoma mansoni* (notar que tanto los cestodos como los tremátodos son parásitos obligatorios), la turbellaria de vida libre *Schmidtea mediterranea* y, como referencia, las Trxs de *Homo sapiens*.



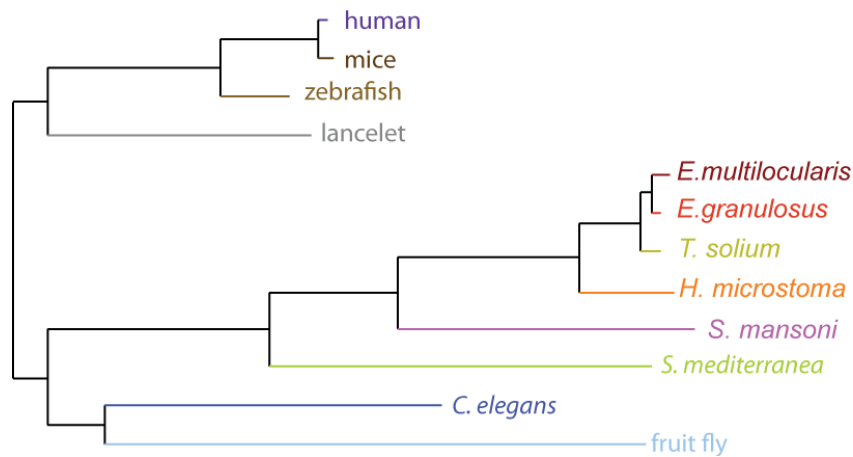


Fig. 3.1. Análisis filogenético de Trxs en platelmintos parásitos. Árbol filogenético de maximum-likelihood (ML) sin raíz para secuencias proteicas de Trxs. Los círculos negros en los nodos indican valores de bootstrap de al menos un 80% para el análisis por ML y neighbour-joining (NJ), mientras que los círculos blancos indican valores de bootstrap de al menos un 80% bien en ML o en NJ (500 réplicas), pero no por ambos métodos. Nodos con bootstrap menores al 50% no se muestran. Se muestran los códigos de acceso en diferentes bases de datos: aquellas secuencias que poseen códigos en la base de datos de la NCBI se muestran (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *S. mansoni* y *H. sapiens*). Para otros ténidos (*H. microstoma* y *T. solium*) se muestra el número del gen en la base de datos genedb (ver materiales y métodos). Para *S. mediterranea* se muestra el número génico de la base de datos smedgd (ver materiales y métodos). Las secuencias provenientes del genoma de ténidos se muestran en gris claro y en gris oscuro se muestran las secuencias provenientes del genoma de platelmintos parásitos. Se asignaron nombres para las Trxs de *E. granulosus* y las Trxs de otros ténidos que son claros ortólogos de éstas. Hm: *H. microstoma*, Ts: *T. solium*, Eg: *E. granulosus*, Em: *E. multilocularis*, Hs: *H. sapiens*, Sm: *S. mansoni*, Schm: *S. mediterranea*. Nótese que se asignó el nombre HmTrx3 aunque éste no es un claro ortólogo de EgTrx3. Debajo de muestra la filogenia de los gusanos chatos de los cuales se extrajo información genética y otros organismos modelo como referencia. Figura tomada de [30].

EgTrx4, Trx mitocondrial [49], se encuentra bien conservada tanto en cestodos, trematodos y turbellaria; y es ortóloga de la Trx mitocondrial de humanos, HsTrx2 (CCDS13928); en otras palabras, las Trx mitocondriales conforman un clado monofilético. Por otro lado, no ocurre lo mismo con las Trx citosólicas (Trx1, Trx2 y Trx3): ninguna de las Trxs de platelmintos surge como clara ortóloga de HsTrx1 (CCDS35103). Las Trxs de platelmintos se duplicaron dos veces en los cestodos como *E. granulosus*, *T. solium* y *H. microstoma*, generando tres Trxs citosólicas, en tanto las Trxs del trematodo *S. mansoni* y la turbellaria *S. mediterranea*, se habrían duplicado tan sólo una vez. Estas duplicaciones génicas parecen bien ser anteriores a la separación de linajes o,

alternativamente, haber rápidamente acumulado numerosas mutaciones una vez ocurridas las duplicaciones.

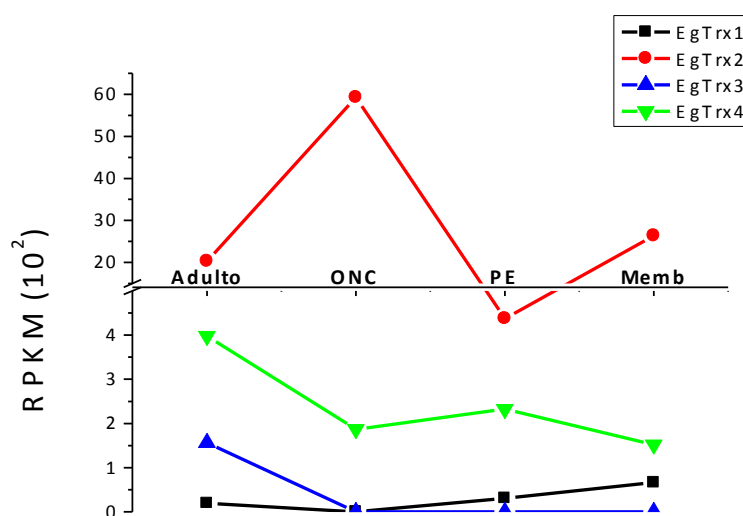


Fig. 3.2. Perfiles de transcripción de Trxs en estadio adulto, oncosfera* (ONC), protoescólex* (PE) y capa germinativa (Memb) de *E. granulosus*. El análisis transcriptómico fue publicado en [103]. Los datos se presentan como RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*). * Tanto los protoescólex como las oncosferas fueron activadas previo a la extracción de ARNm. La activación produce la evaginación de protoescólex y la eclosión de huevos.

Los patrones de expresión de ARN mensajero para los genes de *E. granulosus*, obtenidos de [103], indican que estas proteínas serían requeridas en distintos estadios del parásito (Fig. 3.2). Trx2 y Trx4 se expresan durante todo el ciclo biológico del parásito, siendo las dos Trxs más altamente expresadas. Por otro lado, el ARNm de Trx1 no es detectado durante el estadio de oncosfera activado y Trx3 sólo se expresa de forma significativa durante el estadio adulto.

3.1.2. Las Trxs de *E. granulosus* son redox activas y poseen blancos solapantes y diferenciales.

La actividad catalítica de reducción de disulfuros proteicos de tres de las cuatro Trxs (Trx2, Trx3 y Trx4) de *E. granulosus* fue confirmada mediante el ensayo de reducción de la insulina (Fig. 3.3) ([52] y datos obtenidos durante mi tesis de grado). Además, el mecanismo catalítico de estas proteínas involucra las dos cisteínas del sitio activo, dado que las proteínas recombinantes mutantes en la cisteína resolutive carecen de actividad catalítica (Fig. 3.3). Cabe destacar que la Trx1 no pudo ser producida de forma soluble utilizando el sistema de expresión en *E. coli*, por lo

que no se continuaron los ensayos con esta proteína recombinante (datos obtenidos durante mi tesis de grado).

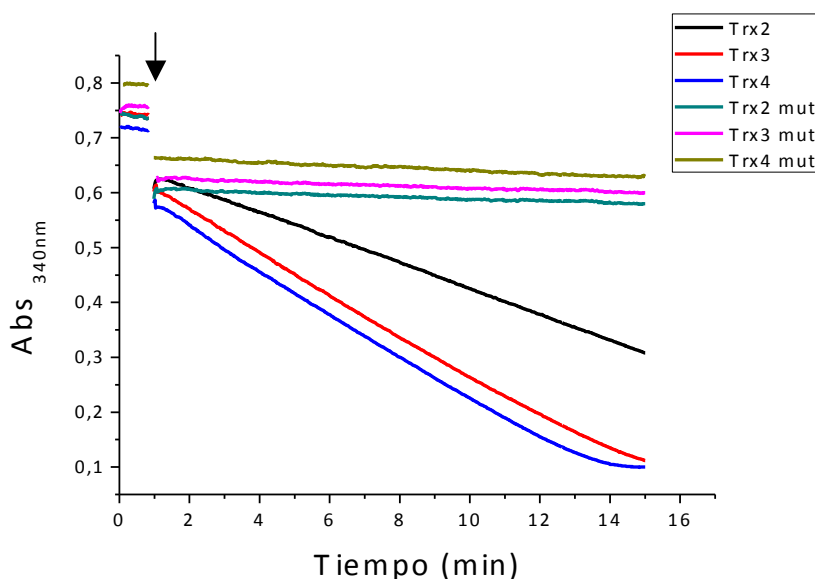


Fig 3.3. Ensayo de reducción de la insulina por Trxs. Los cursos temporales de reducción de la insulina por Trx2, Trx3, Trx4 salvaje y los mutantes Cys → Ser en la cisteína resolutive se muestran en la figura. El ensayo fue evaluado siguiendo la caída en la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH en un sistema acoplado con la actividad TR de la TGR. La flecha indica el momento de la adición de la Trx a la mezcla. Se utilizó 1.5 μ M de enzima silvestre y 10 μ M de enzima mutada. Nota: Las construcciones para la expresión de las proteínas recombinantes silvestres fueron generadas durante mi Tesis de grado, en tanto las mutantes fueron generados durante el posgrado (ver materiales y Métodos).

La confirmación de la interrupción del ciclo catalítico en las Trxs mutantes permite validar la técnica a utilizar con el objetivo de identificar blancos proteicos de estas proteínas. Como se mencionó, la mutación CxxC a CxxS impide la resolución del intermediario covalente Trx-blanco pudiéndose así realizar experimentos de *pull down* con alta eficiencia y posteriormente identificarlos por espectrometría de masas. En la Fig. 3.4 se muestra un gel SDS-page (en condiciones reductoras) comparando interactores de las Trxs analizadas y en la Tabla 3.1 se muestran los resultados preliminares respecto a la identificación de los blancos promisorios para cada una de las Trxs. Estos experimentos de *pull down* fueron realizados una única vez y se planea repetir estos ensayos prontamente.

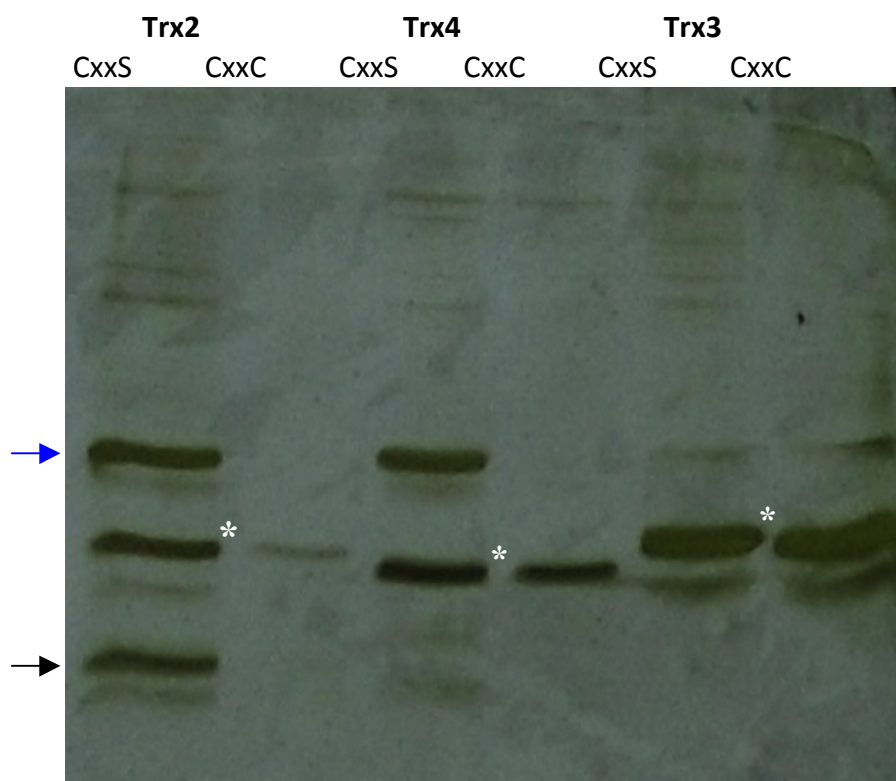


Fig. 3.4. Análisis por SDS-page, en condiciones reductoras, de fracciones de elución de los ensayos de *pull down* para Trx2, Trx3 y Trx4 de *E. granulosus*. Los ensayos de *pull down* fueron realizados utilizando Trxs recombinantes purificadas de *E. coli* y extractos acuosos de homogeneizados de protoescléx. Se indica en la parte superior la Trx utilizada como cebo para capturar interactores y la presencia o no en la misma de la mutación puntual en la cisteína resolutive (CxxS o CxxC, respectivamente). La flecha negra indica la banda correspondiente a la cadena liviana de dineínas, blanco diferencial identificado únicamente para la Trx2 (EGR_09473), la flecha azul indica la banda correspondiente a la peroxirredoxina citosólica (Q8T6C4), blanco solapante. La banda correspondiente a la Trx se muestra con un asterisco blanco

Tabla 3.1. Presuntos blancos proteicos identificados hasta el momento para Trx2 y Trx4. La identificación de proteínas se realizó por espectrometría de masas (ver materiales y métodos en esta sección, nombres de acuerdo a la anotación genómica).

Trx2			Trx4		
Interactores	Número de espectros	Cobertura de secuencia	Interactores	Número de espectros	Cobertura de secuencia
Peroxirredoxina (Q8T6C4)	270	0.59	Peroxirredoxina (Q8T6C4)	199	0.48
Dineína, cadena liviana (EGR_09473)	15	0.43			
Proteína expresada (CDS18671)	12	0.23			
Metionina sulfóxido reductasa msrA (EGR_06840)	9	0.38			
Peroxirredoxina (W6U1C9)	9	0.33			
Proteína 14-3-3 (AAF19966)	3	0.10			
Antígeno de superficie de leucocitos CD53 (U6J3W8)	12	0.21			
Factor de elongación 2 (U6IWQ6)	15	0.23			
Gelsolina (U6IX85)	22	0.45			

3.1.3. Análisis filogenético y de expresión de Grxs en platelmintos parásitos.

Las Grxs de clase II, usualmente involucradas en la homeostasis de Fe/S, son altamente conservadas durante la evolución y los platelmintos parásitos no son la excepción; proteínas homólogas a Grx3 y Grx5 de humanos se encuentran codificadas en el genoma de estos

organismos (Fig. 3.5). Por el contrario, el escenario para las Grx monodominio de clase I, usualmente involucradas en reacciones redox tiol-disulfuro, es más diverso. Llamativamente, el trematodo *S. mansoni* no codifica para ninguna de estas proteínas, mientras que *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *H. microstoma* (cestodos) presentan dos genes para Grxs monodominio de clase I (ambas presuntamente citosólicas). *T. solium*, siendo también cestodo, codifica solo para una única Grx monodominio de clase I y, dado que se encuentra más emparentado a *E. granulosus* (familia de los *Teniidae*) que a *H. microstoma* (familia de los *Hymenolepididae*), probablemente este gen se encuentra en una zona no secuenciada del genoma de este organismo, dado que lo mismo sucede con los genes ortólogos de *Echinococcus spp.* (las secuencias de estos genes fue obtenida mediante información de transcriptómica), o bien perdió uno de estos genes. El genoma de *S. mediterranea* (gusano chato de vida libre) codifica únicamente para una Grx monodominio de clase I presuntamente citosólica (Fig. 3.5). Grx1 se expresa en todo el ciclo del parásito a excepción de los PE activados, estadio en el que no es expresada de forma significativa. No se disponen de datos de transcriptómica para Grx2. Respecto a Grx3 se expresa de forma constante durante todos los estadios del parásito. Grx5 no se expresa en oncosferas activadas (Fig. 3.6).

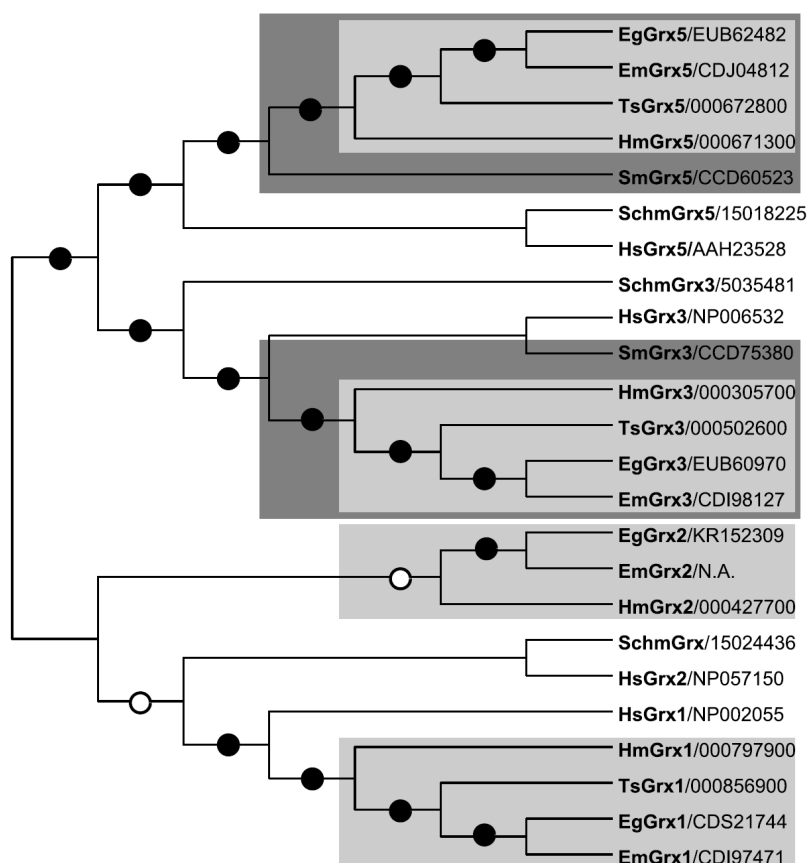


Fig. 3.5. Análisis filogenético de Grxs en platelmintos parásitos. Árboles filogenético de maximum-likelihood (ML) sin raíz para secuencias proteicas de Grxs. Los círculos negros en los nodos indican valores de bootstrap de al menos un 80% para el análisis por ML y neighbour-joining (NJ), mientras que los círculos blancos indican valores de bootstrap de al menos un 80% en ML o NJ (500 réplicas). Nodos con bootstrap menores al 50% no se muestran. Se muestran los códigos de acceso en diferentes bases de datos: aquellas secuencias que poseen códigos en la base de datos de la NCBI se muestran (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *S. mansoni* y *H. sapiens*). Para otros ténidos (*H. microstoma* y *T. solium*) se muestra el número del gen en la base de datos genedb (ver materiales y métodos). Para *S. mediterranea* se muestra el número génico de la base de datos smedgd (ver materiales y métodos). Las secuencias provenientes del genoma de ténidos se muestran en gris claro y en gris oscuro se muestran las secuencias provenientes del genoma de platelmintos parásitos. Se asignaron nombres a aquellas secuencias que no admiten Trxs de ténidos por ser claros ortólogos de proteínas de *E. granulosus*. Hm: *H. microstoma*, Ts: *T. solium*, Eg: *E. granulosus*, Em: *E. multilocularis*, Hs: *H. sapiens*, Sm: *S. mansoni*, Schm: *S. mediterranea*. N.A.: no anotado.

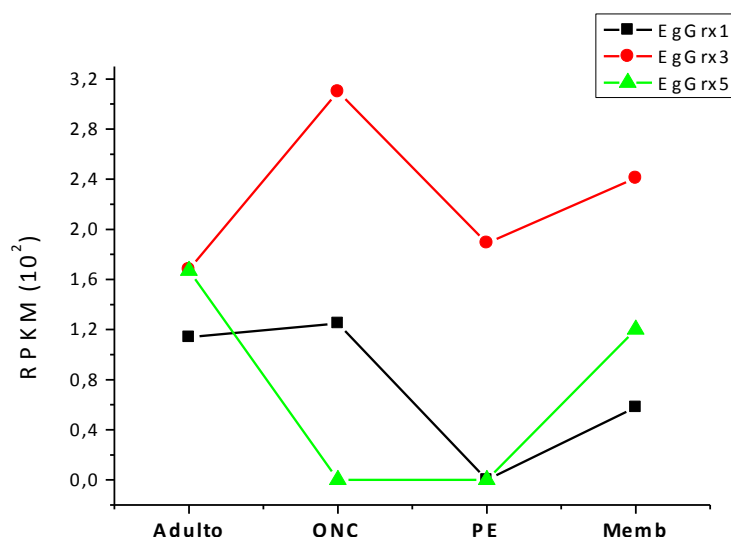


Fig. 3.6. Perfiles de transcripción de Grxs en estadios adulto, oncosfera* (ONC), protoescólex* (PE) y capa germinativa (Memb) de *E. granulosus*. El análisis transcriptómico fue publicado en [103]. Los datos se presentan como RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*). * Tanto los protoescólex como las oncosferas fueron activadas previo a la extracción de ARNm. La activación produce la evaginación de protoescólex y la eclosión de huevos.

3.1.4. Las Grxs monodominio de clase I son capaces de deglutationilar y reciben electrones tanto del GSH como del módulo TR de la TGR.

Los genes de la Grx1 y la Grx2 fueron clonados en el vector de expresión pET-28a y su expresión y purificación se llevaron a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos de este capítulo. Se muestra en la Fig. 3.7 el grado de pureza alcanzado para estas proteínas. La actividad deglutationilasa de las Grxs de clase I y del dominio Grx de TGR (utilizando el mutante Sec-Stop, que no puede transferir electrones desde el módulo TR de la TGR al dominio Grx, pero que presenta un dominio Grx funcional) fueron analizadas mediante el ensayo del HED, canónico para Grxs (Fig. 3.8). Todas estas proteínas fueron activas en las condiciones utilizadas. Sin embargo, estas proteínas mostraron capacidades catalíticas marcadamente distintas para reducir la forma glutationilada del β -mercaptoetanol: Grx1 demostró una actividad específica 2 veces más baja que Grx2 y 15 veces más baja que el dominio Grx de la TGR.

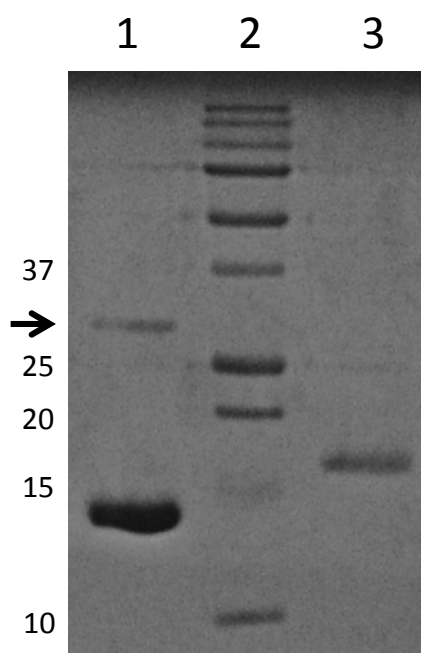


Fig. 3.7. Análisis por SDS-PAGE de eluatos de purificación de Grx1 y Grx2 recombinante. Se purificaron las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por metales en columna de cobalto agarosa y posterior cromatografía de exclusión molecular. Se muestra un gel SDS-PAGE 15% archilamida en condiciones reductoras. Carril 1: Grx1, 2: marcador de peso molecular, 3: Grx2. Nota: La incompleta reducción de Grx1 produce la aparición de dímeros producto de disulfuros intermoleculares (señalado con una flecha).

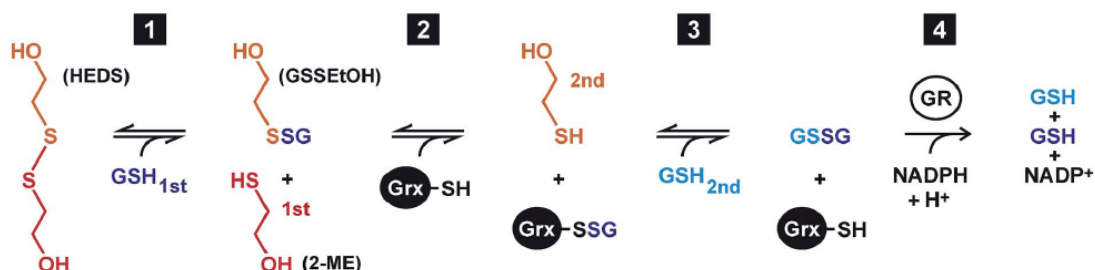
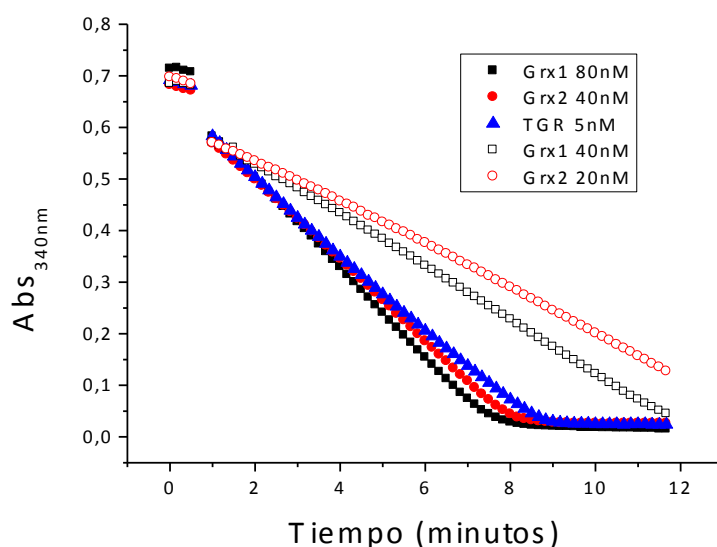


Fig. 3.8. Actividad reductora de disulfuros mixtos de sustratos glutationilados por parte de Grxs dependiente de GSH. La actividad deglutationilasa de Grx1, Grx2 y TGR_{GC}* fueron analizadas utilizando el ensayo de HED, siguiendo la caída en la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH. Se muestran los cursos temporales completos. La flecha muestra el momento de la adición de las Grxs a la mezcla de reacción. Debajo se muestra el modelo para el mecanismo del ensayo del HED. La reacción 1 es Grx independiente, mientras que la reducción del GSSEtOH dando GSSG es catalizada por la Grx via un mecanismo ping-pong monotiólico (reacción 2 y 3). La reducción de GSSG producido es monitorada acoplado a la actividad GR y consumo de NADPH (reacción 4). Imagen tomada de [104]. GSSEtOH: β-mercaptoetanol glutationilado. 2-ME: β-mercaptoetanol.

Además, dado que la reducción directa del dominio Grx de la TGR por los dominios TR es parte del ciclo catalítico de esta enzima, analizamos si el módulo TR de la TGR puede reducir además la Grxs de clase I monodominio directamente. De hecho, la mutante TGR_{C31S} (mutante que carece de actividad GR y Grx pero presenta actividad TR) fue capaz de reducir ambas Grxs en experimentos de un único ciclo de reducción (Fig 3.9).

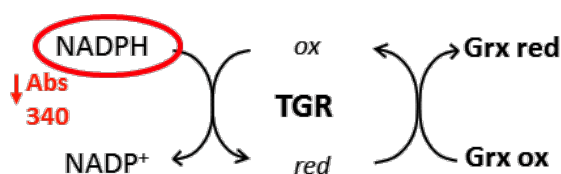
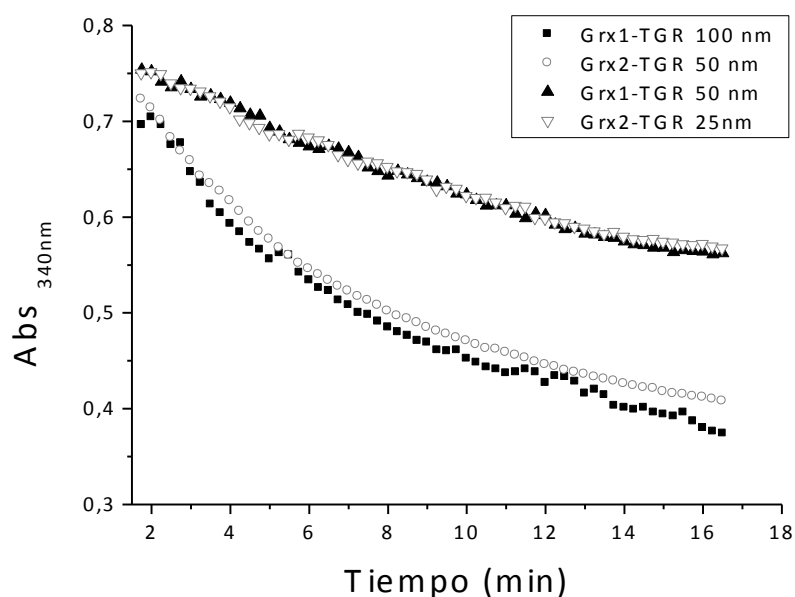


Fig. 3.9. Reducción de Grxs de clase I monodominio por los dominios TR de la TGR. Se muestran los cursos temporales para la reducción de 30 μ M Grx1 y Grx2 por el modulo TR de la TGR. 100-50 nM y 50-25 nM de TGR_{C31S} fue usado para la reducción de Grx1 y Grx2 respectivamente. Debajo se muestra el esquema de reacción. La Grx espontáneamente oxidada es reducida por el dominio TR de la TGR a expensas del consumo de NADPH.

3.1.5. Discusión y Perspectivas

Como ya se mencionó, los sistemas ligados de la Trx y el GSH contienen uno de los blancos de drogas más promisorios para el tratamiento de virtualmente todas las infecciones por platelmintos parásitos. Sin embargo, hasta el momento, los esfuerzos de investigación se han concentrado en la enzima central de estas vías, la TGR, y poco se sabe acerca de qué procesos controlados por esta enzima multifuncional son los esenciales para estos parásitos. Aquí, hemos realizado un trabajo abarcando un marco más amplio, intentando caracterizar o identificar los blancos primarios y secundarios de la TGR. Con la intención de hacer más clara la discusión, retomamos aquí la Fig. 1.6, agregando la información que se desprende de los estudios presentados (Fig. 3.10.).

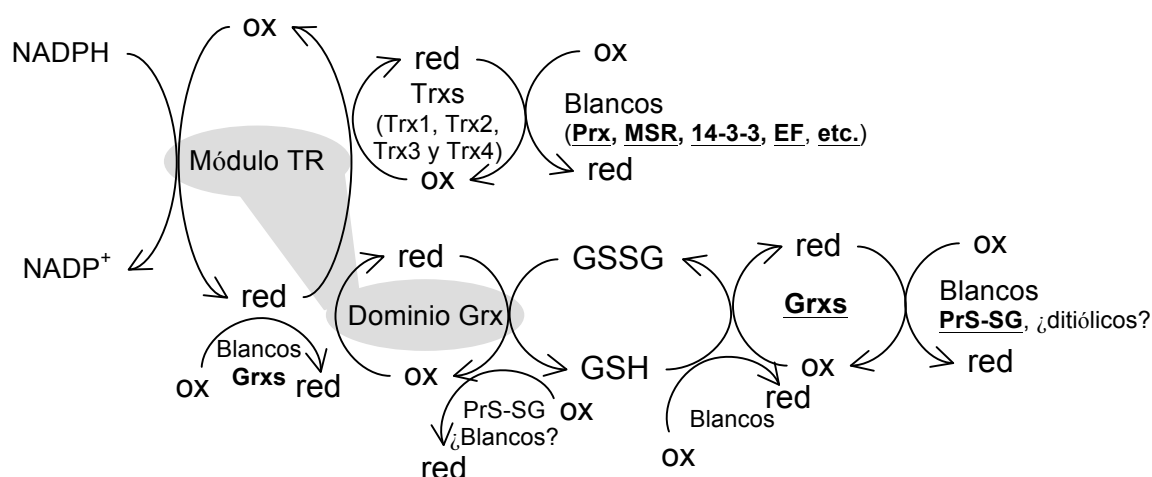


Fig. 3.10. Sistemas de la Trx y del GSH en *E. granulosus*. La entrada de electrones a estas vías se encuentra catalizada por una única enzima: la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), fusión de un dominio Grx a los dominios de una TR. La TGR posee dos isoformas, una mitocondrial y una citosólica. Se ha demostrado que los dominios TR catalizan la reducción de dos Trx citosólicas (Trx2 y Trx3) y una Trx mitocondrial (Trx4) de *E. granulosus* ([52] y datos aquí presentados), y por analogía con otras TR posiblemente sea capaz de reducir otros blancos. Existe otra Trx codificada en el genoma de este parásito la cual se cree también aceptaría electrones de los dominios TR de la TGR (Trx1). Estas Trxs presentarían blancos y funciones solapantes y diferenciales. Por otro lado, se ha demostrado que el dominio Grx posee, además de actividad GR (recibiendo electrones del módulo TR) [44, 52], actividad deglutatiónilasa [53]. Los genomas de *E. granulosus* y otros cestodos, pero no los de trematodos, codifican a su vez para Grxs de clase I monodominio; éstas reciben electrones del GSH o de los dominios TR de la TGR y son capaces de reducir sustratos glutatiónilados. La información que proviene de esta tesis se muestra en **negrita** y subrayado en el esquema.

Como era de esperar, todas la Trxs y Grxs analizadas hasta el momento dependen de la TGR para ser regeneradas al estado reducido.

Respecto a las Trxs, disponíamos ya de antecedentes que confirmaban que tres de las cuatro Trxs monodominio codificadas en el genoma de *E. granulosus* eran redox activas y capaces de reducir la insulina, un sustrato no fisiológico ([52] y tesis de grado Hugo Bisio). Continuamos estos estudios abordando la identificación de algunos de sus blancos proteicos. Aunque los datos son preliminares aún, hemos identificado blancos involucrados en procesos tales como el control de las especies reactivas del oxígeno (peroxirredoxina), la reparación por daño oxidativo (metionil sulfóxido reductasa), la señalización celular (proteína 14-3-3), polimerización de actina

(gelsolina) y la traducción (factor de elongación 2), entre otros. Es importante destacar además, que algunos de estos blancos ya han sido identificados como blancos de Trxs en otros organismos, validando la técnica utilizada. La peroxirredoxina es un blanco bien conocido de las Trxs [15] e incluso se dispone de datos experimentales de reducción de estas proteínas por Trxs en gusanos chatos [87]. Cabe mencionar que *E. granulosus* codifica para tres peroxirredoxinas, dos citosólicas y una mitocondrial; las dos peroxirredoxinas citosólicas (Q8T6C4 y W6U1C9) fueron identificadas como blancos de la Trx2 (Trx citosólica). La peroxirredoxina Q8T6C4 fue también identificada como blanco de la Trx4 (Trx mitocondrial), no así la peroxirredoxina mitocondrial, lo cual podría explicarse por las limitaciones de la aproximación experimental (trabajar con un extracto “total” de protoescoléx) y por la abundancia relativa de las peroxirredoxinas presentes en estos extractos. EF2, identificado como blanco de la Trx2 en este estudio, fue identificada como un blanco presunto en *Arabidopsis thaliana* [105] y *Chlamydomonas reinhardtii* [106]. La metionil sulfóxido reductasa también es un blanco característico de Trx [67]. Cabe destacar que solo se ha detectado como blanco la metionil sulfóxido reductasa A (msrA) hasta el momento, no así la msrB. MsrA y msrB reducen metionil sulfóxido S y R de forma estereoespecífica, respectivamente. La proteína 14-3-3, altamente conservada en eucariotas e involucrada en la señalización celular [107], ha sido previamente identificada como interactor de la Trx1 de humanos en células HeLa [107]. En platelmintos parásitos, dada su alta expresión en distintos estadios del parásito, en conjunto con su función demostrada en la regulación de la actividad de quinasas y la fusión de gránulos de secreción (revisado en [108]), esta proteína es un blanco particularmente interesante de estudio. Las dineínas también son blancos conocidos de proteínas relacionadas a la Trx y su estado de reducción afecta la actividad ATPasa de estas proteínas [109]. Finalmente, otros blancos como la Gelsolina (proteína reguladora de la polimerización y depolimerización de actina), el antígeno de superficie de leucocitos CD53 (tetraspanina, contiene tres Cys con localización predicha citosólica (TMHMM server, expasy tools) y la proteína expresada CDS18671 poseen numerosas cisteínas pero poco se sabe sobre su relevancia para el parásito. Cabe destacar además, que otros blancos canónicos como la ribonucleótido reductasa no fueron identificados aún como interactores.

A su vez, estos estudios han comenzado a revelar algunas características particulares de cada proteína, y podrían finalmente ayudar a comprender la diversidad funcional de éstas y la necesidad de la duplicación de genes en los genomas de estos parásitos. En particular, por ejemplo, la Trx2 posee una marcada tendencia a reaccionar con dineínas, proteínas asociadas al

tránsito vesicular, en comparación con Trx3 y Trx4 (si bien esta última es mitocondrial, la técnica utilizada para la detección de blancos no es organelo específica). Por otro lado, la Trx3, expresada únicamente en el estadio adulto, parecería tener una menor reactividad con algunas de las proteínas presentes en el estadio de protoescléx, por ejemplo peroxirredoxinas, sugiriendo alguna funciones y blancos particulares en el estadio adulto. Así, aunque preliminarmente, estos experimentos poseen un gran potencial para el entendimiento de la función de las Trxs en estos parásitos. En el futuro repetiremos estos experimentos con extractos de protoescléx. Se evaluará la necesidad de utilizar extractos proteicos enriquecidos en fracciones subcelulares con el fin de disminuir la aparición de interactores artefactuales (por ejemplo peroxirredoxina citosólica como blanco de la Trx mitocondrial Trx4) y el uso de extractos correspondientes a otros estadios del parásito.

Respecto a las Grxs de clase I monodominio, su función y relevancia para *E. granulosus* era menos clara al momento del comienzo de la tesis. Aquí, hemos clonado los genes de las dos Grxs de este tipo codificadas en el genoma de *E. granulosus*, Grx1 y Grx2, y expresado las proteínas recombinantes con la finalidad de estudiar su capacidad enzimática. Ambas Grxs de clase I codificadas en el genoma de *E. granulosus*, Grx1 y Grx2, son capaces de deglutationilar el sustrato artificial β -mercaptoetanol (2-ME) glutationilado en el ensayo canónico utilizado para determinar la actividad enzimática de Grxs (ensayo del HED, ver Fig. 3.8). Además, interesantemente, de manera análoga a al mecanismo catalítico de reducción de sustratos glutationilados o GSSG por el dominio Grx de la TGR (donde los dominios TR reducen al dominio Grx), las Grxs de clase I monodominio pueden ser reducidas de forma directa por los dominios TR de la TGR. Aún resta determinar si la reducción por TR de estas Grxs es capaz de sustentar la actividad de deglutationilación pero, asumiendo que la identidad del sustrato reductor no determina la naturaleza del sustrato oxidante, es de esperar que sí lo haga. Además, dado que la forma oxidada de las Grxs utilizadas en el ensayo con un único ciclo de óxidorreducción está dada por el disulfuro interno entre la Cys nucleofílica y la Cys resolutive, la capacidad de los dominios TR de la TGR de reducir la forma glutationilada de estas Grxs y, por tanto, abastecer electrones para un mecanismo monotiólico es aún desconocido. Se plantea resolver ambos aspectos utilizando albúmina glutationilada (BSA-SG) y los mutantes de Grxs en la Cys resolutive. La glutationilación *in vitro* de albúmina y la utilización de BSA-SG en ensayos de actividad Grx ya ha sido descrita [110] y hemos generado recientemente las construcciones para expresar las Grxs mutantes en las Cys resolutive de la Grx1 y la Grx2.

Por otro lado, la ausencia de estas proteínas en el genoma de tremátodos parecería indicar que, al menos en estos organismos, el dominio Grx de la TGR podría sustituir el rol de las Grxs de clase I monodominio. Además, incluso en cestodos, no existen Grxs de clase I monodominio mitocondriales por lo que la isoforma mitocondrial de la TGR sería única responsable de la deglutationilación en este compartimento. De hecho, hemos demostrado aquí que el dominio Grx de la TGR es al menos 8 veces más eficiente para la reducción del sustrato artificial β -mercaptoetanol glutationilado que sus contrapartes monodominio. El estudio de blancos, tanto ditiólicos como monotiólicos será esencial para dilucidar si existen blancos de las Grx monodominio en cestodos que no pueden ser reducidos de forma eficiente por la TGR directamente. Los mismos ensayos de *pull down* planteados para Trxs pueden realizarse para Grxs, permitiendo identificar blancos asociados al mecanismo ditiólico de reducción [111]. De hecho, como ya se mencionó, ya hemos generado mutantes en las Cys resolutiva de ambas Grxs de clase I de *E. granulosus* y se dispone además de una construcción para la expresión de la TGR mutante en la Cys resolutiva del dominio Grx [53]. De esta forma, podremos comenzar a indagar sobre la necesidad de los cestodos y no de los trematodos de codificar Grxs de clase I monodominio. Sin embargo, las Grxs se caracterizan además por un mecanismo monotiólico asociado a la deglutationilación (y por tanto el intermediario es GS-Grx) por lo que los experimentos anteriormente planteados solo permitirán el entendimiento de una parte de las funciones asociadas a las Grxs. El estudio de los blancos monotiólicos de las Grxs será abordado utilizando el marcado con maleimida biotinilada, técnica utilizada con éxito en otros parásitos tales como *P. falciparum* [112]. Esta técnica ha sido utilizada en general para detectar blancos de glutationilación pero ciertamente puede ser utilizada para detectar blancos de acción de las Grxs. El primer paso incluye el bloqueo con agentes alquilantes de las Cys libres y luego el tratamiento con Grx (silvestre y mutante CxxS). Esto permitirá reducir blancos de estas Grxs (mecanismo ditiólico y monotiólico vs únicamente monotiólico) generando tioles libres. El posterior tratamiento con maleimida biotinilada permite el enriquecimiento de péptidos marcados (utilizando estreptavidina) y análisis por espectrometría de masas.

Concluyendo, no nos es posible aún identificar procesos individuales controlados por la TGR que expliquen la letalidad asociada a la pérdida de función de esta enzima y, es posible que el efecto de la TGR sea resultado del desequilibrio generalizado de la homeostasis redox.

3.1.6. Materiales y métodos

Minado de genes y análisis filogenético – La información genética de *E. granulosus*, *T. solium*, *H. microstoma* y *S. mansoni* fue obtenida de la base de datos del Instituto del Sanger <http://www.genedb.org/> (última visita 02/08/2015). La información genética de *S. mediterranea* fue obtenida de <http://smedgd.stowers.org/> (última visita 19/07/2015) y la secuencia de los genes de Trxs y Grxs de *H. sapiens* fueron obtenidos de la base de datos de la NCBI. Los alineamientos de múltiples secuencias proteicas fueron generados con ClustalW [113]. Los árboles filogenéticos de Maximum likelihood y Neighbour-joining fueron creados utilizando el software MEGA 6 [114]. El cálculo del soporte de bootstrap fue realizado utilizando 500 pseudoréplicas.

Clonado, expresión y purificación de Trxs, Grxs y TGR (silvestres y mutantes) de E. granulosus –

Las construcciones para la expresión de las formas mutantes de la TGR y de las Trxs silvestres fueron previamente generados [52-53]. Los ORFs de las Trxs y Grxs fueron amplificados usando como molde cDNA generado a partir de UNAM total de protoscólices de *E. granulosus* y clonados en el vector pET28a (Novagen) usando técnicas estándares de biología molecular (dependientes de restricción y ligación). La mutagénesis directa fue llevada a cabo utilizando la técnica de extensión de solapamiento [115]. Todos los cebadores y construcciones generados durante este trabajo se muestran en la tabla 3.2. La secuencia de todas las construcciones fue corroborada mediante secuenciación por el método enzimático de Sanger. Para la expresión de proteínas recombinantes, las construcciones correspondientes fueron utilizadas para transformar células *E. coli* BL21(DE3), o en el caso de las selenoproteínas, células *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con pSUABC, plásmido que permite una sobreexpresión de los genes involucrados en la síntesis y decodificación de selenocisteína (selA, selB y selC) [116]. La expresión de las proteínas recombinantes se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito [52]. Para la purificación de las proteínas recombinantes, las bacterias fueron centrifugadas y el pellet bacteriano resuspendido en buffer lisis (300 mM NaCl, 50 mM fosfato de sodio, 10 mM imidazol, pH 7.0) y sonificado. Los lisados fueron centrifugados por 30 minutos a 20.000 g, y los sobrenadantes aplicados a una columna de afinidad por iones metálicos (IMAC) conteniendo cobalto (resina de agarosa HisPur (Thermo)). La fracción unida a la resina fue lavada con el buffer de lavado (300 mM NaCl, 50 mM fosfato de sodio, 20 mM imidazol, pH 7.0) y eluida con 250 mM de imidazol (manteniendo constantes los restantes componentes del buffer

de lavado). Posteriormente, estas fracciones fueron gel filtradas utilizando columnas de desalado PD10 (GE Healthcare), cambiando de buffer a 150 mM cloruro de potasio, 50 mM fosfato de sodio, pH 7.0; y posteriormente almacenadas a -80°C. La concentración de proteína y FAD (este último sólo en el caso de las mutantes de TGR) fue determinada espectrofotométricamente a 280 y 460 nm, respectivamente. El contenido de selenio de las selenoproteínas fue estimada de acuerdo a experimentos previos (los contenidos de selenio se encuentran cercanos al 10% en todos los lotes analizados hasta ahora). La pureza de las proteínas recombinantes fue analizada por geles 10-15% SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras.

Tabla 3.2. Construcciones generadas en este trabajo. Los sitios de restricción se subrayan.

Constructos	Vector	Eg Gen	Pares de cebadores	Comentarios
pH06	pET28a	Trx3	<u>GGATCC</u> ATGTCTGGAGAGCCCTCA AAGCTTTTAACATTGGTCGCGATT GCGGACCCTCTCGTCTGCTG CAGCAGAGAGGGTCCGC	mutante CxxS
pH07	pET28a	Trx4	T7 promoter T7 terminator GGTCTAACCCCTCCAAGATGCTTG CAAGCATCTTGGAGGGGTTACACC	mutante CxxS
pH27	pET28a	Trx2	T7 promoter T7 terminator GCGGCCCTCTAAGTCGCTCG CGAGCGACTTAGAGGGGCCGC	mutante CxxS
pH10	pET28a	Grx1	<u>GGATCC</u> ATGAAAAGTCGCAAG AAGCTTTCATCGAGACATTTTC	silvestre
pH17	pET28a	Grx2	<u>GGATCC</u> ATGTGGCGCTTTTATC AAGCTTTTACTTCTGCTCTAAAAG	silvestre

Ensayo de reducción de la insulina – Se evaluó la capacidad de Trx para reducir los disulfuros de la insulina acoplándola a la actividad TR (reducción de Trx a expensas de NADPH) dada por el módulo TR de la TGR_{C31S}. La actividad se siguió espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH ($\epsilon=6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [117]. La mezcla de reacción contiene 100 μM NADPH, 10 mM EDTA, 0.5 mg/mL insulina y 10 nM TGR_{C31S}. Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

Ensayo de deglutationilación – El ensayo de actividad Grx de Grx1, Grx2 y TGR_{GC*} (posee un módulo Grx funcional pero carece de actividad TR [52]) fue realizado como se describió previamente [118]. La mezcla de reacción que contiene 1 mM GSH (Sigma), 2 mM EDTA, 0.1 mg/mL sero albúmina bovina (BSA), 0.7 mM β - hidroxietil disulfuro (Acros Organics) y 0.4 unidades de glutatión reductasa de levadura (Sigma) fue incubada por 2 minutos. Luego, la

enzima a evaluar fue agregada y se siguió la disminución de la absorbancia a 340 nM tras el agregado de NADPH ($\epsilon=6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

Reducción de Grx por los dominios TR de la TGR – La reducción de la Grx1 y Grx2, espontáneamente oxidadas, por la mutante TGR_{C31S} (carente de actividad Grx y GR) [53] fue realizado como se describió en [110]. La mezcla de reacción contiene 100 mM fosfato de sodio, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 mg/mL BSA, 100 μM NADPH y 30 μM Grx. La reacción fue comenzada con la adición de 50-100 nM de TGR_{C31S}.

Todos los ensayos enzimáticos fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro PG-T70+ (PG Instruments, UK) a 25°C.

Captura de blancos proteicos mediante inmovilización de Trxs mutantes – 1 mg de enzima mutante pura Tx2_{CxxS}, Trx3_{CxxS} y Trx4_{CxxS}, en buffer PBS, fue incubado por 60 minutos a 4 °C bajo agitación con perlas magnéticas de Ni-NTA (QIAGEN). Luego, un lisado clarificado (centrifugado a 12000g) de *E. granulosus* (200 μL de protoescólex) fue incubado con la resina conteniendo el anzuelo inmovilizado a 4 °C por al menos 1 hora bajo agitación suave, antes de lavar las proteínas no unidas con 500 μL de 300 mM NaCl, 50 mM fosfato de sodio, 30 mM imidazol, pH 7.0; diez veces. Finalmente la elución se realizó con 50 μL de 300 mM NaCl, 50 mM fosfato de sodio, 10 mM DTT, pH 7.0, incubando durante 30 min. El proceso de elución se repitió una vez y los eluatos fueron combinados. Las muestras fueron posteriormente tratadas con 55 mM iodoacetamida para su alquilación durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los eluatos fueron analizados por SDS-PAGE y bandas puntuales o el carril entero (de corridas de aproximadamente 1 cm) fueron escindidas para su posterior análisis por espectrometría de masa. Para verificar que la interacción entre las Trxs y sus blancos fuera mediada por un disulfuro las proteínas silvestres fueron utilizadas como control.

Digestión triptica y análisis por espectrometría de masas – Las muestras fueron digeridas en el gel con 1 μg de Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) durante toda la noche a 37 °C. Una vez extraídos los péptidos del gel, cada muestra fue inyectada en una columna de fase reversa (EASY-Spray column, 50 cm $\times$ 75 μm ID, PepMap RSLC C18, 2 μm , Thermo Scientific) utilizando un sistema de nano-HPLC (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific). El análisis de péptidos fue llevado a cabo en un instrumento de LTQ VELOS nano-ESI equipado con trampa iónica lineal (Thermo Scientific). Los iones peptídicos fueron analizados con Xcalibur 2.1. El análisis de la información fue realizado utilizando PatternLab for Proteomics (version 3.2.0.3) con el que se generó una base de datos proteómica de *E. granulosus* utilizando información descargada de la Uniprot. Además, las masas de 127 contaminantes comunes fueron incluidas [119].

3.2

Ajustes de la unidad de plegamiento tiorredoxina en platelmintos parásitos: nuevas formas de unir centros ferrosulfurados

3.2.1 Una nueva clase de proteína relacionada a la tiorredoxina es capaz de unir centros ferrosulfurados.

Los resultados de este apartado se describen en el manuscrito:

“A new class of thioredoxin-related protein able to bind iron-sulfur clusters”

Hugo Bisio, Mariana Bonilla, Bruno Manta, Martín Graña, Valentina Salzman, Pablo S Aguilar,
Vadim N Gladyshev, Marcelo Comini and Gustavo Salinas

Todos los experimentos mostrados en el artículo fueron realizados por mí excepto los modelados por homología y los ensayos de actividad ferredoxina.

Original Research Communication

**Title: A new class of thioredoxin-related protein able to
bind iron-sulfur clusters**

**Author affiliation: Hugo Bisio^a, Mariana Bonilla^b, Bruno Manta^b, Martín Graña^c,
Valentina Salzman^d, Pablo S Aguilar^d, Vadim N Gladyshev^e, Marcelo Comini^b
and Gustavo Salinas^{a,f}.**

^a Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

^b Redox Biology of Trypanosomes Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

^c Bioinformatics Unit, Institut Pasteur Montevideo de. Montevideo, Uruguay.

^d Cellular Membranes Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay.

^e Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham & Women's Hospital and Harvard Medical School. Boston, USA.

^f Cátedra de Inmunología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Corresponding Author: Gustavo Salinas

Worm Biology Laboratory, Institut Pasteur de Montevideo. Mataojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay. Telephone number: +598 25220910 ext 179. E-mail: gsalin@fq.edu.uy

Keywords: thioredoxin, iron-sulfur, glutaredoxin, iron metabolism, thioredoxin-fold, iron-sulfur metabolism, Echinococcus.

Word count: 4963 , Reference numbers: 52

Number of grey illustrations: 5. Number of color illustrations: 0

Abstract

Aims: Members of the thioredoxin (Trx) protein family participate mainly in redox pathways and have not been associated with Fe/S binding, in contrast to some closely related glutaredoxins (Grxs). Cestode parasites possess an unusual diversity of Trxs and Trx-related proteins with non-explored functions. Here we addressed the biochemical characterization of a new class of Trx-related protein (IsTRP) and a classical monothiol Grx (EgGrx5) from the human pathogen *Echinococcus granulosus*. **Results:** The dimeric form of IsTRP coordinates Fe₂S₂ in a glutathione-independent manner; instead, Fe/S binding relies on the CXXC motif conserved among Trxs. This novel binding mechanism allows holo-IsTRP to be highly resistant to oxidation. IsTRP lacks canonical reductase activities. Mitochondrially targeted IsTRP aids growth of a Grx5 null yeast strain. Similar complementation assays performed with EgGrx5 revealed functional conservation for class II Grxs despite the presence of non-conserved structural elements. IsTRP is a cestode-lineage specific protein highly expressed in the gravid adult worm, which releases the infective stage critical for dissemination. **Innovation:** IsTRP is the first member from the thioredoxin family to be reported to bind Fe/S. We disclose a novel mechanism of Fe/S coordination within the Trx folding unit, which renders the cluster highly resistant to oxidation-mediated disassembly. **Conclusion:** We demonstrate that IsTRP defines a new protein family within the thioredoxin superfamily, confirm the conservation of function for class II glutaredoxin from non-phylogenetically related species and highlight the versatility of the Trx folding unit to acquire Fe/S binding as a recurrent emergent function.

Introduction

The thioredoxin (Trx) superfamily includes a wide range of proteins with diverse functions that share a common structural pattern, the thioredoxin fold unit, composed of a β -sheet consisting of four beta strands, surrounded by three α -helices (35). The prototypical Trx is of thiol-dependent oxidoreductase with a characteristic WCGPC dithiol active site motif, (16) that functions mainly as protein disulfide reductase. Thioredoxin reductase (TR) maintains Trxs in their reduced form (19, 33) at the expense of NADPH oxidation. Trx-related proteins (TRP) or Trx-like proteins also possess a Trx-fold with a canonical Trx active site and are involved in redox homeostasis (34). Glutaredoxins (Grxs), which utilize glutathione (GSH) as cofactor for their functions, also belong to the Trx superfamily (26). Grxs are clustered into three classes (44), with classes I and II being widely distributed. Class I Grxs possess a canonical CPYC active site and their main functions rely on their redox activity, particularly as protein disulfide and GSH-protein disulfide reductases, involved in an oxidoreduction cascade with GSH, glutathione reductase (GR) and NADPH (33). On the other hand, class II Grxs possess a typical CGFS active site and are functionally distinct: they exhibit low or no thiol-disulfide oxidoreductase activity (14, 21, 47, 53) and their main role relates to iron homeostasis (24). Mitochondrial class II Grxs, such as *Saccharomyces cerevisiae* Grx5 (ScGrx5), are usually indispensable components of the mitochondrial iron sulfur cluster assembly machinery (ISC), participating in Fe/S trafficking and assembly to apoproteins (24, 37). Fe/S are essential cofactors for oxidative phosphorylation, some Krebs cycle enzymes, protein synthesis, among other important pathways. This provides the basis for assessing the function of Grx5 (23). The ISC includes several proteins and is

essential for Fe/S synthesis in the mitochondria and, most likely, in the cytosol (24). The dependence to the mitochondria for *de novo* synthesis in the cytosol is controversial (38) but the most accepted view emphasizes that Fe/S synthesis starts in the mitochondria from which a sulfur-containing moiety is exported to the cytosol, in a process dependent of an ABC transporter and GSH, but details are not fully understood (43). In mammals, the presence of cytosolic and nuclear forms of some components of the ISC has raised the possibility that Fe/S could be synthesized *de novo* in these compartments (38). In any case, the cytosolic Fe/S protein assembly machinery (CIA) is necessary for further processing of Fe/S to cytosolic apoproteins (23). Finally, class III Grxs are restricted to angiosperms, possess a CC(M/L)(C/S) active site sequence and represent the large majority of the Grxs encoded in higher plants genomes. These proteins seem to be involved in the resistance of plants to a variety of different environmental conditions (44).

Generally speaking, Trx-fold proteins mainly serve as thiol/disulfide oxidoreductases and only a small subset binds metal ions (46). Class II and some class I Grxs bind Fe/S in a dimeric fashion, where the iron atoms of the cluster are coordinated by the N-terminal active site cysteine residue (Cys) of each subunit and by two non-covalently bound GSH molecules (4). Different types of Fe/S have been shown to be bound to Grxs, including rhombic $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$, linear $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^+$ and $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ (54). In addition to this canonical binding through GSH, an unusual mode of Fe/S coordination was reported in Grx2 from the teleost fish (8). The monomeric form of this protein can bind Fe/S using four Cys residues different from the CxxC active site. Trx-like ferredoxins (52) are also able to bind Fe/S. This type of ferredoxins forms homodimers bound by protein/protein interactions in which each subunit coordinates one $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ through four Cys residues

(29, 52). Although the function of these proteins is still unclear, they might be involved in nitrogen fixation, since it has been shown that they interact with a molybdenum-containing nitrogenase (15, 29). Finally, TrxA from *Escherichia coli* (27) and human Trx1 (46) are able to coordinate Fe/S when specific non-natural mutations are introduced in their sequences.

Parasitic tapeworm genomes have revealed an unexpected diversity of Trxs and Grxs (5, 49), but the functions of most of these proteins have not been examined. This diversity contrasts with the minimalistic arrangement of the upstream pathway, where GR and TR have been replaced by a single enzyme, the thioredoxin glutathione reductase (TGR), which provides electrons to Trxs and Grxs at expenses of NADPH (51).

Here we characterized an ortholog of yeast Grx5 in the tapeworm *Echinococcus granulosus* (Grx5), and a new Trx-fold protein, which we designate Iron-sulfur Trx-related protein (IsTRP) that is the first wild type Trx-like protein with Fe/S coordination capacity to be reported. We show that its Fe/S binding is GSH-independent, involves dimerization, and uses two Cys residues from each monomer as ligands for iron coordination of the cluster. A model for the relevance of IsTRP for Fe/S supply during infection of the intermediate host is proposed.

Results

Common and unique features of cestode IsTRP and Grx5.

IsTRP possesses a Trx-like domain, which unequivocally clusters with Trxs and Trx-related proteins in the phylogenetic analysis, and is distant to all other Trx-fold proteins (Fig. 1A). A conspicuous feature of IsTRP is the presence of an additional Cys residue immediately adjacent to the canonical active site CxxC motif, resulting in the CxxCC motif. Data mining of orthologous genes showed that IsTRP is encoded exclusively by the *Cyclophyllidea* order within the class *Cestoda* and is absent in any other sequenced lineage. Interestingly, the third Cys is conserved in most, but not all IsTRPs (Fig. 1B). None of the cestode IsTRPs has a sorting signal peptide. Since there are no RNASeq data of IsTRP in *E. granulosus*, we examined the expression data from *Echinococcus multilocularis* (pers. comm. Dr. Matt Berriman). This data mining indicated that IsTRP is highly expressed in the gravid adult (the stage that releases embryonated eggs to the environment) while very low expression is observed in other stages of the parasite (Fig. S1).

In contrast, Grx5 is a highly conserved mitochondrial class II Grx, with orthologous proteins present in a wide range of eukaryotic lineages. A remarkable feature of parasitic flatworms Grx5 is that they possess a unique insertion of 8 amino acids in an infrequent insertion site in the Trx superfamily, located between the active site containing α -helix and the following β -strand (Fig. 1C). Analysis of a homology-based model of *E. granulosus* Grx5 indicates that this element does not impose any significant constrain to the Trx domain folding core (Fig. S2). Interestingly, this insertion defines an extended loop located near the class II Grx acidic surface that is proposed to be

important for the interaction with its partners (21), and consists of an acidic surface on one side and a non-charged one on the other (Fig. S3). Grx5 from parasitic flatworms also harbor a non-conserved cysteine residue at the C-terminus of the α -helix containing the active site.

Dimeric IsTRP and Grx5 coordinate Fe/S.

IsTRP and Grx5 were expressed as His-tagged recombinant proteins in *E. coli* and affinity purified as a brownish solution with UV-visible spectra compatible with the presence of bound Fe/S. Size exclusion chromatography (SEC) of purified proteins revealed a mixture of monomeric and dimeric forms for both proteins (Fig. 2A and 2C). IsTRP eluted with an apparent molecular mass of 22 and 11 kDa, corresponding to the dimeric and monomeric forms, respectively (theoretical mass of the monomer 15.6 kDa). In the case of Grx5, the protein eluted with an apparent molecular mass of 54 and 35 kDa, likely corresponding to the dimer and monomer even though the theoretical mass of the monomer is 20.2 kDa. This shift in the apparent molecular mass of Grx5 is probably consequence of an increased radius due to a flexible N-terminal extension present in the recombinant protein (see full sequence in Fig. S2). For both IsTRP and Grx5, the fractions containing the dimers, but not those containing the monomers, displayed absorbance at 320 and 420 nm (Fig 2A and 2C) and a UV-visible spectra (Fig 3B and D) similar to Fe/S binding proteins (4, 54), suggesting Fe/S binding. Furthermore, the formation of dimers was dependent on cluster binding since EDTA treatment (Fig. 2A and 2B) decreased the dimer/monomer ratio. Moreover, in vitro reconstitution of Fe/S (Fig. 2E and 2F) increased the dimer/monomer ratio.

IsTRP coordinates 2Fe2S clusters.

The UV-visible spectrum of holo-IsTRP suggested the presence of a 2Fe2S in the cluster

bound by this protein. In order to confirm the nature and the stoichiometry of the cluster in holo-IsTRP obtained *in vivo* from *E. coli*, the iron and sulfur content was assessed using analytical techniques (Table 1). Iron was measured with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline and by atomic absorption, and sulfide was measured by the methylene blue technique. The results were consistent with the presence of one 2Fe2S center per dimer.

Fe/S coordination by IsTRP is stable, dependent on two Cys residues of the polypeptide chain and GSH independent.

In order to characterize Fe/S binding by IsTRP, absorbance of the holocomplex was followed over time in presence or absence of GSH and/or H₂O₂ (Fig. 3A). Experiments with Grx5 were carried out in parallel for comparison (Fig 3B). Interestingly, GSH did not increase stability of the Fe/S bound to IsTRP, in contrast to that coordinated by Grx5. Also, the IsTRP-bound Fe/S was far more stable (fifty-fold) to H₂O₂ treatment than that bound by Grx5, even when GSH was present in the Grx5 assay mixture (data not shown). We next examined the importance of IsTRP Cys residues in Fe/S binding using Cys→Ser mutants of each Cys residue (i.e., SxxCC, CxxSC and CxxCS). Fe/S coordination by wild type and mutant proteins was further assessed by a spectrophotometric analysis of recombinant proteins (Fig. 3C and 3D). Two cysteine residues, Cys 34 and Cys 37, corresponding to nucleophilic and resolving positions of catalytic cysteines in Trxs, respectively, were found to be essential for cluster binding by IsTRP since the 320/280 nm absorbance ratios of these mutants were 15% and 8% of the wild-type protein ratio. Also, these mutants displayed mostly a monomeric behavior when analyzed by size exclusion chromatography (data not shown). In contrast, the contiguous Cys 38 was not required for Fe/S binding by IsTRP. These data,

the lack of a stabilizing effect of GSH on holo-IsTRP and the absence of the characteristic GSH-binding site residues in the sequence, strongly support that IsTRP binds Fe/S by a GSH-independent mechanism. To further test this model, the holo and apo protein fractions of IsTRP and Grx5 obtained from *E. coli* were acid-precipitated and total low molecular weight thiols and GSH were measured (Table 2). The results indicated that neither GSH nor any other low molecular weight thiol was an integral component of the holo-IsTRP, while, as previously reported for canonical Fe/S Grxs (4), GSH was found as a cofactor for the holo-Grx5.

IsTRP did not exhibit canonical reductase activities.

The disulfide redox activity of the recombinant IsTRP and Grx5 were tested using the insulin (17) and HED (18) reduction assays; a canonical *E. granulosus* Trx (EUB56960.1) (7) and Grx (CDS21744.1) were used as positive controls. The apo- and holo- forms of IsTRP and apo-Grx5 were unable to efficiently catalyze the reduction of these substrates under the reaction conditions tested (Fig. 4A and 4B). A marginal catalytic activity in the HED assay by Grx5 was observed. Also, it is worthy to mention that the oxidized apo-IsTRP was reduced by TGR (AAN63052), but only at high concentration, in a NADPH-dependent assay (Fig. 4C). The Cys 34 and Cys 37 residues contributed to disulfide formation, since the corresponding Ser mutants showed a significant reduction in NADPH consumption by TGR. In particular, mutation of Cys 34, corresponding to the nucleophilic Cys in Trxs, led to a complete loss of TGR reductase activity with this substrate, indicating that this residue is involved in the disulfide formation. In order to test if IsTRP could catalyze the reduction of specific targets, pull down experiments were performed using the CxxS mutant. This strategy has proved to be very efficient, particularly for identifying targets of Trxs and Grxs in different

organisms (e.g. (45)). We examined protein extracts from the larval stage of *E. granulosus* (protoscolex) and gravid adult worms (the stage where IsTRP is highly expressed) from the closely related parasite *Hymenolepis microstoma* (non-infective to humans experimental model (12)). No specific targets were trapped: the same proteins were identified in the CxxS mutant, wild-type and buffer control samples. Finally, we tested whether IsTRP possesses ferredoxin activity in the cytochrome c reduction assay *in vitro*. No ferredoxin activity was detected for IsTRP, a spinach ferredoxin was used as a positive control (data not shown).

Grx5 and IsTRP can rescue the *S. cerevisiae* Grx5-deficient yeast phenotype.

We tested whether the *E. granulosus* Grx5 replaces the canonical yeast mitochondrial class II Grx (Grx5). As IsTRP belongs to the same protein superfamily as mitochondrial class II Grxs and both are able to coordinate Fe/S, we also examined whether IsTRP can replace *S. cerevisiae* Grx5. We expressed the *E. granulosus* IsTRP and Grx5 in the mitochondria of the *S. cerevisiae* Grx5 null mutant strain (30). As shown in Fig. 5, the mitochondria-targeted *E. granulosus* Grx5 rescued the growth defect of the mutant lacking Grx5 (Fig. 5A), which is also unable to grow using glycerol as the sole carbon source (Fig. 5B). The expression of IsTRP aids growth of the Grx5 null yeast strain (Fig 5A and 5B), since growth on a non-fermentable substrate cannot be sustained by the Grx5 null yeast strain (30). The aconitase to malate dehydrogenase activity ratios were also measured to assess the efficiency of Fe/S assembly (Fig 5C), further confirming the magnitude of the yeast rescued phenotype.

The Fe/S synthesis pathway genes are encoded in the genome of *Echinococcus granulosus* and controlled at the transcriptional level.

Since Fe/S synthesis in platyhelminthes had not been characterized yet, we examined

the presence of the known key genes involved in mitochondrial and cytosolic iron sulfur protein assembly machineries (ISC and CIA, respectively) in *E. granulosus* and *E. multilocularis* (a close related species with a similar life cycle) genomes. This survey indicated that complete ISC and CIA machineries are present in these organisms. Furthermore, the RNAseq data from *E. granulosus* (55) indicated that the genes are actively transcribed during most of the entire parasite life-cycle, with the exception of activated oncospheres (the newly released embryo in the intermediate host after hatching of the ingested egg), where almost all genes of the CIA Fe/S synthesis pathway and some of the ISC machinery (including Grx5) are completely silenced (Table 3).

Discussion

Parasitic flatworms have been previously shown to possess specific adjustments in their Trx and GSH pathways. Some of the striking features of these pathways were the replacement of conventional TR and GR by TGR and the GSH-independent reduction of glutathionylated proteins by TGR (6). Since Trx and GSH pathways are linked and streamlined in these organisms, the presence of several *trx* and *grx* genes in tapeworm genomes is also intriguing (49). In the current study, we identified and characterized two Trx-fold proteins of the tapeworm *E. granulosus*: a mitochondrial Fe/S-binding Grx5 that possess an unusual extended loop and IsTRP, a novel class of Trx-related protein that binds Fe/S independently of GSH and lacks classical thiol-disulfide oxidoreductase activity.

Metal coordination by Trx-fold proteins is not a random event since the majority of oxidoreductases within this superfamily undergo sequence and structural modifications to avoid metal binding (46). As shown in this study, IsTRP coordinates Fe/S through the Cys 34 and Cys 37 residues, which correspond to the homologous positions of nucleophilic and resolving Cys of Trxs, respectively. These highly conserved residues in Trxs do not coordinate Fe/S and in fact this binding would be highly disadvantageous for the oxidoreductase activity. In the reduced state, the resolving Cys of Trxs is partially occluded avoiding Fe/S binding and therefore, there must be some adaptations (permanent or induced) on the structure of IsTRP in order to locate the resolving Cys in the correct spatial location to coordinate the Fe/S. The homology model for IsTRP revealed that Cys 37 would be also occluded (Fig. S4). If the model is correct, the assembly of Fe/S in the apo-IsTRP must induce a conformational change in order to

allow Cys 37 to be available for binding. This conformational change could be similar to what has been proposed for the mechanism of *Escherichia coli* TrxA mutant, with a CACA active site that binds Fe/S (27). Upon Fe/S coordination, this protein would form dimers and one of the subunits would display a partial unfolding at the N-terminus of the active site α -helix (11). A similar conformational change may expose Cys 37 and allow this residue to coordinate Fe/S. Future efforts will be directed at gaining further insights into the structural features of IsTRP that allow this protein to replace the canonical oxidoreduction activity of TRPs for Fe/S binding.

Thus, if Fe/S is not a random event and requires structural adjustments of the fold, the coordination capacity of IsTRP is most likely physiologically relevant. A possible function for the Fe/S might be the regulation of the redox activity of the apoprotein, as proposed for class I Grxs (4). However, oxidoreductase activity was not detected in the canonical Trx and Grx assays and we did not succeed in identifying IsTRP targets using the CxxS mutant in pull down experiments. In any case, the high stability of the holocomplex implies that cluster disassembly to render the active form of IsTRP would demand harsh oxidizing conditions or the action of specific stimuli (e.g. protein partners). Alternatively, IsTRP may function as storage for Fe/S. The ability of IsTRP to slightly suppress the phenotype of the Grx5 null mutant yeast would suggest that this protein might be able to incorporate Fe/S in a eukaryotic system and collaborate in Fe/S transfer to other proteins. It should be noted that overexpression of other members of ISC, such as ferredoxin, can partially rescue the Grx5 knock out phenotype (37). The lack of ferredoxin activity of IsTRP rules out this possibility. Additional experiments need to be performed to obtain conclusive evidence regarding IsTRP specific function(s). On the other hand, we demonstrated here that *E. granulosus* Grx5

is able to replace Grx5 function in yeasts, despite having an extended loop in a non-canonical insertion site of the Trx fold. This provides further evidence of the functional conservation of mitochondrial class II Grxs among different lineages of life (31). Thus, the structural singularities of *E. granulosus* Grx5 may play a regulatory role or be important for parasite specific functions (*i.e.* interaction with parasite specific partners). It is important to mention that all genes involved in the Fe/S biosynthesis are present in platyhelminth parasites, a metabolic process which has not been studied in this lineage. Interestingly, the RNASeq data indicate that most of the genes of the Fe/S biosynthesis are silenced in activated oncospheres. The oncosphere is activated by gastrointestinal cues (e.g. pH), penetrates the intestinal wall and migrates through the circulatory system to internal organs (preferentially liver and lung), where it develops as the metacystode larval stage. The decrease in the synthesis of weakly bound Fe/S and the concomitant decrease of the source of free iron and sulfide are likely important during migration and establishment when the parasite is particularly exposed to the hostile environment imposed by the host. This raises the question of how is newly Fe/S supplied to essential enzymes (3, 23) during early infection in the intermediate host? We hypothesize that IsTRP might be relevant at this stage as ready to use storage of Fe/S preformed during egg generation. Indeed, IsTRP is highly expressed in the gravid adult (while Fe/S is still being synthesized) and the Fe/S bound to IsTRP is resistant to oxidation.

To sum up, this study describes an entirely new class of proteins of the thioredoxin fold unit: a thioredoxin-related protein that lacks classical oxidoreductase activity but can bind Fe/S by a unique mechanism, involving both Cys from the active site and no glutathione. Overall our results recapitulate some laboratory evolution experiments (27,

45) highlighting the versatility of the Trx folding unit that, in addition to the different adaptations for redox functions, also displays Fe/S binding as a recurrent emergent function.

Innovation

IsTRP defines a new class of a Trx-related protein able to bind Fe/S. We disclose a novel mechanism of Fe/S coordination within the Trx folding unit, which renders the cluster highly resistant to oxidation-mediated disassembly. IsTRP is present exclusively in some flatworm parasites and highly expressed in the gravid adult worm. In addition, we confirm the function of *E. granulosus* Grx5 in mitochondrial Fe/S biosynthesis, despite possessing distinctive parasite-specific features. Our results uncover lineage specific adaptations of the Trx fold and provide a putative pharmacological target for neglected diseases caused by flatworm infections.

Materials and Methods

Bioinformatics analysis. Genomic data was obtained from the Sanger Institute or generic databases. Multiple protein sequences alignments were generated with Clustalw (22). Maximum likelihood and neighbour-joining trees bootstrap values (500 replicates) were calculated using the MEGA 6 package/software (48).

Cloning of *E. granulosus* proteins for bacterial and yeast expression. The ORF of the IsTRP and Grx5 were amplified from cDNA of *E. granulosus* protoscolex total mRNA and cloned into pET28a (Novagen) using standard molecular cloning techniques, thereby introducing an N-terminal His-tag. Mutants of IsTRP were generated by site-directed mutagenesis using the overlap extension method (39). IsTRP and Grx5 constructs for yeast expression were generated by PCR amplification using pET28a constructs as DNA templates and cloned into the pMM221 plasmid (30). All primers and vectors generated are shown in Table S1. Constructs were sequenced in all cases.

Expression and purification of recombinant proteins. The recombinant protein expression was carried out in *E. coli* BL21(DE3) cells following standard protocols. Essentially, recombinant clones were grown on LB in the presence of kanamycin, and induction of recombinant proteins was carried out with 100 μ M isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside at early exponential phase ($Abs_{600nm} = 0.6$) over night at 25 °C. The bacterial cultures were centrifuged, and the pellets were resuspended in lysis buffer (300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, 10 mM imidazole, pH 7.2) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and sonicated. The lysates were centrifuged for 30 min at 20,000 x g, and supernatants were applied to a HisPur™ Cobalt Superflow Agarose column (Thermo), washed with 300 mM NaCl, 50 mM

sodium phosphate, 20 mM imidazole, pH 7.2, and eluted with 250 mM imidazole. When it is specified, 1 mM glutathione (GSH, Sigma) was added during all steps of purification. Protein concentrations were determined spectrophotometrically at 280 nm ($\epsilon_{280} = 7575$ and $5625 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for IsTRP and Grx5 respectively) and purity was assessed on 15% SDS-polyacrylamide gels, under reducing conditions. TGR_{C315} was produced and purified as previously described in (7).

Recombinant protein analysis. Protein fractions were subjected to gel chromatography on Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare), pre-equilibrated in PBS (pH 7.0), coupled to ÄKTA-FPLC system (GE) with online UV-visible detection. Standard globular proteins (6.5–75 kDa; GE kit) were used for the calibration of the columns. Absorbance at 280, 320 and 420 nm was recorded. UV-visible spectra and reducing SDS-PAGE gels were carried out for the purified fractions. For low molecular weight thiol-containing compounds determinations, size exclusion chromatography fractions were subjected to 5% trichloroacetic acid treatment during 30 min on ice for complete Fe/S disassembly, and 20.000 x g centrifugation, for protein removal. Samples were neutralized in all cases. DTNB recycling assay was performed, as previously described (32), for measuring total GSH and the Ellman's reaction was used to measure total free thiols, following manufacturer's specifications (Thermo). Protein concentration was measured prior to Fe/S disassembly. Iron determination was done using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline (Sigma) as previously described (28). Ferric iron was reduced using ascorbic acid (Fisher) and standard curves were performed using ammonium iron (II) sulfate (Aldrich). Sulfur determination was performed as described in (9, 41). Briefly, 150 μL of 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dissolved in 7.2 N hydrochloric acid and 150 μL of 30 mM ferric chloride in 1.2 N hydrochloric acid were added to a final volume of 1 mL.

1.5 mM zinc acetate was added to the reaction in order to avoid sulfide gas loss. The absorbance at 670 nm was determined after 20 min of incubation. Standard curves were performed using sodium sulfide. The Fe content of IsTRP was determined by atomic absorption using a Plasma Emission Spectrometer (Jarrell-Ash 965 ICP) in Chemical Analysis Laboratory, University of Georgia.

Fe/S reconstitution Assay. Purified IsTRP was treated with thrombin in order to obtain the tag-free protein and afterwards thrombin was removed by a p-aminobenzamidine–Agarose preppacked column (Sigma). In vitro Fe/S reconstitution of IsTRP was performed as described (4). 100-200 μ M of IsTRP was incubated under argon atmosphere at room temperature with 10 mM equivalents of *E. coli* cysteine desulfurase IscS, 2.5–5 equivalents of cysteine, 2–4 equivalents of $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, 1 mM GSH, 5 mM DTT and 10 μ M pyridoxal phosphate in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 200 mM NaCl.

Expression of IsTRP and Grx5 in Grx5-deficient *S. cerevisiae*. All employed yeast strains belong to the W303 genetic background and are summarized in Table S2. The plasmids were linearized by ClaI digestion and then used for transformation by the standard lithium salts method (1). Crosses between yeast strains, sporulation and tetrad analyses were carried out by standard genetic techniques. *S. cerevisiae* cultures were grown at 30°C in YPD, YPG (as YPD but with 3% glycerol instead of dextrose) or YPGal (as YPD but with 2% galactose instead of dextrose), as previously described (30).

Enzymatic tests. The insulin interchain disulfides reduction was performed as described in (17). The reduction of two interchain disulfides of insulin catalyzed by IsTRP in the presence of DTT was used as a measure of Trx activity. The reaction was followed by the increase in absorbance at 650 nm due to the precipitation of free

insulin β -chain. The 0.8-ml reaction mixtures contained 0.33 mM DTT, 130 μ M insulin and 2mM or non EDTA in 100mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Time courses with DTT alone and the reaction catalized by an *E. granulosus* Trx (2 μ M, EUB56960.1) were performed as controls. The glutaredoxin assay was performed as described previously (18). A reaction mixture containing 1 mM GSH (Sigma), 2 mM or non EDTA, 0.1 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 0.7 mM β -hydroxyethyl disulfide (Acros Organics), and 0.4 units of yeast glutathione reductase (Sigma) was preincubated for 2 min. Afterward, the protein was added and then the reduction of the mixed glutathione-hydroxyethyl disulfide followed by the oxidation of NADPH at 340 nm. Reduction of spontaneously oxidized IsTRP by the TGR_{C31S} mutant (lacking the Grx and glutathione reductase activities) (6) was performed as described in (20). The mixture containing 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 100 μ M NADPH, and 20 μ M IsTRP. The reaction was started by addition of 125 nM of TGR_{C31S}. Aconitase and malate dehydrogenase activities were assayed following the methods described in (36). Ferredoxin activity was determined following the generation of reduce cytochrome C at 550 nm. 0.3 mM NADPH, 50 mM Tris pH 8.5, 50 μ M cytochrome c (Sigma) and 47 nM of pea ferredoxin reductase (40). Up to 50 μ M IsTRP was added to the assay and 2.5 μ M spinach ferredoxin (Sigma) was used as positive control.

Pull down experiments. 1 mg of IsTRP_{wt}, IsTRP_{CxxS} mutant or only buffer samples were incubated for 30 min at 4°C under gentle agitation with Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen). The immobilized bait was then incubated with aqueous extracts obtained from 100 μ L of packed *E. granulosus* protoscolex or *H. microstoma* adult worms homogenized using a mortar and pestle under liquid nitrogen and sonicated.

After washing ten times with with 300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, 30 mM imidazole, pH 7.2, elution was performed with 10 mM DTT and 8 M urea. In-gel trypsin digestion was performed and the samples extracted from the gel were analyzed in a reverse phase EASY-Spray column, 50 cm × 75 µm ID, PepMap RSLC C18, 2 µm, (Thermo Scientific) and a LTQ VELOS nano-ESI (Thermo Scientific). PatternLab for Proteomics (version 3.2.0.3) was used for spectra analysis and protein identification (10).

Homology models generation. Crystal structures were retrieved from the PDB using the HHpred suite for distant homology detection (42). A multiple-template approach was taken using Modeller version 9v11 (50) to build models from the multiple structural alignments gathered by the HHsuite. 3ipzA, 2wulA, 2yanA and 3zywA were used as templates for Grx5. For TRP, the templates were 3m9jA, 2vimA, 4aj8A, 2yoiA and 4i8bA. The best models obtained from 50 iterations were determined with the DOPE method, included in the Modeller suite. Overall quality assessment of the final models was done with Coot (13). Electrostatic calculations were made with the Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (2). All figures illustrating protein structure were prepared using open-source PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

Acknowledgements

We thank Dr. Enrique Herrero (Universitat de Lleida, Spain) for provision of yeast strains and helpful experimental assistance, Dr. Matt Berriman (Parasite Genomics, Wellcome Trust Sanger Institute) for provision of data from *Echinococcus multilocularis* transcriptome, Dr Rosario Durán (Analytical and Biochemical Proteomic Unit, Institut Pasteur Montevideo) for technical assistance with proteomics, Dr. Néstor Carrillo for provision of purified pea ferredoxin and assistance with the ferredoxin assay and Dr. Massimo Bellanda (University of Padova) for helpful discussions. This work was supported by Universidad de la República, Uruguay (Grant Number I+D 625 to G.S. and INI 915 to H.B.), Agencia Nacional de Innovación e Investigación (POS_NAC_2012_1_8789), ICGEB Research Grant URU14-01 to G.S. and M.C, and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund, [COF 03/11]), and Seeding Labs.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Abbreviations:

CIA: cytosolic iron sulfur protein assembly machinery, DTNB: di-thio nitro benzoic acid, Fe/S: iron sulfur cluster, Grx: glutaredoxin, GSH: glutathione, ISC: mitochondrial iron sulfur cluster assembly machinery, IsTRP: Iron sulfur thioredoxin-related protein, ORF: open reading frame, TGR: thioredoxin glutathione reductase, TRP: thioredoxin-related protein, Trx: thioredoxin.

References

1. Agatep R. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol protocol. *Technical Tips Online* 3, 133–137, 1998.
2. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, and McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10037-10041, 2001.
3. Balk J, and Pilon M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci* 16: 218-226, 2011.
4. Berndt C, Hudemann C, Hanschmann EM, Axelsson R, Holmgren A, and Lillig CH. How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2? *Antioxid Redox Signal* 9: 151-157, 2007.
5. Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, Wilson RA, Dillon GP, Cerqueira GC, Mashiyama ST, Al-Lazikani B, Andrade LF, Ashton PD, Aslett MA, Bartholomeu DC, Blandin G, Caffrey CR, Coghlan A, Coulson R, Day TA, Delcher A, DeMarco R, Djikeng A, Eyre T, Gamble JA, Ghedin E, Gu Y, Hertz-Fowler C, Hirai H, Hirai Y, Houston R, Ivens A, Johnston DA, Lacerda D, Macedo CD, McVeigh P, Ning Z, Oliveira G, Overington JP, Parkhill J, Pertea M, Pierce RJ, Protasio AV, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Sajid M, Salzberg SL, Stanke M, Tivey AR, White O, Williams DL, Wortman J, Wu W, Zamanian M, Zerlotini A, Fraser-Liggett CM, Barrell BG, and El-Sayed NM. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460: 352-358, 2009.
6. Bonilla M, Denicola A, Marino SM, Gladyshev VN, and Salinas G. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminth parasites: alternative pathways for

- glutathione reduction and deglutathionylation. *J Biol Chem* 286: 4959-4967, 2011.
7. Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izmendi D, Gladyshev VN, and Salinas G. Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem* 283: 17898-17907, 2008.
 8. Brautigam L, Johansson C, Kubsch B, McDonough MA, Bill E, Holmgren A, and Berndt C. An unusual mode of iron-sulfur-cluster coordination in a teleost glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 436: 491-496, 2013.
 9. Carballal S, Trujillo M, Cuevasanta E, Bartesaghi S, Moller MN, Folkes LK, Garcia-Bereguian MA, Gutierrez-Merino C, Wardman P, Denicola A, Radi R, and Alvarez B. Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med* 50: 196-205, 2011.
 10. Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Yates JR 3rd, and Barbosa VC. PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. In: *Curr Protoc Bioinformatics*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2012, Unit13 19.
 11. Collet JF, Peisach D, Bardwell JC, and Xu Z. The crystal structure of TrxA(CACA): Insights into the formation of a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster in an Escherichia coli thioredoxin mutant. *Protein Sci* 14: 1863-1869, 2005.
 12. Cunningham LJ, and Olson PD. Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasites & Vectors* 3:123-131, 2010.
 13. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, and Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66: 486-501, 2010.
 14. Fernandes AP, Fladvad M, Berndt C, Andresen C, Lillig CH, Neubauer P, Sunnerhagen

- M, Holmgren A, and Vlamis-Gardikas A. A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from *Escherichia coli* can serve as a substrate for thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 280: 24544-24552, 2005.
15. Golinelli MP, Gagnon J, and Meyer J. Specific interaction of the [2Fe-2S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum* with the nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry* 36: 11797-11803, 1997.
 16. Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, and Lillig CH. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 19: 1539-1605, 2013.
 17. Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* 254: 9627-9632, 1979.
 18. Holmgren A, and Aslund F. Glutaredoxin. *Methods Enzymol* 252: 283-292, 1995.
 19. Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn ME, Hudemann C, and Lillig CH. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* 33: 1375-1377, 2005.
 20. Johansson C, Lillig CH, and Holmgren A. Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 279: 7537-7543, 2004.
 21. Johansson C, Roos AK, Montano SJ, Sengupta R, Filippakopoulos P, Guo K, von Delft F, Holmgren A, Oppermann U, and Kavanagh KL. The crystal structure of human GLRX5: iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* 433: 303-311, 2011.
 22. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H,

- Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, and Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948, 2007.
23. Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460: 831-838, 2009.
24. Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, and Muhlenhoff U. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1491-1508, 2012.
25. Lill R, Srinivasan V, and Muhlenhoff U. The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation. *Curr Opin Microbiol* 22: 111-119, 2014.
26. Lillig CH, Berndt C, and Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1304-1317, 2008.
27. Masip L, Pan JL, Haldar S, Penner-Hahn JE, DeLisa MP, Georgiou G, Bardwell JC, and Collet JF. An engineered pathway for the formation of protein disulfide bonds. *Science* 303: 1185-1189, 2004.
28. Massey V. Studies on succinic dehydrogenase. VII. Valency state of the iron in beef heart succinic dehydrogenase. *J Biol Chem* 229: 763-770, 1957.
29. Meyer J. Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett* 509: 1-5, 2001.
30. Molina MM, Belli G, de la Torre MA, Rodriguez-Manzanique MT, and Herrero E. Nuclear monothiol glutaredoxins of *Saccharomyces cerevisiae* can function as mitochondrial glutaredoxins. *J Biol Chem* 279: 51923-51930, 2004.
31. Molina-Navarro MM, Casas C, Piedrafita L, Belli G, and Herrero E. Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria. *FEBS Lett* 580: 2273-2280, 2006.

32. Morgan B, Ezerina D, Amoako TN, Riemer J, Seedorf M, and Dick TP. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 9: 119-125, 2013.
33. Nordberg J, and Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-1312, 2001.
34. Pader I, Sengupta R, Cebula M, Xu J, Lundberg JO, Holmgren A, Johansson K, and Arner ES. Thioredoxin-related protein of 14 kDa is an efficient L-cystine reductase and S-denitrosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 6964-6969, 2014.
35. Pan JL, and Bardwell JC. The origami of thioredoxin-like folds. *Protein Sci* 15: 2217-2227, 2006.
36. Robinson JB, Jr., Brent LG, Sumegi B, Srere PA. An enzymatic approach to the study of the Krebs tricarboxylic acid cycle. In: *Mitochondria: A Practical Approach*, edited by Darley-Usmar VM, Rickwood D, and Wilson MT. Washington, DC: IRL Press, 1987, pp. 153–169.
37. Rodriguez-Manzanegue MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, and Herrero E. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13: 1109-1121, 2002.
38. Rouault TA. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech* 5: 155-164, 2012.
39. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (Eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p. 1659.
40. Shin M. Ferredoxin-NADP reductase from spinach. *Meth Enzymol* 23: 440–447, 1971.
41. Siegel LM. A direct microdetermination for sulfide. *Anal Biochem* 11: 126-132,

- 1965.
42. Soding J. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics* 21: 951-960, 2005.
43. Srinivasan V, Pierik AJ, and Lill R. Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* 343: 1137-1140, 2014.
44. Stroher E, and Millar AH. The biological roles of glutaredoxins. *Biochem J* 446: 333-348, 2012.
45. Sturm N, Jortzik E, Mailu BM, Koncarevic S, Deponte M, Forchhammer K, Rahlfs S, and Becker K. Identification of proteins targeted by the thioredoxin superfamily in *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog* 5: e1000383, 2009.
46. Su D, Berndt C, Fomenko DE, Holmgren A, and Gladyshev VN. A conserved cis-proline precludes metal binding by the active site thiolates in members of the thioredoxin family of proteins. *Biochemistry* 46: 6903-6910, 2007.
47. Tamarit J, Belli G, Cabiscol E, Herrero E, and Ros J. Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin. *J Biol Chem* 278: 25745-51, 2003.
48. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729, 2013.
49. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, Tracey A, Bobes RJ, Fragoso G, Sciutto E, Aslett M, Beasley H, Bennett HM, Cai J, Camicia F, Clark R, Cucher M, De Silva N, Day TA, Deplazes P, Estrada K, Fernandez C, Holland PW, Hou J, Hu S, Huckvale T, Hung SS, Kamenetzky L, Keane JA, Kiss F, Koziol U, Lambert O, Liu K, Luo X, Luo Y, Macchiaroli N, Nichol S, Paps J, Parkinson J, Pouchkina-Stantcheva N, Riddiford N, Rosenzvit M, Salinas G, Wasmuth JD,

- Zamanian M, Zheng Y, Cai X, Soberon X, Olson PD, Laclette JP, Brehm K, and Berriman M. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496: 57-63, 2013.
50. Webb B, and Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 47: 5.6.1-5.6.32, 2014.
51. Williams DL, Bonilla M, Gladyshev VN, and Salinas G. Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites. *Antioxid Redox Signal* 19: 735-745, 2013.
52. Yeh AP, Chatelet C, Soltis SM, Kuhn P, Meyer J, and Rees DC. Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol* 300: 587-595, 2000.
53. Zaffagnini M, Michelet L, Massot V, Trost P, and Lemaire SD. Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *J Biol Chem* 283: 8868-8876, 2008.
54. Zhang B, Bandyopadhyay S, Shakamuri P, Naik SG, Huynh BH, Couturier J, Rouhier N, and Johnson MK. 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* 135: 15153-15164, 2013.
55. Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, Zhu Y, Wang Y, Huang Y, Liu J, Kang H, Chen J, Wang L, Chen A, Yu S, Gao Z, Jin L, Gu W, Wang Z, Zhao L, Shi B, Wen H, Lin R, Jones MK, Brejova B, Vinar T, Zhao G, McManus DP, Chen Z, Zhou Y, and Wang S. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet* 45: 1168-1175, 2013.

Tables

Table 1. Concentration ratio of iron and sulfur to holo-IsTRP.

	[Fe]/[HoloProt]	[S ²⁻]/[HoloProt]
IsTRP	0.9 ± 0.1	0.89 ± 0.07

Iron was measured using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline and acid labile sulfur was measured using the methylene blue method (see methods). Concentration of holoprotein in the analyzed fraction was estimated by analytical SEC.

Table 2. Concentration ratio between low molecular weight thiols (LMWT) and GSH and apo- or holo-form of Grx5 and -IsTRP purified from *E. coli*.

	LMWT/Prot.		GSH/Prot.	
	Grx5	IsTRP	Grx5	IsTRP
holoprotein	0.51	0.01	0.43	<0.01
apoprotein	0.11	0.01	0.09	<0.01

GSH was added to all buffers during IMAC purification of both proteins and free GSH was removed afterwards by SEC.

Table 3. Transcription profiles of genes involved in the ISC and CIA assembly machinery from adult, oncosphere (Onc), protoscolex (PSC) and hydatid cyst membrane (Cyst) of *E. granulosus*.

Components of the ISC assembly machinery					
Gene ID		RPKM [*]			
		Adult	Onc [†]	PSC [†]	Cyst
NFS1	CDS19765	56	33	100	52
ISD11	EUB55154	695	964	131	306
FDXR	CDS18240	13	0	36	20
FDX2	EUB56835	16	105	52	0
FXN	CDS24551	74	122	61	85
ISCU	EUB64018	444	455	91	159
GRP75 [‡]	CDS17875	280	2170	372	610
HSC20 [§]	CDS23455	62	0	77	18
GRPE-L1/L2	EUB64601	82	77	96	81
Grx5	EUB62482	114	0	19	65
Components of the CIA assembly machinery					
Gene ID		RPKM [*]			
		Adult	Onc [†]	PSC [†]	Cyst
NUBP1	CDS22073	64	0	48	157
NUBP2	CDS21766	118	0	44	55
CIAPIN1	EUB62290	78	0	369	125
NDOR1	EUB64339	0	0	31	26
CIAO1	CDS16778	24	78	19	24

MIP18	CDS20555	50	0	11	0
Mms19	CDS16337	32	13	59	18
NARFL	CDS21645	30	0	19	39

Transcriptomic data was obtained from (55). An adapted figure from (25) illustrating Fe/S synthesis is shown in Fig. S5.

* Reads per kilobase per million mapped reads

† Onc and PSC were treated for activation prior to transcriptomic analysis

‡ Generic chaperone

§ Specific co-chaperone

Figure legends

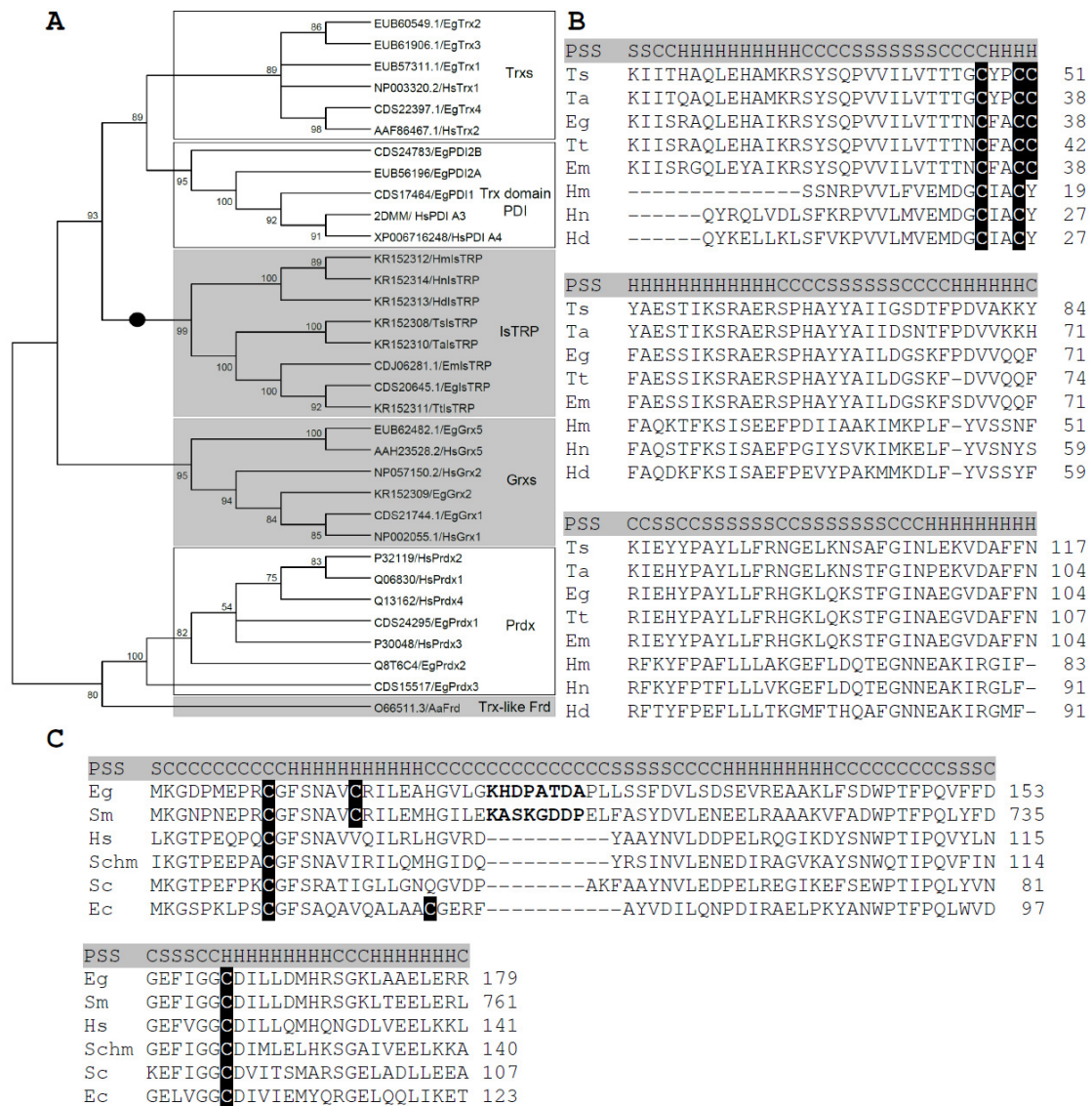


Figure 1. IsTRP and Grx5 alignment and phylogenetic analysis. A. Simplified unrooted neighbour-joining phylogeny of some Trx superfamily members (Trxs: thioredoxins, Trx-domain of PDI: thioredoxin domain of protein disulfide isomerases, IsTRP: Iron sulfur thioreson-related protein, Grxs: glutaredoxins, Prdx: peroxiredoxins, Trx-like Frd: thioredoxin-like ferredoxin). Bootstrap values were calculated using 500 iterations. The members of the Trx fold that can coordinate Fe/S are shown in grey boxes (for IsTRP, the evidences stem from this work). Sequences specific of the *Cyclophyllidea* order

within the class *Cestoda* are pointed with a black circle on the branches. B and C. Protein sequence alignment of IsTRP and Grx5 ortholog proteins, respectively. Cysteine residues are highlighted in black. The residues of the insertion of tapeworm Grx5 are bolded. Predicted secondary structure (PSS) elements (highlighted in gray) are represented with (H) when it is α -helix, (S) when it is β -sheet and (C) when it is coiled. Ts. *Taenia solium* (IsTRP KR152308). Ta. *Taenia asiatica* (IsTRP KR152310). Eg. *Echinococcus granulosus* (IsTRP CDS20645, Grx5 EUB62482). Tt. *Taenia taeniformis* (IsTRP KR152311). Em. *Echinococcus multilocularis* (IsTRP CDJ06281). Hm. *Hymenolepis microstoma* (IsTRP KR152312). Hn. *Hymenolepis nana* (IsTRP KR152314). Hd. *Hymenolepis diminuta* (IsTRP KR152313). Sm. *Schistosoma mansoni* (Grx5 CCD60523). Hs. *Homo sapiens* (Grx5 AAH23528). Schm. *Schmidtea mediterranea*. Sc. *Saccharomyces cerevisiae* (Grx5 3GX8). Ec. *Escherichia coli* (Grx5 2WCI).

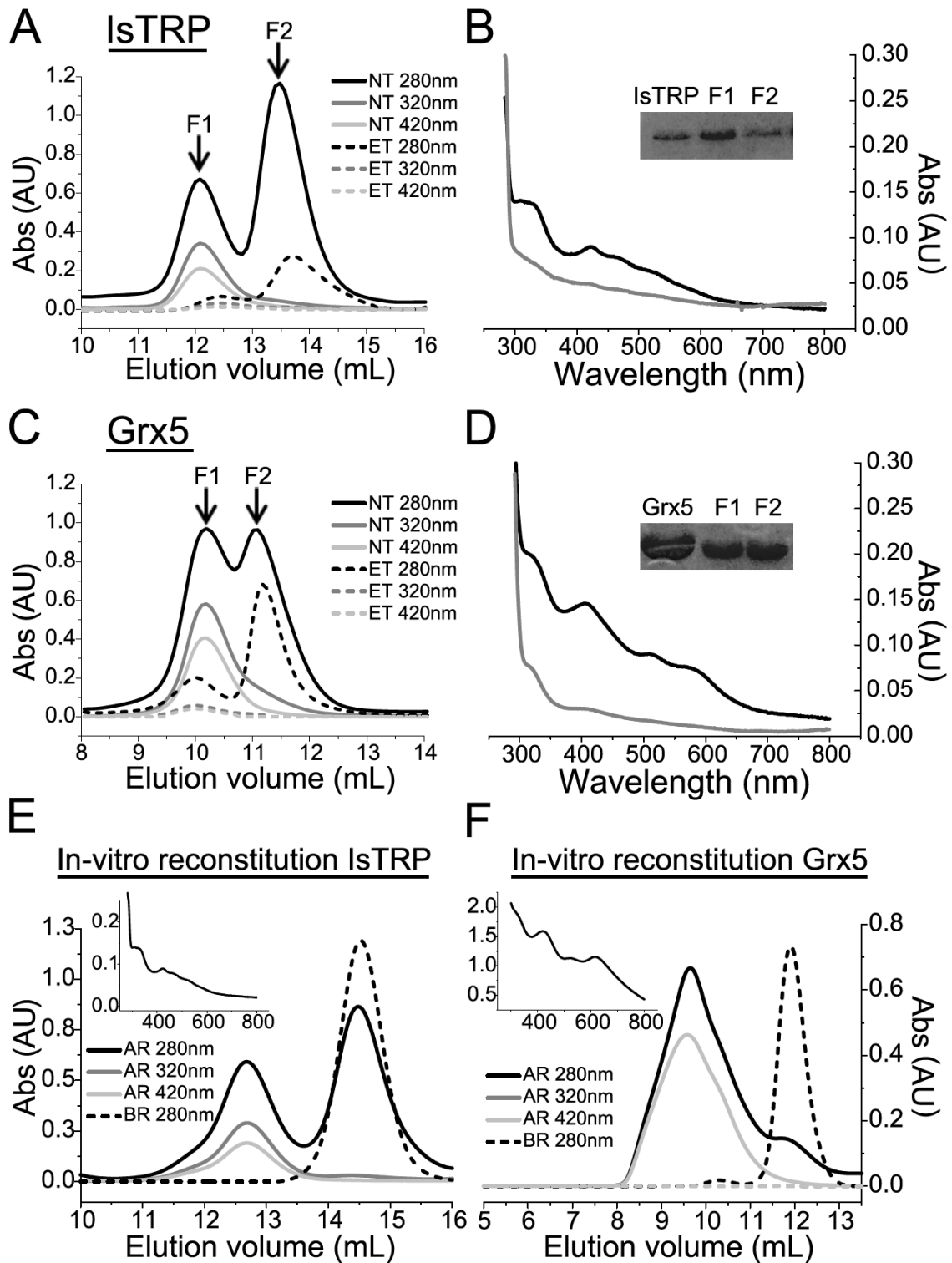


Figure 2. SEC and spectroscopic analysis of *E. granulosus* IsTRP and Grx5. Size exclusion chromatography analyses of IsTRP and Grx5 are shown in A and C respectively and were performed on a Superdex 75 10/300 GL column. Absorbance at 280 nm, 320 nm and 420 nm is shown for EDTA-treated (ET) and non-treated (NT)

samples. The UV-visible spectra and SDS-PAGE of fractions F1 (black) and F2 (grey) of the untreated samples are shown for IsTRP and Grx5 in B and D respectively. SDS-PAGE of recombinant proteins prior (left lane) and after (right lane) gel filtration are shown as an inset. E and F. Size exclusion chromatography of Fe/S reconstitution mixture for tag-free IsTRP and Grx5 respectively. Absorbance of the proteins after reconstitution (AR) and before reconstitution (BR) are shown. The spectra of the reconstituted proteins are shown in an inset.

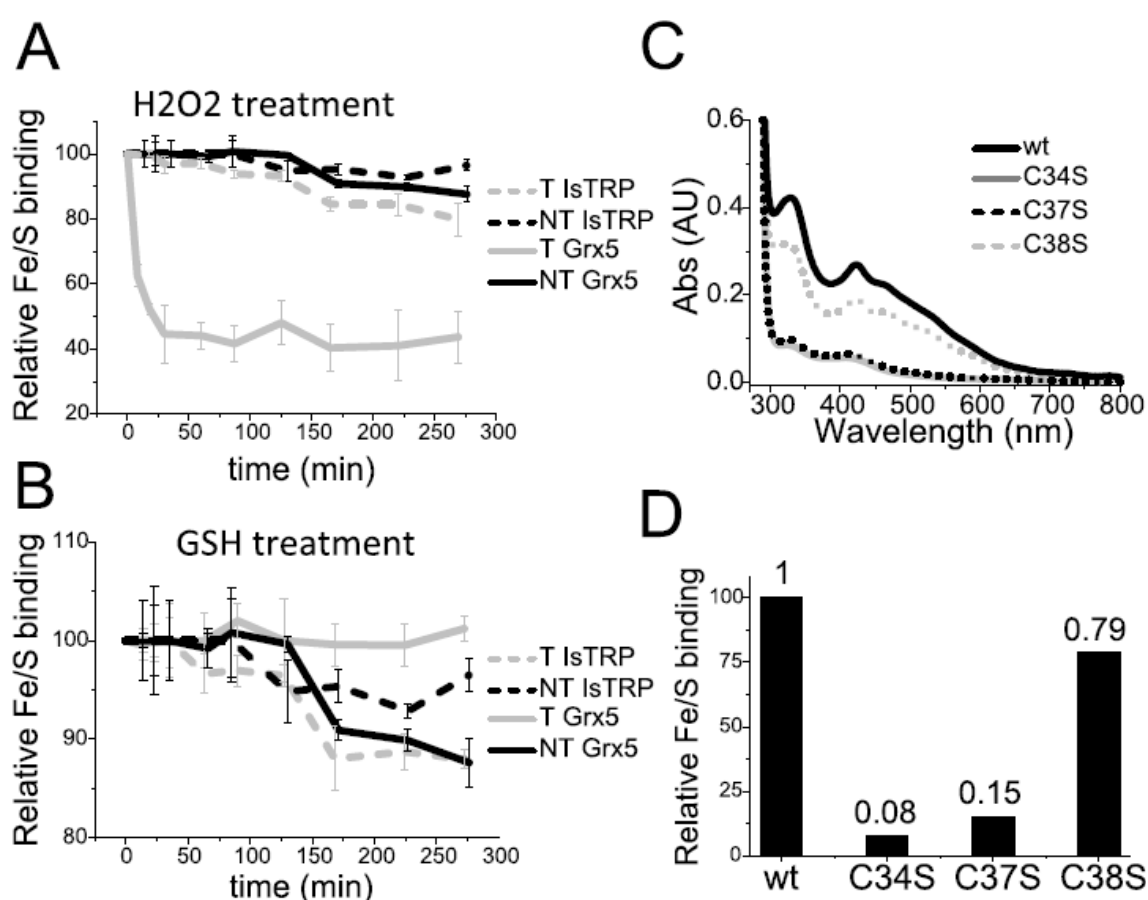


Figure 3. IsTRP and Grx5 Fe/S binding properties. A and B. Kinetics for the disassembly of holo-IsTRP and holo-Grx5 (NT) and upon treatment (T) with 10 mM of H₂O₂ or 3 mM of GSH. The loss of the Fe/S was recorded by following the decrease in absorbance at 320 nm. Error bars correspond to standard deviations of three replicates. C and D. The Fe/S coordination ability of wild type, Cys38Ser, Cys37Ser and Cys34Ser mutants was

analyzed by measuring the absorbance at 320 nm of the copurified holo-proteins. Protein concentration were between 300 and 200 μM . A representative UV-visible spectrum (normalized to protein concentration) of each protein species is shown in C and the corresponding 320 nm/280 nm ratio relative to the binding of the wild type protein is shown in D.

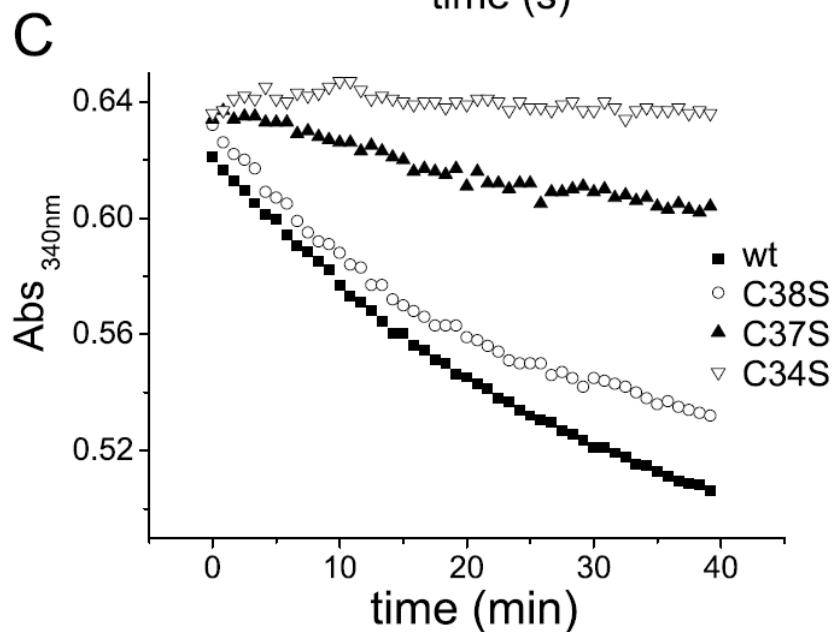
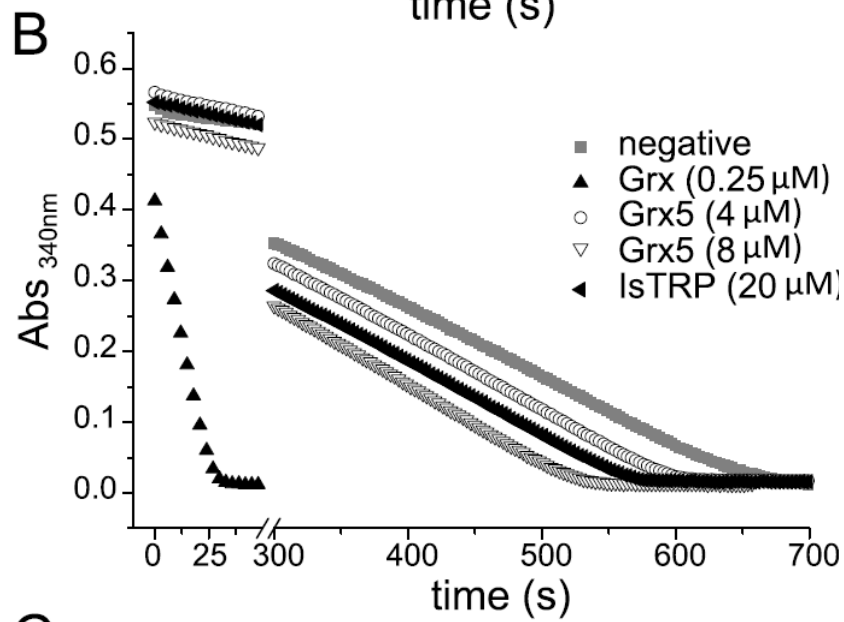
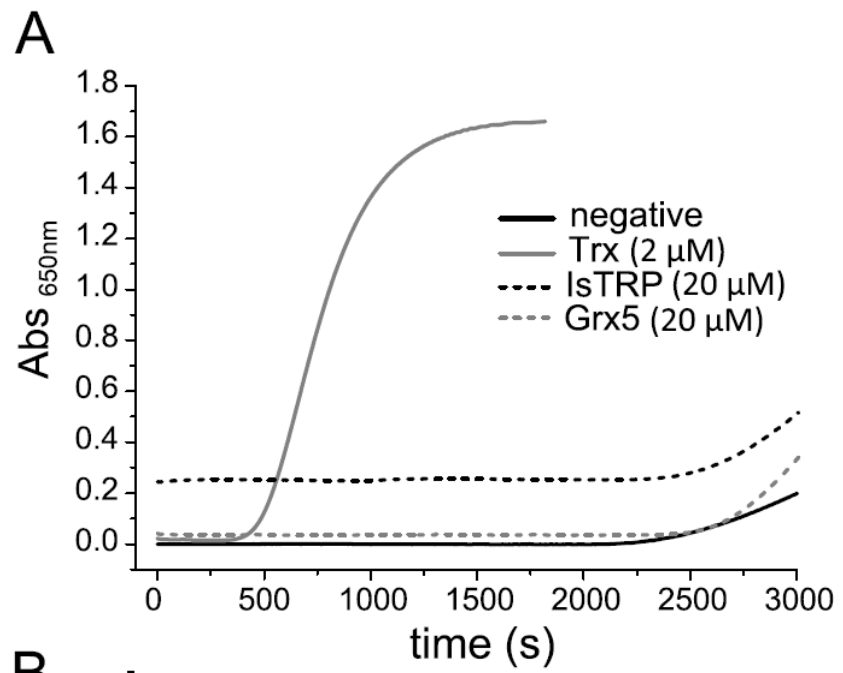


Figure 4. Activities of IsTRP and Grx5. A. Insulin reduction by dithiothreitol. 20 μ M of IsTRP and Grx5; and 2 μ M of a Trx from *E. granulosus*. The absorbance at 650 nm is plotted against time. B. HED activity assay. The capacity of IsTRP, Grx5 and a Grx from *E. granulosus* to de-glutathionylate was evaluated. NADPH oxidation was followed by measuring absorbance at 340 nm. The full time courses obtained are shown. C. Reduction of 20 μ M wild type IsTRP (black) and mutants Cys to Ser by the TGRC31S (a TGR mutant that conserves full thioredoxin reductase activity but lacks glutathione reductase activity). 125 nM of TGRC31S was used for the assay. Representative full time courses of NADPH oxidation are shown.

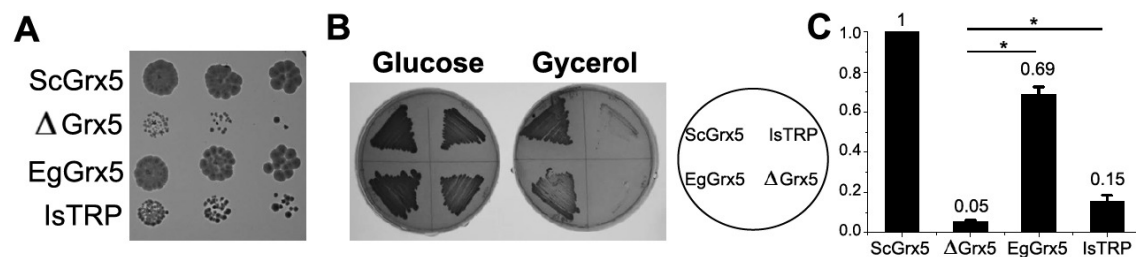


Figure 5. Rescue of the Δ Grx5 mutant defects by Grx5 and IsTRP. A. Growth plates after 3 day-incubation at 30°C on YPD. From left to right 1:5 serial dilutions of exponential cultures were spotted. B. Growth on YPD or YPGly plates after 3 days at 30°C. *S. cerevisiae* Grx5 (ScGrx5), *E. granulosus* (EgGrx5), *E. granulosus* IsTRP (IsTRP) and null mutant (Δ Grx5) are shown. C. Ratio between the Fe/S containing enzyme aconitase and the non-Fe/S containing enzyme malate dehydrogenase activities in exponential cultures at 30°C in YPGal medium. Values were normalized with respect to strain MML240 that expresses yeast Grx5-HA. The values are the mean of three experiments with standard deviations. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA (p-value < 0.05).

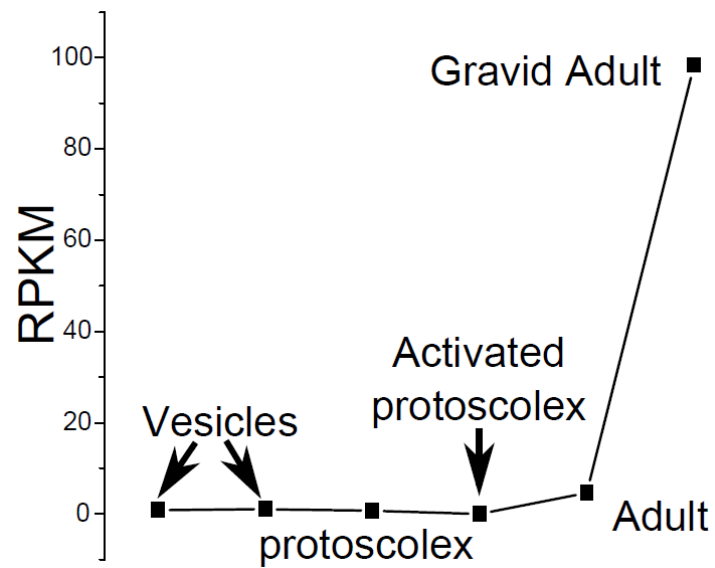


Figure S1. Transcription profiles of IsTRP from gravid adult, adult, activated protoscolex, protoscolex and vesicles of *E. multilocularis*. Transcriptome analysis was performed by the Parasite Genomics platform in the Wellcome Trust Sanger Institute. The data is reported as reads per kilobase per million mapped reads (RPKM).

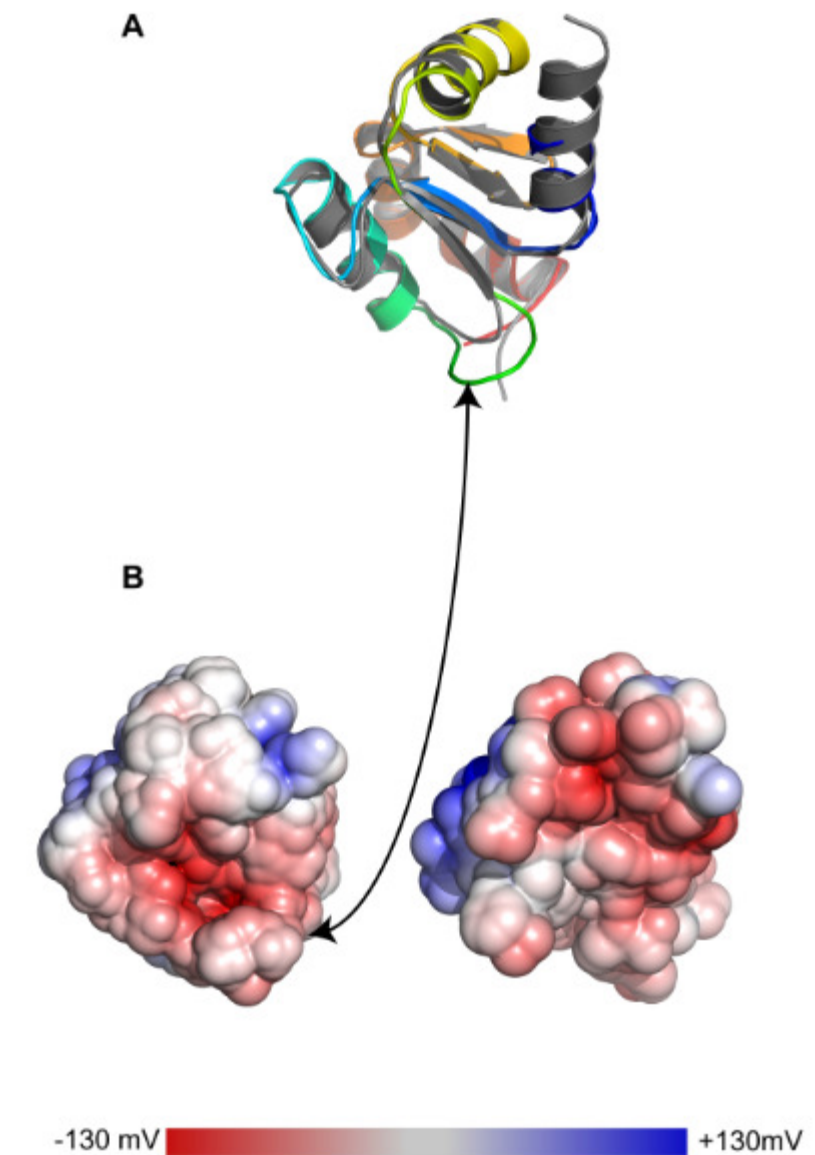


Figure S2. Structure homology comparison of Grx5 from *S. cerevisiae* and *E. granulosus*. A. Cartoon representation of a homology model for EgGrx5 3D structure. EgGrx5 is color-coded from blue to red, for N-terminal and C-terminal and superposed to yeast Grx5 (grey cartoon; PDB access code: 3gx8). The insertion discussed (pointed by an arrow) in the text has multiple possible conformations, and an average loop is depicted (green region). Such loop would line a major groove of the protein surface. B. Electrostatic representation of both monomers, represented as solvent accessible

surfaces. The loop (pointed by an arrow) in EgGrx5 (left panel), would define a protrusion, absent from the yeast orthologous protein (right panel).

```

> EgGrx5
      MSP
MLLRAFSKLRILPLSAVRLAQGSVSFLHSSTLLVQFSKTVRPTFAALPTRISVRS

      Grx domain
SSEASSPPELDKALRNRLTELTTCTRVVVLMKGDPMEPRCGFSNAVCRILEA

      Grx domain
HGVLGKNDPATGAPLLSSFDVLSDEVREAAKLFSDWPTFPQVFFDGEFIGG

      Grx domain
CDILLDMHRSGKLAAELERRGIGSLLNEKEKGKKN-
  
```

Figure S3. Full sequence of *E. granulosus* Grx5. The full amino acid sequence of Grx5 is shown. The sequence encoded in the expression plasmid for the recombinant protein (pH08, see table S1) is bolded. The active site is highlighted in grey and the predicted mitochondrial signal peptide (MSP) and the Grx domain are also shown.

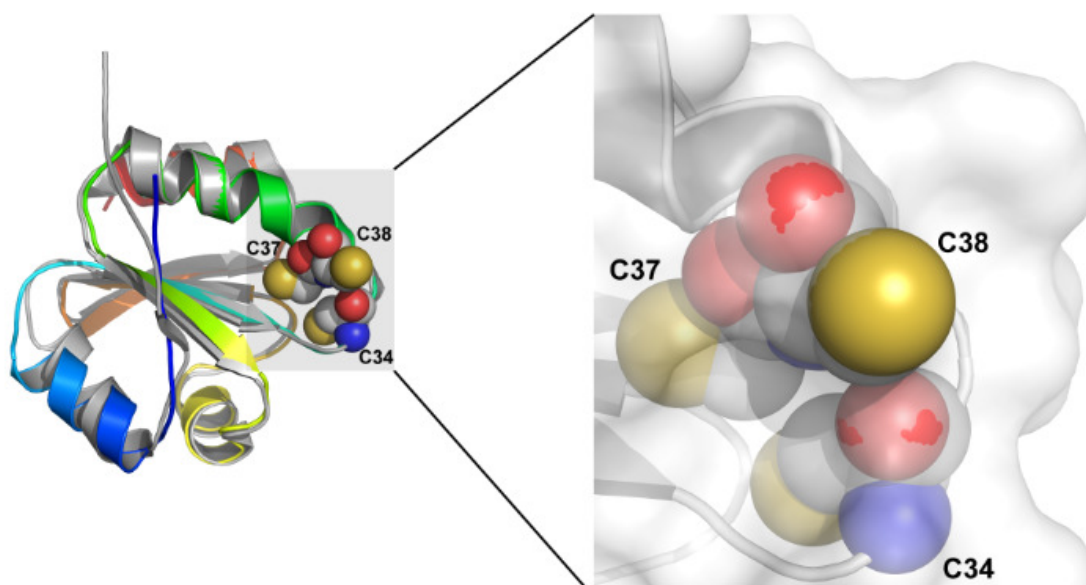


Figure S4. Structure homology comparison of IsTRP monomer with thioredoxin 1 from yeast. Cartoon representation of a homology model for IsTRP 3D structure (color-coded from blue to red, for N-terminal and C-terminal) superposed to yeast thioredoxin 1 (grey cartoon; PDB access code 3f3q). Depicted as spheres are the three

cysteines in IsTRP. An inset of the active site is shown on the right, to provide perspective onto group orientation respect to a transparent molecular surface. Color code for spheres: orange, sulfur; white, carbon; red, oxygen; blue, nitrogen. Solvent exposure for Cys34 and 37 is variable among the models.

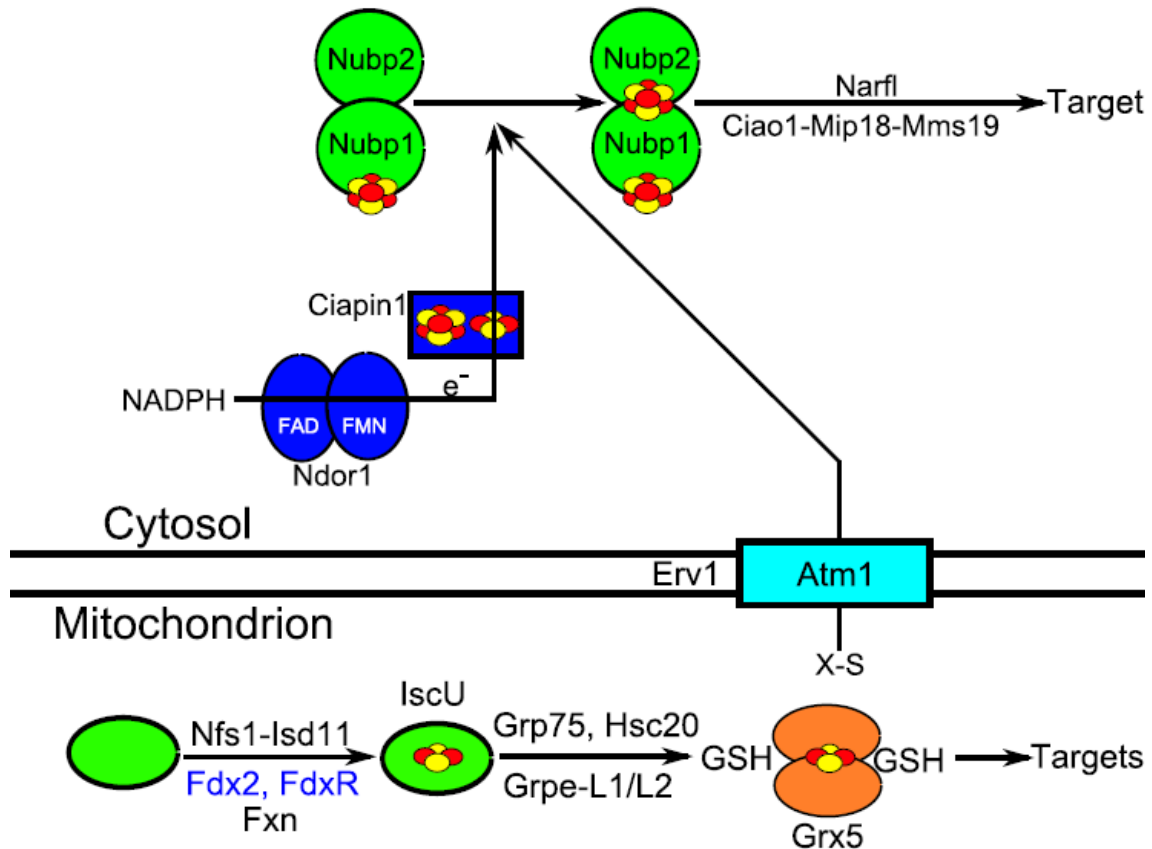


Figure S5. Illustration of Fe/S synthesis machinery in mammals. This figure was adapted from Lill, et al. 2014 (25). X-S represents the sulfur containing moiety exported from the mitochondria and sulfur and iron atoms are represented in yellow and red respectively. Scaffold proteins are shown in green and proteins involved in electron transport in blue.

3.2.1.1 Proceso de revisión:

Please find attached the revised version of the manuscript “A new class of thioredoxin-related protein able to bind iron-sulfur clusters” by Bisio et al. We thank the reviewers for the comments and constructive criticisms, which clearly have helped to improve the quality of the manuscript. A new Figure with the data required by reviewer 5 regarding the enzymatic activities was incorporated into the manuscript. We also performed statistical analysis of the data and new experiments to get additional insights about the putative function of IsTRP, which have also been incorporated into the manuscript. Based on some of the reviewers’ comments and the results obtained, we carefully revised claims and conclusions to avoid any overstatements. We hope the manuscript is now suitable for publication in *Antioxidants and Redox Signaling*.

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

Summary:

The manuscript by Bisio et al describes basic characteristics of IsTRP, a prototype from a new class of Trx-related protein from *Echinococcus granulosus* that binds Fe/S.

Broad-Scope Comments:

The evidence presented in this manuscript supports the characteristics and biological function of IsTRP claimed by the authors. For those less familiar with the biology of these systems, additional explanation of the connection between the ability of IsTRP to partially rescue the *S. cerevisiae* Grx5 null mutant strain and the conclusion that IsTRP mediates the transfer of Fe/S in vivo to apoproteins would be helpful. It may be possible to infer that such transfers take place, but direct evidence is not provided. This would strengthen the manuscript.

Reply: We agree with the reviewer that the manuscript does not provide direct evidence that IsTRP mediates the transfer of Fe/S in vivo to apoproteins. In order to gain direct evidence of the biological function of the protein we performed pull down experiments from protoscolex aqueous protein extracts using recombinant IsTRP. These experiments did not allow interactors to be identified. This may be due to lifecycle stage of the parasite used in these experiments,

since IsTRP is highly expressed in the adult gravid worm, a material that neither can be recovered from infected dogs in secure conditions, nor can be obtained in culture from protoscolex in vitro. Thus, we searched for interactors using gravid adult worms of the closely related tapeworm *Hymenolepis microstoma*, whose entire life cycle can be maintained in laboratory conditions and possesses an orthologous IsTRP. These experiments did neither help to identify interactors. We would like to mention that *Echinococcus granulosus* (or any other tapeworm) are non-tractable genetically precluding direct evidence from a reverse genetic approach. As requested by the reviewer we included a couple of additional sentences regarding the relationship between Fe/S transfer and the rescue of the *S. cerevisiae* Grx5 null mutant strain.

Specific Comments:

1) Page 8, line 41: The absorbance ratio of 320 nm / 280 nm is cited here as the spectral characteristic employed to assess the relative Fe/S binding of IsTRP mutants, but the 420 nm / 280 nm ratio is described as being the important ratio in the Fig. 4 caption. This discrepancy should be resolved.

Reply: The error has been corrected in Figure 4 legend for consistency.

2) Page 14, last sentence: A citation should be provided for the laboratory evolution experiments described.

Reply: References were added.

3) Throughout the manuscript, including Figures: Use periods instead of commas to indicate decimal points.

Reply: Done.

4) Figures 3 and 4 need to be made more reader-friendly: Add legends to describe the line traces in both figures. If necessary, break apart subsections of these figures into different / separate figures. For Figure 3, label each panel with the name of the relevant protein. For Figure 4 provide a brief title to each graph such as “H2O2 treatment” for panel A. For Figure 4, panel B indicate any statistically significant differences between samples of the same protein but different GSH treatment when they occur at particular time points.

Reply: Done. We thank the reviewer since the suggested modifications help to deliver clearly the results presented in these “dense” Figures.

5) Figure 5, panel C: Indicate statistically significant differences between yeast cultures (including p-values).

Reply: Done.

6) Page 10, lines 17-53: Reference 52 should be cited here in the main text, since that is where the transcriptomic data came from.

Reply: Done.

7) Figure S2: Include a legend for easy interpretation.

Reply: A legend has been added as requested. Also, Figure S2 was moved to the main text (included as panel C in the new Figure 4), considering reviewer 5 request of including a Figure with the insulin and HED reduction assays. Therefore, the reduction of oxidized IsTRP by TGR naturally fits in this Figure.

8) Figure S3: Cite the source of the data in a more detailed way so that readers can readily access it if desired. If the authors did not create the figure themselves, permission may be needed from the copyright owner if it is to be included as part of this manuscript.

Reply: Done. The data was kindly provided by Dr. Matthew Berriman from Wellcome Trust Sanger Institute (Hinxton, UK). This is now also included in the results section, in addition to acknowledgements. A manuscript analyzing the entire transcriptome of *Echinococcus* will be published soon by Dr. Berriman's group together with the publicly available data (M. Berriman personal communication). The figure is original so there is no need for copyright permission.

9) Figure S5: Permission to adapt and reprint this figure will be needed from the copyright owner.

Reply: We have contacted the corresponding author and the editorial, according to them there is no need of copyright permission, just the reference. In any case, we changed entirely the Figure, maintaining the reference.

Reviewer: 2

Comments to the Author

Thioredoxins and glutaredoxins are very diverse in parasitic tapeworm genomes and in this manuscript the authors have examined a new Trx-fold protein which is designated iron-sulfur-Trx-related protein. This IsTRP is a dimeric Fe/S protein with a unique mode of binding of the iron-sulfur cluster involving Cys residues from each monomer and is GSH independent. The protein is shown to be unusually resistant to oxidation but can supply the Fe/S cluster to other proteins. Also an ortholog of yeast Grx 5 has been characterized from the worm. Overall this remarkable organism has no TrxR and GR and instead use a thioredoxin glutathione reductase (TGR) to provide electrons to Trx and Grx proteins.

This paper contains a wealth of information and contains significant results presented in an elegant way.

Reviewer: 3

Comments to the Author

The present manuscript describes an interesting new mechanism of Fe/S coordination by a new class of Trx-related protein able to bind Fe/S, which exclusively exists in in some flatworm parasites and highly expressed in the gravid worm. The major finding is identification of a thioredoxin - related protein that lacks classical oxidoreductase activity but can bind Fe/S by a unique mechanism, involving both Cys from the active site in a glutathione independent manner. The identified mechanism with a restriction to a potentially pathogenic species reveals a putative pharmacological target for neglected diseases caused by flatworm infections as suggested by the authors. The study seems well performed and the method used sounds state of the art.

Reviewer: 4

Comments to the Author

This manuscript reports characterization of two thioredoxin family proteins from parasitic worms. The major finding is that the proteins examined coordinate iron-sulfur clusters, as determined by the absorbance characteristics of the proteins purified from expression in *E. coli*. Mutagenesis was performed to determine the requirements for cluster binding. In addition, the capabilities of these proteins in in vitro reductase activity assays and in vivo rescue of yeast deleted for a mitochondrial glutaredoxin were examined. The text describes these studies in a clear and straightforward manner.

The weakest part of the presentation is probably the structure figures, which are not particularly aesthetic or informative. Though there is no experimental structure determination in this work, homology modeling was done, which serves as the basis for the ribbon representations in Fig. 2 and Fig. S4. This referee feels that there is no added value for the homology modeling, and that all the relevant information regarding cysteines and insertions can be gleaned from Fig. 1.

Should the authors/editor nevertheless want to keep the homology modeling as part of the paper, it should be noted that the two arrows in Fig. 2 are not described in the legend. One presumably points out the insertion in EgGrx5, and the other points to a blow-up of the active-

site region, but this left panel is not described in the legend. In Fig. S4, the axis around which the protein is rotated approximately 90 degrees is not clear from the squiggle shown. Furthermore, Fig. S4 as shown does not make the intended point that Cys37 is buried.

Reply: Following the reviewer suggestion the original Figure 2, depicting the homology model has been moved from the main text to the supplementary material (Figure 2 is now Figure S2). The arrows are now described in the legend. We have modified Fig. S4 to show the intended point of solvent exposure of Cys residues.

Reviewer: 5

Comments to the Author

This work by Bisio and collaborators describes a thioredoxin from the cestode *Echinococcus granulosus* that binds Fe₂S₂ clusters. This function resembles the one described for some glutaredoxin members. However, in contrast to the later, the novel thioredoxin binds to Fe₂S₂ as a homodimer in the absence of glutathione. Both cysteines in the CXXC motif appear to coordinate the cluster. Transcriptional analysis suggests expression of this thioredoxin member in the gravid proglotid. The findings are potentially interesting. However, there are several issues that are not completely clear in the manuscript.

Major points:

Data described in page 9, paragraph starting on line 14, should be shown in a figure. The authors consider this information important as suggested by the fact that it is mentioned in the abstract. Grx5 should be included as control because IsTRP is used later in the paper to complement a *S. cerevisiae* lacking grx5.

Reply: Done. We now included the results as Figure 4 in the main text. The experiments were repeated in order to use Grx5 as control as suggested by the reviewer. Also, Figure S2 was moved to the main text and included as panel C into Figure 4 since the reduction of oxidized IsTRP by TGR naturally fits in this Figure.

Complementation of the yeast grx5 mutant with IsTRP is poor at best and nonexistent in the case of the aconitase and malate dehydrogenase assays. The lack of meaningful complementation raises concerns about the in vivo relevance of the investigations. It is difficult to assign a function to IsTRP and its novel coordination of Fe₂S₂ clusters.

It is not clear what the data in figure 5C intend to show. What do you mean by aconitase to malate dehydrogenase activity ratios.

Reply: We agree with the reviewer that complementation of yeast Grx5-deficient strain is poor. There are several phenotypes that can be observed or measured in the Grx5 complementation experiments: one of them is to measure the activity ratio of a Fe/S containing enzyme (typically aconitase) and a non-Fe/S containing enzyme (usually malate dehydrogenase). Panel C on Figure 5 intended to show this, but clearly it was not explained. This has now been amended in the legend of the Figure and an additional sentence was included (in the introduction) regarding the importance of the biosynthesis of Fe/S for essential processes. The reviewer was correct pointing out that the increase in the aconitase/malate dehydrogenase activity ratio in the IsTRP complemented strain is marginal, but statistically supported at $p=0.05$ (statistical analysis was required by review 1). Also, growth on a non-fermentable substrate (glycerol) is not supported by yeast Grx5-deficient strain (Molina, M.M., et al. J Biol Chem, 2004. 279(50): p. 51923-30), and although poorly, IsTRP aids growth in this media. In any case, based on the reviewers' comments and considering all the experiments, we carefully revised claims and conclusions to avoid overstatements. The abstract and discussion were modified accordingly to be extremely cautious regarding the conclusions drawn. In order to get direct evidence and additional insights about the putative function of IsTRP, we also performed new experiments: we searched for interactors/targets, which have also been incorporated into the manuscript. Finally, we would like to mention that *Echinococcus granulosus* (or any other tapeworm) are non-tractable genetically precluding direct evidence from a reverse genetic approach.

Data in Table 3 is poorly described. It seems that this information was not collected in this study. This reviewer is not sure of the usefulness of the data, but if presented the studies should be performed in *E. granulosus* rather than *Echinococcus multilocularis*.

Reply: The original data in table 3 was reported in (Zheng, H., et al. Nat Genet, 2013. 45(10): p. 1168-75) and belongs to a transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus*. We have now added the reference in the text and kept the reference in the table (where originally was in the manuscript). Concerning the relevance of the table, we think that provides useful and interesting information. On the one hand, the presence of the complete set of genes encoding the Fe/S biosynthesis machinery has not been previously reported for platyhelminth parasites. On the other hand, the fact that many genes that code for the biosynthesis of Fe/S are silenced in the activated oncosphere stage of the parasite life cycle, and that IsTRP expression is massively

increased immediately before that stage, allow us to speculate about the possibility that IsTRP might function as a storage for Fe/S, as proposed in the discussion.

Minor points:

Line 27, write thiol-sulfide oxidoreductase.

Reply: Changed to thiol-disulfide oxidoreductase.

Add legends to the figures. The lack of legends makes unnecessarily difficult the interpretation of the figures.

Reply: Done.

Add amino acid residue number in figure 1.

Reply: Done.

Figure legend 4: indicate the protein used in this studies. How much protein was used here? Panels C and D appear to be mislabeled.

Reply: Done. Now figure 3. The protein concentration used is now included in the figure legend.

Add axis to panel C in figure shown in page 43.

Reply: Done.

3.2.2 La Grx5 es capaz de coordinar Fe/S de manera GSH independiente *in vitro*.

Como se mencionó en el anterior apartado, la titulación de GSH que copurifica con Grx5 expresada en *E. coli* no muestra una estequiometría uno a uno en relación a la concentración de holoproteína, como habría de esperarse para el mecanismo típico de unión dependiente de GSH (ver Fig 1.11). Esta observación, nos llevó a considerar la posibilidad que parte de la holoproteína se generase por unión en ausencia de GSH. Para probar esta hipótesis se realizaron ensayos de reconstitución *in vitro* de Fe/S en ausencia o presencia de dicho cofactor (Fig. 3.11).

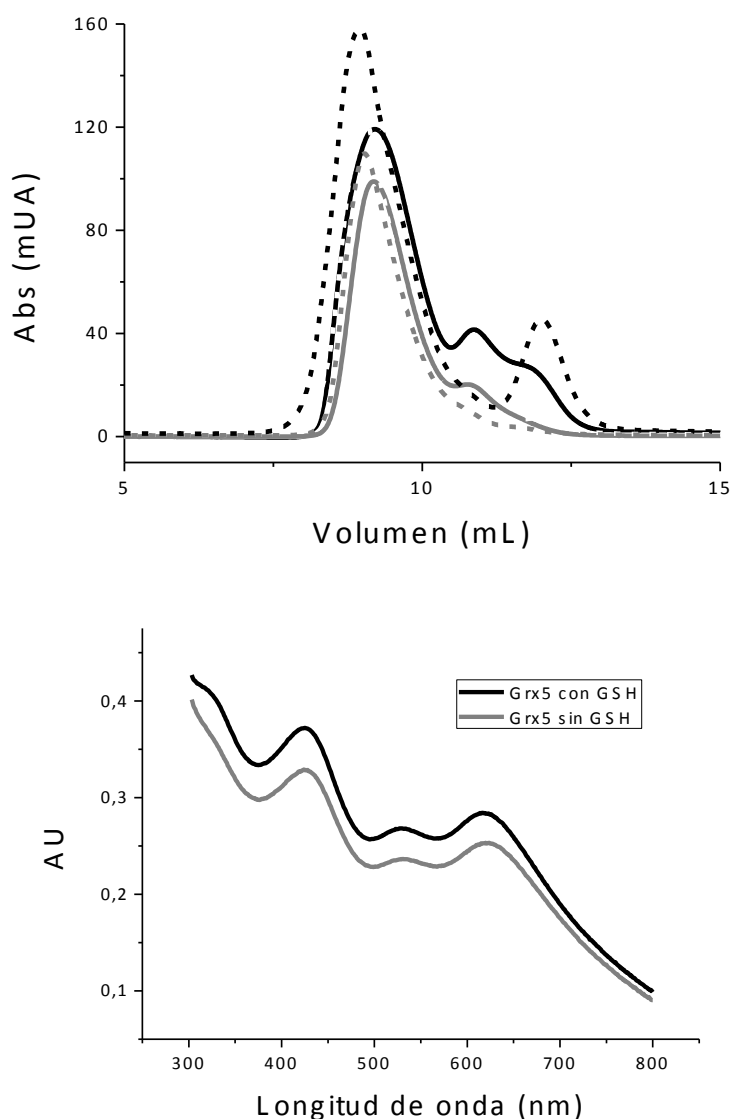


Fig. 3.11. Reconstitución *in vitro* de holoGrx5 con y sin GSH. Se muestra el cromatograma resultado de la cromatografía de exclusión molecular (SEC) para la Grx5 reconstituida en presencia o ausencia de GSH se muestra en la figura. En línea punteada se muestra el resultado de la reconstitución en presencia de GSH mientras que en línea llena se muestra el mismo en ausencia de GSH. En negro y gris se muestra la absorbancia a 280 nm y 420 nm respectivamente. El UV-visible espectro de la proteína reconstituida se muestra debajo.

La Grx5 no solamente es capaz de unir Fe/S en ausencia de GSH sino que, sorprendentemente, lo hace con la misma eficiencia en ausencia de GSH, al menos en condiciones *in vitro*. Además, los espectros indicarían que el/los tipos de Fe/S unidos serían similares en las distintas condiciones. Esto sería una particularidad única de esta proteína ya que otras Grxs de esta clase, en ausencia de GSH en los ensayos de reconstitución *in vitro*, solamente pueden coordinar centros Fe_4S_4 (los cuales poseen un espectro UV-vis bien característico y fácilmente identificable) bajo estrictas condiciones de anaerobiosis (las cuales no se cumplen en los ensayos aquí realizados) [120]. Finalmente, el cromatograma de SEC muestra cuando se realiza la reconstitución *in vitro* en ausencia de GSH: 1) ocurre cambio en el radio hidrodinámico del dímero (especie capaz de unir Fe/S) y 2) aparece una nueva especie en la mezcla, de radio hidrodinámico intermedio entre monómero y dímero, que también uniría Fe/S unido (dado que absorbe a 420 nm).

La caracterización más a fondo de la Grx5, relativamente eclipsada por la IsTRP en el apartado 3.2.1 ha revelado nuevas adaptaciones interesantes de estudio en estos organismos parásitos. Como se mencionó, algunas Grx5, como la de *S. cerevisiae* (ScGrx5), pueden coordinar Fe/S del tipo Fe_4S_4 en ausencia de GSH. Dos cisteínas de la cadena polipeptídica se encuentran involucradas en esta coordinación: la cisteína del sitio activo CGFS, y la cisteína conservada del motivo GGC hacia el extremo C-terminal [120]. Dado además que los distintos tipos de Fe/S pueden interconvertirse fácilmente durante la reconstitución *in vitro* [120], la presencia exclusiva de un único tipo de Fe/S se debe a la imposibilidad de ScGrx5 para coordinar otros tipos de cluster en ausencia de GSH. Cabe destacar que la unión de Fe_4S_4 requiere de una distinta geometría respecto a los ligandos de coordinación dado que cada uno de los átomos de Fe ya poseen tres ligandos de azufre inorgánico y requieren únicamente un ligando extra (Ver Fig. 1.13). En cambio, la Grx5 de *E. granulosus* (EgGrx5) puede coordinar diferentes tipos de cluster de manera GSH independiente (revelado por el espectro UV-visible luego de la reconstitución). Así, nuestra hipótesis sería que EgGrx5 es capaz de coordinar Fe/S independiente de GSH utilizando las mismas Cys que ScGrx5 para coordinar Fe_4S_4 , pero la inserción parásito específica de EgGrx5 (y Grxs ortólogas en platelmintos parásitos) otorgaría una mayor flexibilidad a la hélice del sitio activo, permitiendo una correcta orientación y distancia de estas dos Cys para la coordinación de otros tipos de Fe/S (ver Fig. 3.12). Por otro lado, la tercer Cys presente en EgGrx5, la cual solamente se encuentra presente en Grxs que presentan la inserción parásito-

específica, podría jugar un rol regulatorio, modificando la posición de la hélice alfa del sitio activo.

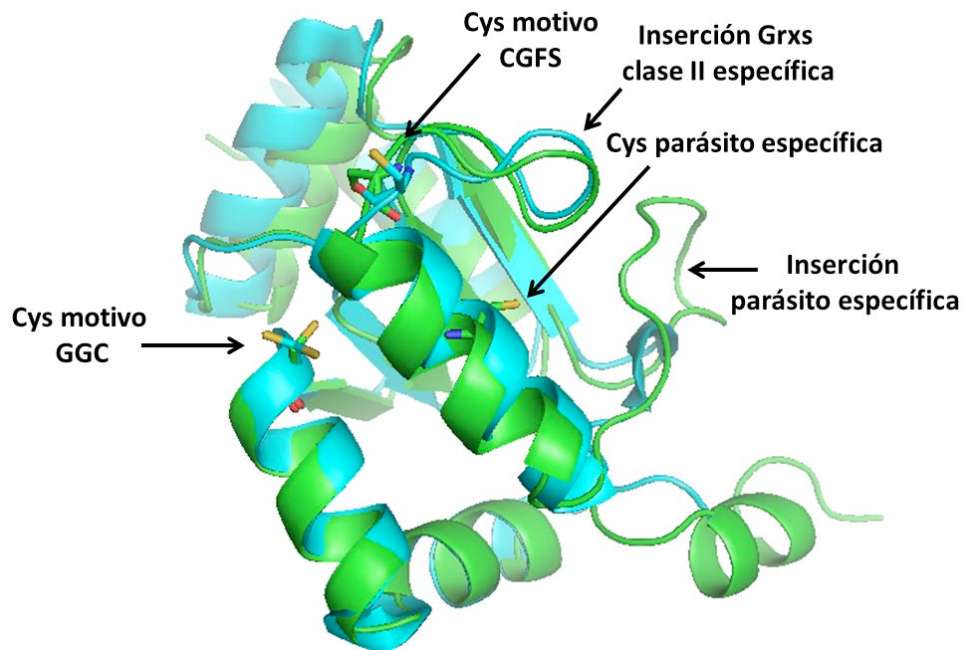


Fig. 3.12. Alineamiento estructural de modelo de Grx5 de *E. granulosus* y Grx5 de *S. cerevisiae*. Se muestran en la figura el alineamiento estructural del modelado por homología generado con el servidor i-TASSER [121] de la Grx5 de *E. granulosus* y la estructura cristalográfica de Grx5 de *S. cerevisiae* (3GX8). Se marcan con flechas los motivos estructurales relevantes para la discusión.

La generación de mutantes en cada una de las Cys, así como la delección de la inserción, podrían servir para corroborar esta hipótesis en conjunto con la reconstitución *in vitro*. Se discutirá más respecto a esta particular adaptación de Grx5 en el apartado 4.

Discusión y Perspectivas

Los platelmintos parásitos son un problema sanitario a nivel mundial tanto para la salud humana como la animal. En cuanto a la salud humana; la esquistosomiasis, la cisticercosis, la echinococcosis y las trematodiasis transmitidas por los alimentos son 4 de las 17 enfermedades tropicales desatendidas priorizadas por la organización mundial de la salud. En particular, en el presente, se encuentra en pleno apogeo una campaña intensiva para la erradicación de la esquistosomiasis [122]. Esta campaña incluye el control del hospedero intermediario y del comportamiento en las poblaciones pero fundamentalmente radica en la única droga efectiva disponible para el control de dicha enfermedad: el praziquantel [123]. Cabe destacar que esta campaña está siendo realizada a buen ritmo y se pretende la erradicación de la enfermedad en varios países para el 2020 [122, 124]. Interesantemente, aún con el uso intensivo y a gran escala que se le ha dado al praziquantel en los últimos años, no se han detectado focos de resistencia en parásitos, cuestionando los esfuerzos realizados para encontrar nuevos blancos de drogas para el tratamiento de la esquistosomiasis [123-124]. Igualmente, es importante destacar algunos aspectos: 1) La generación de resistencia es un acto azaroso, por lo que siempre será un riesgo y podría poner en peligro los resultados esperados de las campañas de intervención, 2) la resistencia en las infecciones experimentales en ratones ha sido reportada [125], 3) la única droga alternativa hoy en día para la esquistosomiasis es la artemisina, cuyo uso se reserva para el tratamiento de formas resistentes de *Plasmodium spp.*, y 4) el tratamiento no es tan efectivo contra otras enfermedades por platelmintos, en particular echinococcosis y cisticercosis (incluso en combinación con benzimidazoles, en general más efectivos), donde la cirugía sigue siendo una herramienta importante para el tratamiento [6]. Así pues, aún con la suerte de nuestro lado, necesitaremos en el futuro drogas efectivas para el tratamiento de enfermedades causadas por otros platelmintos parásitos.

Las vías de la tiorredoxina (Trx) y del glutatión (GSH), y en particular la tiorredoxina glutatión reductasa (TGR), única enzima responsable de la entrada de electrones a dichas vías, son un blanco muy promisorio para el tratamiento de estas enfermedades. En primer lugar, dicha enzima se encuentra en todos los platelmintos causantes de las enfermedades anteriormente mencionadas y en todos los platelmintos parásitos secuenciados hasta el momento. En segundo lugar, se dispone de numerosos experimentos que demuestran la esencialidad de dicha proteína en estos parásitos [49, 52, 56, 126]. En tercer lugar, los hospederos mamíferos poseen redundancia en dichas vías, siendo la tiorredoxina reductasa (TR) y la glutatión reductasa (GR) responsables de oxidar el NADPH para las vías de la Trx y del GSH respectivamente. De hecho, si

bien se conoce que la TGR en mamíferos tendría un rol particular involucrado en la formación de disulfuros proteicos y la maduración del espermatozoide [42], los ratones knock out para dicha proteína no presentan una disminución en la fertilidad (Vadim Gladyshev, comunicación personal). En cuarto lugar, se dispone de un ensayo bioquímico fácil para la medida de actividad y screening de inhibidores. En quinto lugar, se dispone de la estructura de la TGR, permitiendo el diseño racional de fármacos ([127] y Shaodong Dai, comunicación personal). Finalmente, pero no menos importante, se dispone de la auranofina, potente droga que inhibe selectivamente selenoproteínas, y electrófilos de la familia del Furoxano, (oxadiazoles N-óxidos), que parcialmente curan las infecciones por *Schistosoma* y *Mesocestoides* y muestran baja toxicidad en células de mamíferos [49][125], como estructura de partida para el desarrollo de nuevos fármacos más selectivos contra dicha enzima.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de aquellas proteínas que son blancos directos o indirectos de la TGR y una vez más los platelmintos parásitos han demostrado sus peculiaridades en este punto. En este trabajo hemos contribuido al entendimiento de las vías asociadas al mantenimiento de la homeostasis redox y de la biosíntesis y/o transferencia de centros ferrosulfurados en platelmintos parásitos. Así, la inhibición de la TGR generaría un desbalance redox generalizado que, dados los resultados aquí mostrados, conllevaría a la imposibilidad de regenerar proteínas altamente expresadas en estos organismos como las peroxirredoxinas, a bloquear mecanismos de reparación como la reducción de metionil sulfóxido por la MSR y a desbalancear el control redox asociado a la glutationilación, entre otros procesos esperables como la generación de deoxirribonucleótidos. De forma más general, nuestros descubrimientos han contribuido al entendimiento de la unidad de plegamiento tiorredoxina y en particular la unión de centros ferrosulfurados asociada a ella.

A continuación discutiremos preguntas abiertas que aún quedan por responder.

4.1 ¿Podrá ser la IsTRP un nuevo blanco farmacológico?

Hemos considerado a la IsTRP como un interesante blanco farmacológico desde un comienzo, desde el momento de identificarla en el genoma de algunos de estos parásitos, considerando la ausencia de esta proteína en todo otro linaje excepto el de los *Cyclophyllidae*. Cabe destacar que el rol biológico de esta proteína es aún desconocido, y por tanto también la esencialidad de la misma. Discutiremos en el siguiente apartado la necesidad de utilizar el organismo *Hymenolepis*

microstoma como organismo modelo para estudiar la función de esta proteína. Ciertas pistas obtenidas en esta tesis indican que esta proteína cumpliría un rol único en estos parásitos, reforzando el interés en ella como blanco de estudio. El análisis de los datos disponibles de RNASeq en *E. multilocularis* sugiere que IsTRP es una proteína que desempeñaría su función en los huevos y, por tanto, una potencial droga actuando sobre esta proteína no surtiría ningún efecto en el estadio larvario. De esta forma, aún suponiendo la esencialidad de esta proteína, el tratamiento del hospedero definitivo no afectaría a los adultos, los cuales generarían huevos incapaces de perpetuar el ciclo mientras se administre la droga, pero el hospedero no se curaría. ¿Es esto suficiente? Claro que no.

Por otro lado, suponiendo que la hipótesis planteada para la función de esta proteína (ver Fig. 4.1) fuera cierta, tendríamos un blanco muy interesante para el desarrollo de vacunas basadas en parásitos vivos. IsTRP actuaría como reservorio de Fe/S, siendo producida durante la generación de huevos, mientras la síntesis de centros ferrosulfurados (Fe/S) es aún activa. De esta forma, IsTRP se cargaría con su cofactor formándose así la holoproteína. Posteriormente los huevos son liberados, contaminando las pasturas hasta ser ingeridos por el hospedero intermediario. La oncosfera se liberaría en el intestino de éstos y penetraría la pared del órgano para luego migrar vía sistema circulatorio en busca del nicho final para su transformación a metacestodo. Esta etapa es crucial. En este momento el parásito se encuentra totalmente expuesto al ambiente hostil impuesto por el hospedero y no hay tiempo que perder, ya que una vez transformado a metacestodo la capa laminar lo aislará y mantendrá oculto del sistema inmune del hospedero: la reclusión del parásito detrás del “escudo” de la capa laminar del metacestodo es el principal mecanismo de evasión de estos parásitos en el hospedero intermediario. Así, IsTRP podría proteger el Fe/S durante la infección para posteriormente liberarlo en el momento del establecimiento (dado que, por ejemplo, tanto la síntesis proteica como la reparación del ADN dependen de los Fe/S). De esta forma, IsTRP coordinaría un pool de Fe/S para el abastecimiento inmediato a apoproteínas que dependen de este cofactor para su función, mientras la maquinaria de síntesis *de novo* vuelve a ponerse en actividad. Si obtuviéramos parásitos incapaces de mantener este pool de Fe/S entonces tendríamos parásitos que infectarían normalmente el hospedero pero que no podrían establecerse, y por tanto, no generarían enfermedad. La inmunización con estos parásitos vivos, que poseerían los mismos PAMPS y generarían los mismos DAMPS que los organismos normales, podría ser sumamente efectiva. Es una lástima que no podamos modificar estos parásitos genéticamente.

4.2 ¿Cómo acercarnos a dilucidar la función de IsTRP?

La expresión de IsTRP en los huevos impide su estudio en *E. granulosus* sin las condiciones de seguridad apropiadas (los huevos son el estadio infeccioso para el hombre). Además, la imposibilidad de perpetuar el ciclo de vida en el laboratorio dificulta el estudio funcional, siendo imposible, por ejemplo, analizar la importancia de esta proteína durante la infección. *Hymenolepis microstoma* ha sido planteado como organismo modelo para el estudio de los platelmintos parásitos [131] y nos proponemos utilizarlo para el estudio de esta proteína. *H. microstoma* pertenece al orden *Cyclophyllidea* en los cestodos (al igual que *E. granulosus*), y dentro de éste a la familia *Hymenolepididae* (a diferencia de *E. granulosus*, que pertenece a la familia de los *Taeniidae*). *H. microstoma* codifica para una IsTRP ortóloga a la de *E. granulosus*. Esta proteína posee dos cisteínas en lugar de tres, aquellas del motivo CxxC, pero dado que estas dos cisteínas son las únicas necesarias para la coordinación de Fe/S es esperable una conservación de función. Además, *H. microstoma* no infecta humanos (ver ciclo en Fig. 4.2) y el ciclo de vida completo puede mantenerse en el laboratorio infectando ratones (hospedero definitivo) y artrópodos (hospedero intermediario).

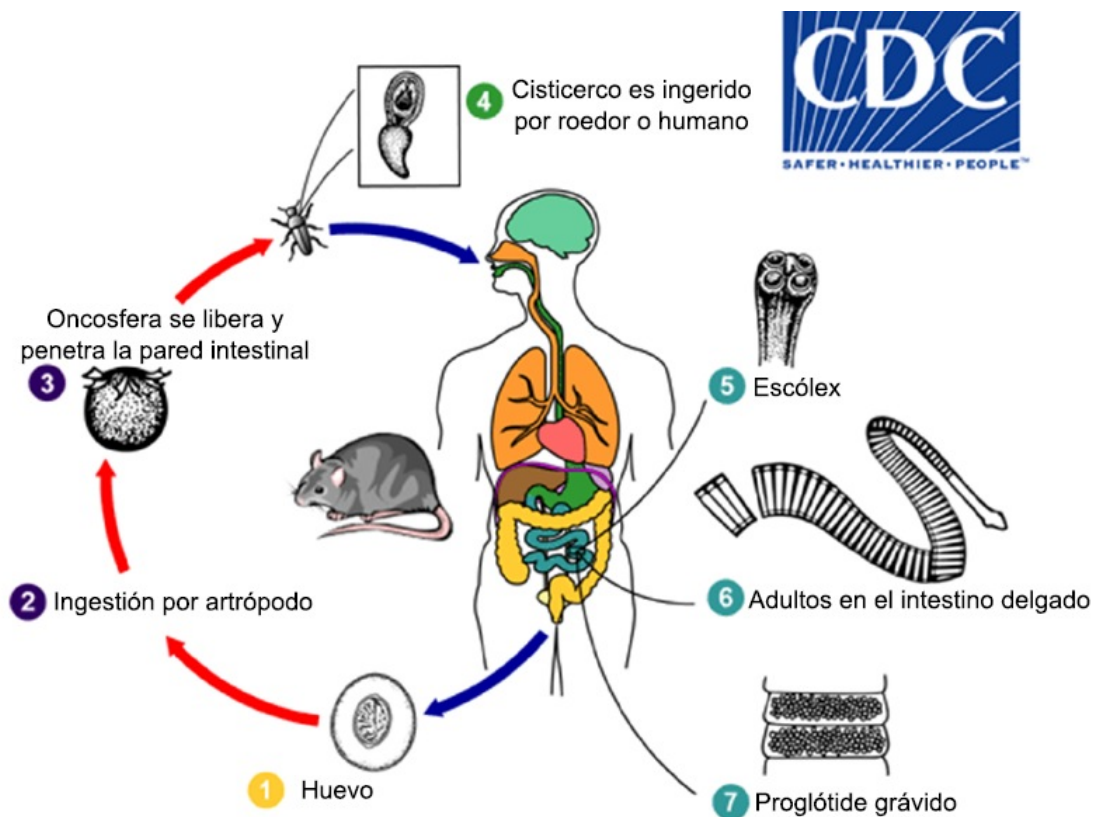


Figura 4.2. Ciclo de vida de *Hymenolepis* spp. Los huevos son infecciosos inmediatamente luego de la excreción con las heces por el hospedero definitivo (humanos o roedores) (1). Al ser ingeridos por el hospedero intermediario artrópodo (2) se desarrollan a cisticercos capaces de infectar al hospedero

definitivo (3). *H. diminuta* infecta humanos, en tanto *H. microstoma* solo roedores. En el intestino delgado, el cisticerco se desarrolla al estadio adulto (6) adhiriéndose a la pared intestinal por el escólex (5). Los proglótidos grávidos (7) liberan los huevos. Imagen adaptada de la web de Centers for Disease Control and Prevention (EEUU) disponible en <http://www.dpd.cdc.gov>.

Los estudios en *H. microstoma* permitirán:

1) Determinar la localización subcelular y patrón de expresión temporal de la proteína:

La confirmación de la localización subcelular citosólica de la proteína podrá realizarse por fraccionamiento subcelular acoplado a western blot con anticuerpos específicos anti-IsTRP o inmunohistoquímica. Además, el análisis por western blot permitirá analizar en que estadios del parásito se expresa la proteína.

2) Unión de Fe/S *in vivo*:

El análisis de la coordinación de Fe/S por parte de IsTRP *in vivo* podría realizarse usando el marcado radiactivo con ⁵⁵Fe acoplado a la inmunoprecipitación. Esto permitirá no solamente confirmar la capacidad de unión de esta proteína *in vivo*, sino que además analizar la formación de holoproteína y apoproteína en función del tiempo. Además, el análisis de otras proteínas ferrosulfuradas citosólicas/nucleares, por ejemplo Rli1, podría dar información respecto a la posibilidad de transferencia por parte de IsTRP.

3) *Pull down* con la proteína recombinante de *E. granulosus* o inmunoprecipitación:

Hemos intentado identificar interactores proteicos de IsTRP durante este trabajo de tesis. Sin embargo, estos intentos fueron realizados utilizando protoescólex de *E. granulosus*, estadio en el cual IsTRP no se expresa, con resultados negativos. El uso de *H. microstoma* permitirá realizar el mismo análisis, utilizando proteína recombinante como anzuelo o anticuerpos para realizar inmunoprecipitación, en el estadio apropiado. Cabe destacar que aunque ya se realizaron experimentos de *pull down*, con extractos de *H. microstoma* y utilizando IsTRP de *E. granulosus* como anzuelo, con resultados negativos el uso de agentes entrecruzadores (por ejemplo) es un abordaje interesante para el diseño de próximos experimentos. Asimismo, el clonado y producción recombinante de IsTRP de *H. microstoma* podría proporcionar un mejor anzuelo para los ensayos de *pull down* utilizando extractos proteicos de *H. microstoma*.

4) Desarrollo de sistemas CRISPR/Cas9 en *H. microstoma*

Finalmente, la necesidad de desarrollar tecnologías de manipulación genética en estos organismos es inminente si pretendemos entender estos sistemas biológicos complejos. El desarrollo de los sistemas CRISPR/Cas9 abre la puerta para su manipulación genética en estos organismos y, de hecho, ya ha revolucionado la parasitología relacionada a otros organismos tales como *Cryptosporidium parvum* [132], esquivo durante 10 años a todo intento de manipulación genética. Un gran desafío y riesgo pero también una gran posibilidad y eventual recompensa.

4.3 ¿Qué sucede con el GSH en platelmintos parásitos? ¿Por qué acumular adaptaciones para independizar procesos del uso de GSH?

El metabolismo del GSH ha sido estudiado en *T. crassiceps*. En este parásito se ha detectado niveles de GSH similares a los descritos para otros organismos (~1.2 mM) en el estadio larvario [58]. Además, la síntesis de GSH fue corroborada experimentalmente [58], en concordancia con la presencia de genes asociados [30], con velocidades de síntesis similares a las reportadas en extractos citosólicos de hígado [133]. Finalmente, se ha demostrado una conservación asociada al mantenimiento de la homeostasis del potencial redox del GSH, incluyendo la reducción de GSSG y, en condiciones severas de estrés oxidativo, la exportación de GSSG y glutationilación de proteínas [58]. Aún así, las vías metabólicas que dependen del GSH en estos parásitos continúan acumulando peculiaridades (Fig. 4.3). En primer lugar hay reemplazo de la GR por la TGR [44]. Este cambio no solo sustituye dos flavoproteínas por una, sino que además permite lo que llamaremos el primer rodeo al uso de GSH. Este rodeo involucra la deglutationilación de proteínas. La glutationilación/deglutinationilación es un proceso importante en cuanto a la regulación funcional de proteínas así como para la protección ante el daño oxidativo [18]. En la mayoría de los organismos, la deglutationilación se encuentra mediada por una segunda molécula de GSH y catalizada por Grxs, generando GSSG. Este proceso involucra la generación de un intermediario Grx glutationilada (GrxS-SG), que es luego regenerada a su forma reducida por una molécula de GSH [134]. En los platelmintos parásitos el dominio Grx de la TGR es capaz de llevar a cabo esta actividad pero, en este caso, el intermediario GrxS-SG puede ser reducido directamente por los dominios TR de la TGR, liberando GSH [57]. Así, no es necesario el GSH para la deglutationilación de proteínas. De hecho, de los trabajos aquí presentados se desprende que las Grxs monodominio también podrían actuar de esta forma, siendo nuevamente dispensable el

GSH. El segundo rodeo involucra la unión de centros ferrosulfurados (Fe/S) por parte de la Grx5, proteína involucrada en la biogénesis y movilización de Fe/S en la mitocondria. La capacidad que tendría la Grx5 de coordinar centros ferrosulfurados de manera independiente del GSH es además remarcable ya que se ha demostrado en *S. cerevisiae* que la biosíntesis de Fe/S mitocondrial es aún activa con concentraciones de GSH 100 veces menores a las detectadas en circunstancias normales [135]. Cabe destacar también la posibilidad de que IsTRP actúe como un rodeo al uso de GSH respecto a la síntesis de Fe/S en el citosol, proceso que involucra a la Grx3 en organismos eucariotas y de la cual no disponemos información al momento en platelmintos parásitos. Además, existen peculiaridades asociadas a la internalización de aminoácidos. En los trematodos *Gigantocotyle explanatum* y *Gastrothylax crumenifer* la contribución del GSH como transportador para internalización de aminoácidos fue sugerida [59]. Sin embargo, el análisis de los genomas de trematodos reveló que el ciclo del γ -glutamato, que permite transportar aminoácidos utilizando GSH, no se encuentra completo, encontrándose ausente el gen que codifica para la oxoprolinasa. Más aún, los cestodos tampoco codifican para la enzima γ -glutamilciclotransferasa. Si bien cabe la posibilidad que en trematodos la 5-oxoprolina sea excretada luego de la internalización del γ -glutamilaminoácido y liberación del aminoácido en el citosol, la internalización de aminoácidos mediada por GSH en cestodos parece improbable. Incluso en trematodos, el hecho de que la actividad γ -glutamiltransferasa se vea incrementada por alanina [59], uno de los pocos aminoácidos no esenciales en estos parásitos [30], podría indicar una falta de especificidad por precursores biosintéticos más importantes. Así, al menos a primera vista, parecería que estos parásitos también han prescindido de la internalización de aminoácidos dependiente de GSH, siendo un posible tercer rodeo.

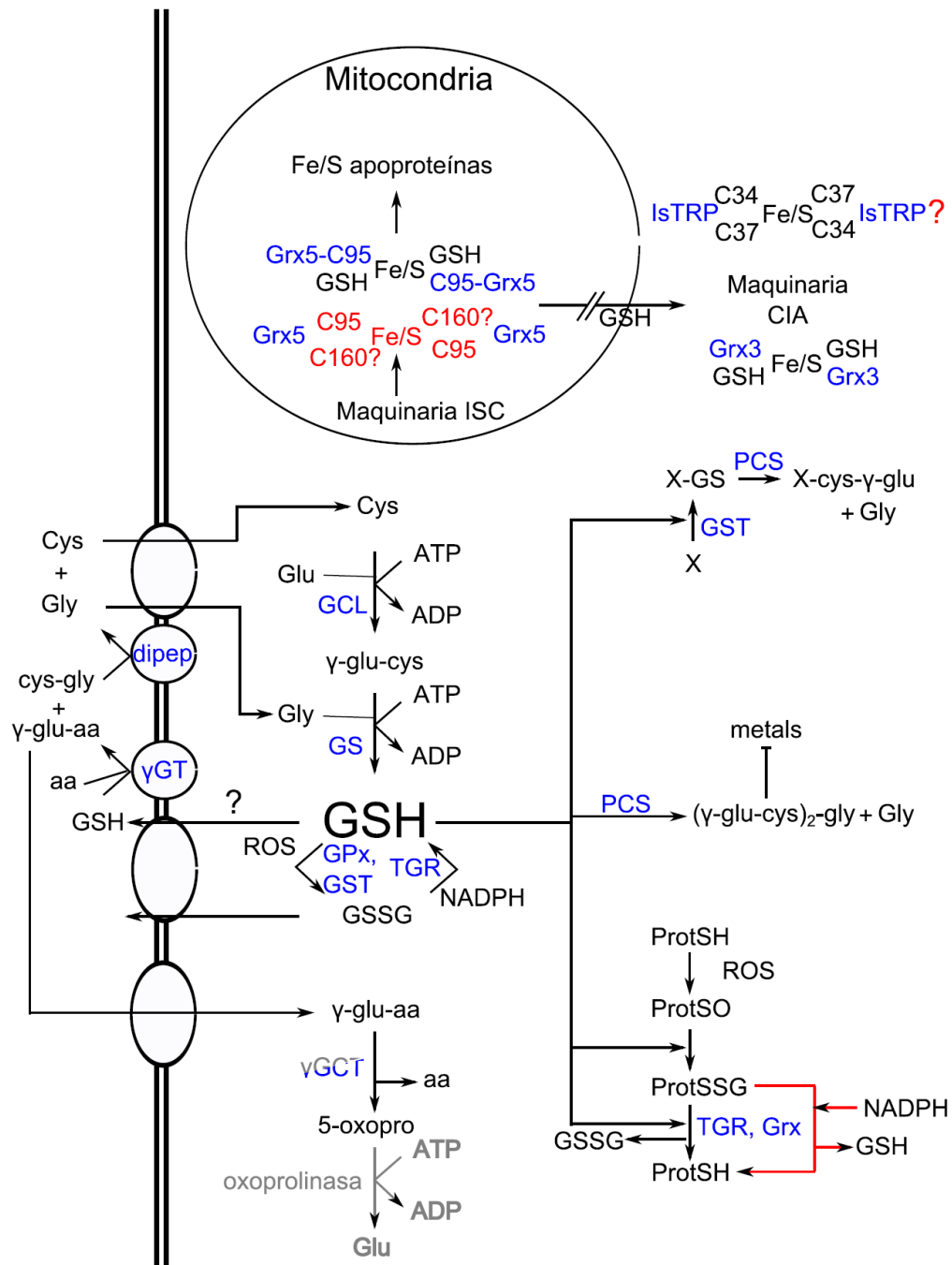


Fig. 4.3. Reacciones asociadas al metabolismo de GSH en platelmintos parásitos. Se representan las reacciones en las cuales el glutatión estaría involucrado en los gusanos parásitos chatos. Las enzimas se muestran en azul. Las reacciones ausentes en estos parásitos se muestran en gris, mientras que la γ GCT (que se encuentra codificada únicamente en el genoma de trematodos) se muestra en gris y azul. Las reacciones asociadas a los rodeos al uso de GSH se muestran el rojo. Abreviaciones: PCS: Fitoquelatina sintasa, GST: Glutatión S-transferasa, ProtSH: proteína, ProtSO: proteína con cisteína como sulfénico, PSSG: proteína glutationilada, TGR: tioredoxina glutatión reductasa, Grx: glutaredoxina, GPx: glutatión peroxidasa, X: xenobiótico, dipep: dipeptidasa, γ GT: gama-glutamilttransferasa, γ -glu-aa: γ -glutamilaminoácido, γ GCT: γ -glutamilciclotransferasa, Fe/S: centro ferrosulfurado. Imagen adaptada de [58]

¿Están intentando estos parásitos eliminar el uso de GSH? ¿Se reserva para alguna función particular?

Los platelmintos parásitos se encuentran expuestos no sólo al estrés oxidativo endógeno (el radical superóxido es un producto secundario del metabolismo aeróbico) sino que además a aquél impuesto por el hospedero (grandes cantidades de superóxido y óxido nítrico pueden generarse tras la activación de leucocitos, generando especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno) [136]. De esta forma, la posibilidad de que dichos parásitos se encuentren en situaciones particulares con cambios bruscos del potencial redox del GSH no puede ser descartada. Estos parásitos cuentan, sin embargo, al igual que muchos organismos, con numerosas vías que permiten la homeostasis del potencial redox del para GSH/GSSG. Esto incluye la reducción de GSSG por la TGR, la excreción de GSSG al exterior celular y la reacción del GSSG con tioles proteicos libres [58].

Alternativamente nos hemos planteado la posibilidad de que el GSH se utilice como un reservorio de cisteína (Cys), aminoácido esencial para estos parásitos. El estadio adulto, por ejemplo, requiere una gran cantidad de precursores biosintéticos para la generación de huevos. Cabe la posibilidad que, en condiciones de escasez de dichos precursores, el adulto utilice el pool de GSH para la generación de Cys, disminuyendo así en concentración. Si bien esto parece ser una opción interesante, cabe destacar que en levaduras la disminución de la concentración de GSH, manteniendo el potencial redox, no influye en la síntesis mitocondrial de Fe/S (proceso que incluye a la Grx5) aún encontrándose a concentraciones 100 veces menores respecto a levaduras silvestres [135]. Dado que la Grx5 de estos parásitos parecería poseer adaptaciones para la unión independiente de GSH, esto requeriría una disminución aún mayor del pool de GSH. Por otro lado, a concentraciones más bajas de GSH, el potencial redox GSH/GSSG podría verse influenciado más fácilmente, generando efectos más drásticos en la homeostasis redox en estos parásitos.

Bibliografía

1. Torgerson, P.R., et al., *The global burden of alveolar echinococcosis*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(6): p. e722.
2. Budke, C.M., P. Deplazes, and P.R. Torgerson, *Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(2): p. 296-303.
3. Ammann, R.W. and J. Eckert, *Cestodes. Echinococcus*. Gastroenterol Clin North Am, 1996. **25**(3): p. 655-89.
4. Khuroo, M.S., et al., *Percutaneous drainage compared with surgery for hepatic hydatid cysts*. N Engl J Med, 1997. **337**(13): p. 881-7.
5. Sayek, I., R. Yalin, and Y. Sanac, *Surgical treatment of hydatid disease of the liver*. Arch Surg, 1980. **115**(7): p. 847-50.
6. Brunetti, E., P. Kern, and D.A. Vuitton, *Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans*. Acta Trop, 2010. **114**(1): p. 1-16.
7. McManus, D.P., et al., *Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis*. BMJ, 2012. **344**: p. e3866.
8. Lacey, E., *The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles*. Int J Parasitol, 1988. **18**(7): p. 885-936.
9. Borgers, M. and S. De Nollin, *Ultrastructural changes in Ascaris suum intestine after mebendazole treatment in vivo*. J Parasitol, 1975. **61**(1): p. 110-22.
10. Lubega, G.W. and R.K. Prichard, *Interaction of benzimidazole anthelmintics with Haemonchus contortus tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy*. Exp Parasitol, 1991. **73**(2): p. 203-13.
11. Teggi, A., M.G. Lastilla, and F. De Rosa, *Therapy of human hydatid disease with mebendazole and albendazole*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(8): p. 1679-84.
12. Smego, R.A., Jr. and P. Sebanego, *Treatment options for hepatic cystic echinococcosis*. Int J Infect Dis, 2005. **9**(2): p. 69-76.
13. Meyer, Y., et al., *Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 335-67.
14. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radic Res, 1999. **31**(4): p. 261-72.
15. Nordberg, J. and E.S. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1287-312.
16. Holmgren, A., et al., *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1375-7.
17. Lillig, C.H., C. Berndt, and A. Holmgren, *Glutaredoxin systems*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(11): p. 1304-17.
18. Dalle-Donne, I., et al., *Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(2): p. 85-96.
19. Lill, R., V. Srinivasan, and U. Muhlenhoff, *The role of mitochondria in cytosolic-nuclear iron-sulfur protein biogenesis and in cellular iron regulation*. Curr Opin Microbiol, 2014. **22**: p. 111-9.
20. Lu, S.C., *Glutathione synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3143-53.
21. Penninckx, M., *A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses*. Enzyme Microb Technol, 2000. **26**(9-10): p. 737-742.
22. Meredith, M.J. and D.J. Reed, *Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3747-53.
23. Hwang, C., A.J. Sinskey, and H.F. Lodish, *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. Science, 1992. **257**(5076): p. 1496-502.
24. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 711-60.
25. Franklin, C.C., et al., *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 86-98.

26. Oppenheimer, L., et al., *Glutathione synthetase. Purification from rat kidney and mapping of the substrate binding sites*. J Biol Chem, 1979. **254**(12): p. 5184-90.
27. Bjornstedt, M., et al., *The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29382-4.
28. Krishnan, N., et al., *Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of Leptinotarsa decemlineata (Say)*. Insect Biochem Mol Biol, 2009. **39**(3): p. 180-8.
29. Kalinina, E.V., N.N. Chernov, and M.D. Novichkova, *Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes*. Biochemistry (Mosc), 2014. **79**(13): p. 1562-83.
30. Tsai, I.J., et al., *The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism*. Nature, 2013. **496**(7443): p. 57-63.
31. Holmgren, A., *Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin*. Methods Enzymol, 1984. **107**: p. 295-300.
32. Salinas, G., et al., *Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths*. Trends Parasitol, 2004. **20**(7): p. 340-6.
33. Holmgren, A., *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 13963-6.
34. Holmgren, A. and M. Bjornstedt, *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 199-208.
35. Stadtman, T.C., *Selenocysteine*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 83-100.
36. Zhong, L., E.S. Arner, and A. Holmgren, *Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5854-9.
37. Gladyshev, V.N., K.T. Jeang, and T.C. Stadtman, *Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6146-51.
38. Mustacich, D. and G. Powis, *Thioredoxin reductase*. Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 1-8.
39. Miranda-Vizuet, A., A.E. Damdimopoulos, and G. Spyrou, *cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the mouse mitochondrial thioredoxin reductase gene(1)*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1447**(1): p. 113-8.
40. Rigobello, M.P., et al., *Purification of mitochondrial thioredoxin reductase and its involvement in the redox regulation of membrane permeability*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(2): p. 370-6.
41. Sun, Q.A., et al., *Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24522-30.
42. Su, D., et al., *Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26491-8.
43. Sun, Q.A., et al., *Reaction mechanism and regulation of mammalian thioredoxin/glutathione reductase*. Biochemistry, 2005. **44**(44): p. 14528-37.
44. Agorio, A., et al., *Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of Echinococcus granulosus thioredoxin Glutathione reductase*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 12920-8.
45. Alger, H.M. and D.L. Williams, *The disulfide redox system of Schistosoma mansoni and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(1): p. 129-39.
46. Rendon, J.L., et al., *Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from Taenia crassiceps metacestode (cysticerci)*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **133**(1): p. 61-9.

47. Guevara-Flores, A., J.P. Pardo, and J.L. Rendon, *Hysteresis in thioredoxin-glutathione reductase (TGR) from the adult stage of the liver fluke Fasciola hepatica*. Parasitol Int, 2011. **60**(2): p. 156-60.
48. Maggioli, G., et al., *A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from Fasciola hepatica induces a protective response in rabbits*. Exp Parasitol, 2011. **129**(4): p. 323-30.
49. Pasquet, V., et al., *Inhibition of Tapeworm Thioredoxin and Glutathione Pathways by an Oxadiazole N-Oxide Leads to Reduced Mesocostoides vogae Infection Burden in Mice*. Molecules, 2015. **20**(7): p. 11793.
50. Otero, L., et al., *Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 237.
51. Sun, Q.A., et al., *Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(7): p. 3673-8.
52. Bonilla, M., et al., *Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 17898-907.
53. Bonilla, M., et al., *Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminth parasites: alternative pathways for glutathione reduction and deglutathionylation*. J Biol Chem, 2011. **286**(7): p. 4959-67.
54. Huang, H.H., et al., *Investigations of the catalytic mechanism of thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni*. Biochemistry, 2011. **50**(26): p. 5870-82.
55. Guevara-Flores, A., et al., *Mitochondrial Thioredoxin-Glutathione Reductase from Larval Taenia crassiceps (Cysticerci)*. J Parasitol Res, 2010. **2010**.
56. Kuntz, A.N., et al., *Thioredoxin glutathione reductase from Schistosoma mansoni: an essential parasite enzyme and a key drug target*. PLoS Med, 2007. **4**(6): p. e206.
57. Williams, D.L., et al., *Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(7): p. 735-45.
58. Martinez-Gonzalez, J.J., et al., *Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in Taenia crassiceps cysticerci*. Mol Biochem Parasitol, 2015. **201**(1): p. 16-25.
59. Abidi, S.M. and W.A. Nizami, *[3H]-amino acid uptake and metabolic studies on Gigantocotyle explanatum and Gastrothylax crumenifer (Digenea: Paramphistomidae)*. Int J Parasitol, 1995. **25**(5): p. 541-9.
60. Ray, D. and D.L. Williams, *Characterization of the phytochelatin synthase of Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e1168.
61. Liebeke, M., et al., *Earthworms produce phytochelatin in response to arsenic*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81271.
62. Grill, E., *Phytochelatin, the heavy metal binding peptides of plants: characterization and sequence determination*. Experientia Suppl, 1987. **52**: p. 317-22.
63. Rigouin, C., et al., *Towards an understanding of the function of the phytochelatin synthase of Schistosoma mansoni*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(1): p. e2037.
64. Martin, J.L., *Thioredoxin--a fold for all reasons*. Structure, 1995. **3**(3): p. 245-50.
65. Collet, J.F. and J. Messens, *Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(8): p. 1205-16.
66. Sun, C., M.J. Berardi, and J.H. Bushweller, *The NMR solution structure of human glutaredoxin in the fully reduced form*. J Mol Biol, 1998. **280**(4): p. 687-701.
67. Arner, E.S. and A. Holmgren, *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6102-9.
68. Laurent, T.C., E.C. Moore, and P. Reichard, *Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from Escherichia Coli B*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 3436-44.

69. Atkinson, H.J. and P.C. Babbitt, *An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(10): p. e1000541.
70. Kang, S.W., et al., *Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6297-302.
71. Lillig, C.H., et al., *New thioredoxins and glutaredoxins as electron donors of 3'-phosphoadenylylsulfate reductase*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7695-8.
72. Buchanan, B.B., *Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development*. Arch Biochem Biophys, 1991. **288**(1): p. 1-9.
73. Hisabori, T., et al., *Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network*. J Exp Bot, 2005. **56**(416): p. 1463-8.
74. Saitoh, M., et al., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. EMBO J, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
75. Stroher, E. and A.H. Millar, *The biological roles of glutaredoxins*. Biochem J, 2012. **446**(3): p. 333-48.
76. Gallogly, M.M., D.W. Starke, and J.J. Mieyal, *Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(5): p. 1059-81.
77. Zaffagnini, M., et al., *Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 8868-76.
78. Tamarit, J., et al., *Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25745-51.
79. Lill, R., et al., *The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(9): p. 1491-508.
80. Berndt, C., et al., *How does iron-sulfur cluster coordination regulate the activity of human glutaredoxin 2?* Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(1): p. 151-7.
81. Herrero, E. and M.A. de la Torre-Ruiz, *Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(12): p. 1518-30.
82. Couturier, J., et al., *The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions?* Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(6): p. 1513-1527.
83. Rodriguez-Manzanque, M.T., et al., *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(4): p. 1109-21.
84. Molina-Navarro, M.M., et al., *Prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins are able to perform the functions of Grx5 in the biogenesis of Fe/S clusters in yeast mitochondria*. FEBS Lett, 2006. **580**(9): p. 2273-80.
85. Muhlenhoff, U., et al., *Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster*. Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 373-85.
86. Rouhier, N., et al., *Glutaredoxins: roles in iron homeostasis*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(1): p. 43-52.
87. Alger, H.M., et al., *Molecular and enzymatic characterisation of Schistosoma mansoni thioredoxin*. Int J Parasitol, 2002. **32**(10): p. 1285-92.
88. Boumis, G., et al., *Structural and functional characterization of Schistosoma mansoni Thioredoxin*. Protein Sci, 2011. **20**(6): p. 1069-76.
89. Salazar-Calderon, M., et al., *Heterologous expression and functional characterization of thioredoxin from Fasciola hepatica*. Parasitol Res, 2001. **87**(5): p. 390-5.
90. Suttiprapa, S., et al., *Molecular expression and enzymatic characterization of thioredoxin from the carcinogenic human liver fluke Opisthorchis viverrini*. Parasitol Int, 2012. **61**(1): p. 101-6.

91. Martinez-Gonzalez, J.J., et al., *Purification and characterization of Taenia crassiceps cysticerci thioredoxin: insight into thioredoxin-glutathione-reductase (TGR) substrate recognition*. Parasitol Int, 2015. **64**(2): p. 194-201.
92. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures*. Science, 1997. **277**(5326): p. 653-9.
93. Meyer, J., *Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution*. J Biol Inorg Chem, 2008. **13**(2): p. 157-70.
94. Lill, R., *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 831-8.
95. Martin, W. and M.J. Russell, *On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2003. **358**(1429): p. 59-83; discussion 83-5.
96. Imlay, J.A., *Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen*. Mol Microbiol, 2006. **59**(4): p. 1073-82.
97. Pierik, A.J., D.J. Netz, and R. Lill, *Analysis of iron-sulfur protein maturation in eukaryotes*. Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 753-66.
98. Lill, R., et al., *The role of mitochondria and the CIA machinery in the maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins*. Eur J Cell Biol, 2015.
99. Rouault, T.A., *Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease*. Dis Model Mech, 2012. **5**(2): p. 155-64.
100. Srinivasan, V., A.J. Pierik, and R. Lill, *Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1*. Science, 2014. **343**(6175): p. 1137-40.
101. Riemer, J., N. Bulleid, and J.M. Herrmann, *Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process*. Science, 2009. **324**(5932): p. 1284-7.
102. Netz, D.J., et al., *Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(5): p. 303-12.
103. Zheng, H., et al., *The genome of the hydatid tapeworm Echinococcus granulosus*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1168-75.
104. Begas, P., V. Staudacher, and M. Deponce, *Systematic re-evaluation of the bis(2-hydroxyethyl)disulfide (HEDS) assay reveals an alternative mechanism and activity of glutaredoxins*. Chemical Science, 2015. **6**(7): p. 3788-3796.
105. Yamazaki, D., et al., *Target proteins of the cytosolic thioredoxins in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 2004. **45**(1): p. 18-27.
106. Lemaire, S.D., et al., *New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7475-80.
107. Meek, S.E., W.S. Lane, and H. Piwnicka-Worms, *Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32046-54.
108. Siles-Lucas Mdel, M. and B. Gottstein, *The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms*. Trends Parasitol, 2003. **19**(12): p. 575-81.
109. King, S.M., *The dynein microtubule motor*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1496**(1): p. 60-75.
110. Johansson, C., C.H. Lillig, and A. Holmgren, *Human mitochondrial glutaredoxin reduces S-glutathionylated proteins with high affinity accepting electrons from either glutathione or thioredoxin reductase*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7537-43.
111. Sturm, N., et al., *Identification of proteins targeted by the thioredoxin superfamily in Plasmodium falciparum*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000383.
112. Kehr, S., et al., *Protein S-glutathionylation in malaria parasites*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(11): p. 2855-65.
113. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.

114. Tamura, K., et al., *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(12): p. 2725-9.
115. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
116. Stadtman, T.C., *Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16257-60.
117. Arner, E.S., L. Zhong, and A. Holmgren, *Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods Enzymol, 1999. **300**: p. 226-39.
118. Holmgren, A. and F. Aslund, *Glutaredoxin*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 283-92.
119. Carvalho, P.C., et al., *PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics*. Curr Protoc Bioinformatics, 2012. **Chapter 13**: p. Unit13 19.
120. Zhang, B., et al., *Monothiol glutaredoxins can bind linear [Fe3S4]⁺ and [Fe4S4]²⁺ clusters in addition to [Fe2S2]²⁺ clusters: spectroscopic characterization and functional implications*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(40): p. 15153-64.
121. Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 40.
122. Rollinson, D., et al., *Time to set the agenda for schistosomiasis elimination*. Acta Trop, 2013. **128**(2): p. 423-40.
123. Secor, W.E. and S.P. Montgomery, *Something old, something new: is praziquantel enough for schistosomiasis control?* Future Med Chem, 2015. **7**(6): p. 681-4.
124. Obe, A.F., *Praziquantel: do we need another antischistosome treatment?* Future Med Chem, 2015. **7**(6): p. 677-80.
125. Cioli, D., et al., *Schistosomiasis control: praziquantel forever?* Mol Biochem Parasitol, 2014. **195**(1): p. 23-9.
126. Ross, F., et al., *Identification of thioredoxin glutathione reductase inhibitors that kill cestode and trematode parasites*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35033.
127. Angelucci, F., et al., *Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of Schistosoma mansoni thioredoxin glutathione reductase*. Proteins, 2008. **72**(3): p. 936-45.
128. Haag, K.L., B. Gottstein, and F.J. Ayala, *The EG95 antigen of Echinococcus spp. contains positively selected amino acids, which may influence host specificity and vaccine efficacy*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5362.
129. Lightowers, M.W., et al., *Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep*. Int J Parasitol, 1999. **29**(4): p. 531-4.
130. Larrieu, E., et al., *Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data*. Acta Trop, 2013. **127**(2): p. 143-51.
131. Cunningham, L.J. and P.D. Olson, *Description of Hymenolepis microstoma (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era*. Parasit Vectors, 2010. **3**: p. 123.
132. Vinayak, S., et al., *Genetic modification of the diarrhoeal pathogen Cryptosporidium parvum*. Nature, 2015.
133. Griffith, O.W. and A. Meister, *Origin and turnover of mitochondrial glutathione*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(14): p. 4668-72.
134. Peltoniemi, M.J., et al., *Insights into deglutathionylation reactions. Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the gamma-linkage present in glutathione*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33107-14.
135. Sipos, K., et al., *Maturation of cytosolic iron-sulfur proteins requires glutathione*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 26944-9.
136. DeFranco, A.L., R.M. Locksley, and M. Robertson, *Immunity : the immune response in infectious and inflammatory disease*. Primers in biology. xxx, 387 pages.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las agencias que financiaron y apoyaron esta tesis: ANII, CSIC, PEDECIBA, ICGEB. A la Cátedra de Inmunología de las Facultades de Química y Ciencias y al Institut Pasteur por brindarme espacio para llevar a cabo esta tesis.

Agradezco también a los integrantes del tribunal por aceptar evaluar este trabajo.

Formalidades fuera, quiero agradecer a unos cuantos:

Primero quiero agradecerle a Gustavo. Difícil vaya a encontrar mejor jefe y mejor compañero de laburo y discusión. Gracias por darme espacio para desarrollar ideas, por la mente abierta y la curiosidad infinita. Pero sobre todo gracias por la dedicación a formar a tus estudiantes, por pensar en nosotros antes que en vos y por buscar lo mejor para nuestro desarrollo. Gracias de verdad.

De segundo a la jefita. Mariana gracias por la paciencia, por las traspasadas, por estar ahí siempre. Gracias por enseñarme la forma correcta de hacer las cosas para que luego... bueno, salga lo que salga.

Gracias a mis amigos del laburo. Gracias Lu, Lau y Pei. Gracias por las infinitas manos para ayudar, por por las infinitas risas, los infinitos recuerdos, las infinitas bebidas espirituosas (que ayudan un poco a los dos infinitos anteriores). Gracias por ser amigos, por hacer del trabajo un segundo hogar.

Gracias inmuno. Porque aprendí algo de inmunología, porque nunca tuve nada para quejarme, por el ambiente, por la buena onda. Gracias por más amigos. Gracias por todos los compas. Gracias a todos y no quiero nombrar para no olvidar, pero nombro igual. Gracias Fer, Pau, Pitt, Mery, Mai, Ana, Fló, Val, Ana, Minarriet, Casara, Álvaro, Anita. Gracias casita del fondo y casita de adelante. Gracias especiales a Ceci F., nunca habrá sabio más sabio y gente más gente. ¡Gracias!

Gracias Pasteur, gracias los metabolismo. Los cambios nunca son tan difíciles cuando se va a un lugar tan bueno con tan buena gente.

Gracias a mis amigos. A todos. Gracias a los de facultad. Gracias los jueves. Gracias los reja. Gracias Paty, gracias Vicky. Porque hoy no me acuerdo más que la escalera gigante, los Einstein de palo (o los casi por alergias), el baile de la garrafa, los meses y meses por estudios, algún vinito. ¿Está mal? En particular a la luz. ¡Gracias cuerpo! No me hubiese recibido sin uste', el

agua helada y su cuaderno de cristal. Gracias a mis amigos de antes de facultad. Esos que me bancan desde hace tanto tanto. Gracias Patric (granjero), Chata (mozo), Verita (borracha), Álvaro (Hulk), Bonjour (superbonjour), Mabel (no podemos escribirlo en una tesis), Cande (gnomo de jardín). ¡Son los uno! Mira que no es changa divertirse en Cardona y aquí estamos. Gracias.

Gracias a mi familia. A todos. Gracias en especial a mis Hermanos, Lau y Tuan. Gracias por las peleas, los juegos, los empapelados y todo. Gracias especiales a mis abuelos Beatriz y Fernando que me aceptaron en su hogar, me mimaron. Gracias por las traspasadas de tute, las mil y una sonrisas y los mil y dos recuerdos. Los adoro acá y en el cielo. ¡Salú, viejito lindo! Gracias Fede. Gracias por las cervezas, las guitarreadas, los chistes, ¡POR BANCARME 4 AÑOS! Gracias Viejitos. Los adoro más que a nada. Gracias por mostrarme lo que es importante, por siempre estar ahí, por buscar siempre un rato. Por estudiar conmigo, tomar una cerveza conmigo, mirar una película en familia. Por ayudar a un pueblo entero y aún así estar ahí, siempre. Por mostrarme que siempre vale la pena sacrificarse un poco por los demás. Porque no puedo imaginarme una mejor familia que la que tengo. Por los besos, los abrazos, mis estudios, mis recuerdos. Siempre me dijeron único que me dejarían sería educación y cariño... Gracias y Gracias.

Gracias a todos lo que pasaron por mi vida. Gracias por estar y espero estén a la vuelta. Y si no están... los iré a buscar.