



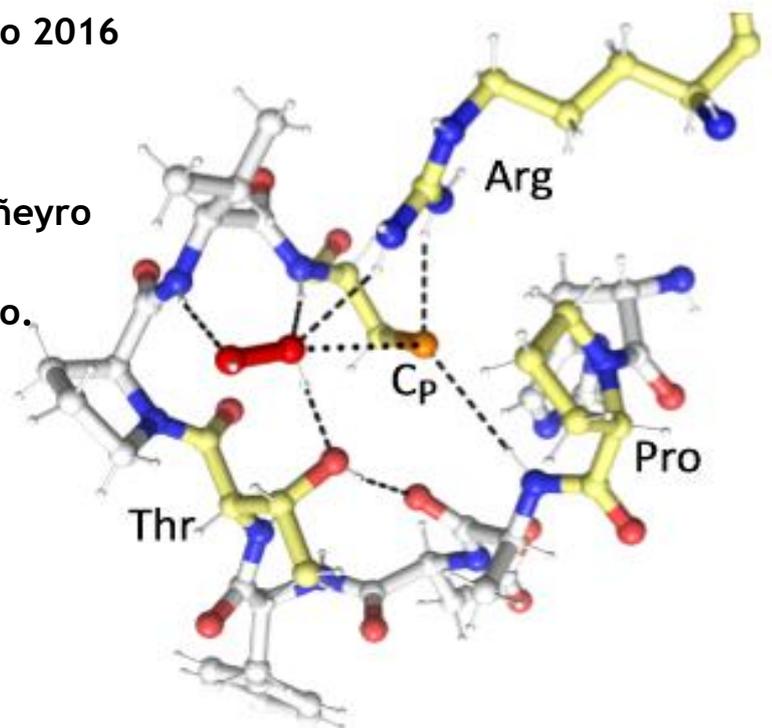
*Expresión, purificación y caracterización de peroxirredoxinas recombinantes de Fasciola hepatica y humanas. Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasa de Trypanosoma cruzi.*

Tesina de Grado, Licenciatura en Bioquímica.

**Mercedes Paz**

Junio 2016

Tutora: Dra. María Dolores Piñeyro  
Unidad de Biología Molecular  
Institut Pasteur de Montevideo.



# Agradecimientos

---

*Le agradezco a toda mi familia por su cariño y palabras de aliento a lo largo de estos años, en especial a mi madre por su apoyo e incondicionalidad desde el comienzo, brindándome siempre todo lo necesario para poder estudiar y realizar este sueño.*

*A mis amigos, mis amigas de toda la vida que son como mis hermanas siempre presentes en los momentos más importantes. A mis amigos de la facu, que estoy feliz de haberlos conocido.*

*Le agradezco a Fede, por su amor y su alegría que siempre me empuja hacia adelante.*

*También quiero agradecerle a Dolores, por brindarme su tiempo y darme la oportunidad de aprender y trabajar junto a ella. A Carlos Robello por abrirme las puertas del laboratorio para hacer esta pasantía, y a todos los de la UBM que siempre estuvieron dispuestos a brindarme su ayuda ante cualquier duda o dificultad en el laboratorio.*

---

## Resumen

---

Las peroxirredoxinas (Prxs) componen una familia de enzimas peroxidasa ampliamente distribuidas en la naturaleza y son expresadas en organismos de todos los reinos. Su mecanismo de acción está basado en la presencia de residuos de cisteína en el sitio activo y no requieren de ningún cofactor para su actividad. Durante el ciclo catalítico, todas las Prxs catalizan un mismo primer paso en la reducción de hidroperóxido, peroxinitrito o hidroperóxidos orgánicos a agua, nitrito y alcohol respectivamente con la concomitante oxidación del tiol de la cisteína reactiva peroxidática ( $C_P-S^-$ ) a ácido sulfénico ( $C_P-SOH$ ). En esta tesina se trabajó con Prxs pertenecientes a la subfamilia de 2-Cys Prxs típicas donde la cisteína peroxidática y la cisteína resolutiva se encuentran en subunidades diferentes, con lo cual los miembros de esta subfamilia son homodímeros obligados en la generación de una molécula reactiva. La multiplicidad de funciones que han sido encontradas para las Prxs ha abierto una nueva era en cuanto a la investigación de estas proteínas, que no se restringe únicamente a la protección frente al estrés oxidativo. Se requieren más estudios para esclarecer los roles que son capaces de cumplir tanto *in vivo* como *in vitro* con el fin común de contribuir a nuevas estrategias para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades.

En este trabajo la proteína FhePrx del parásito helminto *Fasciola hepatica*, y las proteínas PrxI y PrxII humanas fueron expresadas de forma recombinante en *E. coli*, fusionadas en el extremo N-terminal a una cola de seis histidinas, lo que permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC). De esta forma se obtuvieron de forma soluble, con un alto grado de pureza y en gran cantidad. De manera de analizar la calidad de las proteínas obtenidas se caracterizó la actividad enzimática por parte de estas mediante ensayos de consumo del sustrato  $H_2O_2$  *in vitro*. Los resultados mostraron que las proteínas obtenidas fueron activas, y esta actividad fue dependiente de tiol, de la concentración de enzima y de sustrato. Como resultado de un segundo objetivo presentado en este trabajo, se realizó el clonado direccional del gen codificante para la triparredoxina peroxidasa citosólica (CPX) de *T. cruzi* en el vector de expresión pET28c, con el que quedó pendiente corroborar el correcto posicionamiento del marco de lectura para poder llevar a cabo la expresión proteica en células de *E. coli* BL21 (DE3).

# Contenido

---

<b>1. Introducción.....</b>	<b>9</b>
1.1 Peroxirredoxinas: historia y generalidades.....	9
1.2 Características estructurales y clasificación de las peroxirredoxinas.....	12
1.3 Ciclo catalítico: oxidación de la cisteína peroxidática, resolución y reciclaje.....	16
1.4 Hiperoxidación de la C <sub>P</sub> en las 2-Cys Prxs típicas.....	20
1.5 Múltiples funciones de las peroxirredoxinas en distintos organismos.....	23
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Materiales.....	29
3.1.1 Soluciones.....	29
3.1.2 Soluciones amortiguadoras o <i>buffers</i> .....	29
3.1.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	30
3.1.4 Medios de cultivo.....	31
3.1.5 Vectores plasmídicos.....	31
3.1.6 Enzimas ADN polimerasas.....	33
3.1.7 Enzimas de restricción.....	33
3.1.8 Enzimas ADN ligasas.....	33
3.1.9 Reactivos químicos y otros materiales.....	33
3.2 Métodos.....	34
3.2.1 <i>Métodos relacionados a la preparación de cepas de E.coli</i> .....	34
3.2.1.1 Preparación de células electrocompetentes.....	34
3.2.1.2 Transformación de células electrocompetentes.....	34
3.2.2 <i>Métodos relacionados al análisis de ADN</i> .....	35
3.2.2.1 Purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias.....	35
3.2.2.2 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	36
3.2.2.3 Cuantificación de ADN.....	36
3.2.2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	36
3.2.2.5 Amplificación por PCR de los genes codificantes para las proteínas <i>TcMPX</i> y <i>TcCPX</i> .....	37
3.2.2.6 Agregado de deoxinucleótidos de adenina (dATP) a los productos de PCR generados por la ADN polimerasa Phusion™.....	38
3.2.2.7 “ <i>Colony</i> ” PCR.....	38
3.2.2.8 Clonado direccional de los genes codificantes para las tirparredoxina peroxidasa <i>TcCPX</i> y <i>TcMPX</i> el vector de expresión pET28c.....	39

3.2.2.9 Defosforilación del vector de expresión pET28c.....	40
3.2.3 <i>Métodos relacionados a la manipulación y análisis de proteínas</i> .....	40
3.2.3.1 Expresión y análisis de las proteínas recombinantes.....	40
3.2.3.2 “ <i>Screening</i> ” rápido de expresión de proteínas recombinantes....	41
3.2.3.3 Expresión y purificación de las Prx <i>FhePrx</i> y <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> .....	42
3.2.3.4 Cuantificación de proteínas en solución.....	44
3.2.3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 12% (SDS-PAGE)...	45
3.2.3.6 Digestión proteolítica de la His- <i>TcTXN1</i> con trombina.....	46
3.2.3.7 Reducción de <i>TcTXN1</i> con DTT.....	46
3.2.3.8 Ensayos de actividad de consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> por parte de las proteínas recombinantes.....	46
<b>4. Resultados</b> .....	<b>48</b>
4.1 Expresión de las proteínas recombinantes <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> , <i>FhePrx</i> , <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> .....	48
4.1.1 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes ...	48
4.1.2 “ <i>Screening</i> ” rápido de expresión de las proteínas recombinantes <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> .....	51
4.2 Expresión y purificación de las peroxirredoxinas <i>FhePrx</i> , <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> .....	57
4.2.1 Purificación de la proteína recombinante <i>hPrxI</i> .....	57
4.2.2 Purificación de la proteína recombinante <i>hPrxII</i> .....	58
4.2.3 Purificación de la proteína recombinante <i>FhePrx</i> .....	59
4.2.4 Análisis de las proteínas recombinantes purificadas mediante electroforesis SDS-PAGE 12% en condiciones reductoras y no reductoras.....	60
4.3 Ensayos de actividad de consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> por parte de las proteínas recombinantes.....	62
4.3.1 Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia o ausencia de DTT en función de la concentración de proteína.....	62
4.3.2 Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en función de la concentración de sustrato.....	64
4.3.3 Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en presencia de DTT o de la proteína <i>TcTXN1</i> .....	66
4.4 Clonado direccional de los genes codificantes para las tirparredoxina peroxidasas mitocondrial ( <i>TcMPX</i> ) y citosólica ( <i>TcCPX</i> ) de <i>T. cruzi</i> en el vector de expresión pET28c.....	67
4.4.1 Amplificación por PCR de los genes codificantes para las proteínas <i>TcCPX</i> y <i>TcMPX</i> .....	67
4.4.2 Subclonado de los genes codificantes para <i>TcCPX</i> y <i>TcMPX</i> en el vector	

de expresión pET28c.....	70
<b>5. Discusión.....</b>	<b>73</b>
5.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> , <i>FhePrx</i> , <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> .....	73
5.2 Ensayos de actividad de consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> por parte de las proteínas recombinantes.....	75
5.3 Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasas <i>TcMPX</i> y <i>TcCPX</i> en el vector de expresión pET28c.....	78
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
6.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> , <i>FhePrx</i> , <i>MtAhpC</i> y <i>TbXNPx</i> .....	79
6.2 Ensayos de actividad de consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <i>in vitro</i> por parte de las proteínas recombinantes.....	80
6.3 Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasas <i>TcMPX</i> y <i>TcCPX</i> en el vector de expresión pET28c.....	80
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>80</b>
<b>8. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>82</b>

---

# Índice de figuras y tablas

---

## Figuras

<b>Figura 1.</b> Residuos aminoacídicos conservados dentro del sitio activo de las Prxs.....	12
<b>Figura 2.</b> Estructuras cuaternarias de las Prxs.....	14
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético de la familia de Prxs.....	15
<b>Figura 4.</b> Ciclo catalítico de las Prxs.....	17
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de reacción de las tres subfamilias de Prxs.....	18
<b>Figura 6.</b> Diferencias estructurales entre las Prxs sensibles y robustas a la hiperoxidación .....	22
<b>Figura 7.</b> Análisis de la expresión y la solubilidad para las proteínas <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> , <i>FhePrx</i> , <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> , SDS-PAGE al 12%. .....	48
<b>Figura 8.</b> Análisis de la expresión y solubilidad para las proteínas <i>TbTXNPx</i> y <i>MtAhpC</i> , SDS-PAGE al 12%.....	49
<b>Figura 9.</b> Resultado de la “ <i>colony</i> ” PCR. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de “ <i>colony</i> ” PCR de colonias transformadas con los plásmidos pQE-30- <i>Mt</i> <i>AhpC</i> y pQE-30- <i>TbTXNPx</i> .....	50
<b>Figura 10.</b> “ <i>Screening</i> ” rápido de expresión de proteínas recombinantes <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> , SDS-PAGE al 12 %. .....	51
<b>Figura 11.</b> “ <i>Screening</i> ” rápido de expresión de proteínas recombinantes <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> . Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12 %.....	52
<b>Figura 12.</b> “ <i>Screening</i> ” rápido de expresión de proteínas recombinantes <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> . Electroforesis SDS-PAGE al 12 %.....	53

<b>Figura 13.</b> Análisis de la expresión y solubilidad para las proteínas <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> , SDS-PAGE al 12 %.....	55
<b>Figura 14.</b> Ensayo de “captura” de las proteínas <i>MtAhpC</i> y <i>TbTXNPx</i> Electroforesis SDS-PAGE 12 %.....	56
<b>Figura 15.</b> Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante <i>hPrxI</i> SDS- PAGE al 12%.....	58
<b>Figura 16.</b> Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante <i>hPrxII</i> SDS- PAGE al 12%.....	59
<b>Figura 17.</b> Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante <i>FhePrx</i> SDS- PAGE al 12%.....	60
<b>Figura 18.</b> Perfil electroforético de las proteínas recombinantes en condiciones reductoras y no reductoras, hervidas y sin hervir SDS-PAGE al 12%.....	61
<b>Figura 19.</b> Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dependiente de DTT por parte de las proteínas <i>TcCPX</i> , <i>TcCPXC52S</i> , <i>TcMPX</i> , <i>FhePrx</i> , <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> en función de la concentración de proteína.....	63
<b>Figura 20.</b> Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por parte de las proteínas <i>TcCPX</i> , <i>TcCPXC52S</i> , <i>TcMPX</i> , <i>FhePrx</i> , <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> en función de la concentración de sustrato .....	65
<b>Figura 21</b> Consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por parte de las proteínas <i>TcCPX</i> , <i>TcCPXC52S</i> , <i>TcMPX</i> , <i>FhePrx</i> , <i>hPrxI</i> y <i>hPrxII</i> en presencia o ausencia de DTT, o en presencia de la proteína <i>TcTXN1</i> .....	67
<b>Figura 22.</b> PCR de los genes codificantes para las proteínas <i>TcMPX</i> y <i>TcCPX</i> a partir de ADN genómico y ADN plasmídico. ....	68
<b>Figura 23.</b> Purificación de ADN plasmídico de los plásmidos <i>TcCPX</i> - pGEM-T y <i>TcMPX</i> - pGEM-T a partir de células XL1-blue transformadas .....	69
<b>Figura 24.</b> Digestión enzimática de los plásmidos <i>TcCPX</i> -pGEM-T y <i>TcMPX</i> -pGEM-T con <i>EcoRI</i> .....	70

**Figura 25.** Digestión doble de los plásmidos *TcCPX*- pGEM-T y *TcMPX*-pGEM-T y del plásmido pET28c con las enzimas *NdeI* y *XhoI* .....71

**Figura 26.** “Colony” PCR de colonias transformadas con los productos de ligación *TcCPX*-pET28c y *TcMPX*-pET28c .....72

### Tablas

**Tabla 1** Resumen de las seis subfamilias de Prxs y sus características.....16

---

# 1. Introducción

---

## 1.1 Peroxirredoxinas: historia y generalidades.

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son producidas en todas las células aerobias como subproducto del metabolismo normal del oxígeno (San-Miguel y Martin-Gil, 2009). Algunas de estas son radicales libres tales como anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical oxhidrilo ( $HO^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) y radicales lipídicos, mientras que otras, como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) no lo son. A bajas concentraciones ciertas ERO son necesarias para el funcionamiento celular pudiendo actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación celular (Herrera, 2001). Sin embargo, cuando son producidas en exceso durante procesos como fagocitosis, infección, o inflamación en un ambiente estresante pueden acumularse hasta alcanzar niveles tóxicos generando deterioros oxidativos en las macromoléculas, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos, bases púricas y pirimidínicas del ADN, así como el esqueleto de las desoxirribosas, lo cual puede dañar de manera reversible o permanente a las células (San-Miguel y Martin-Gil, 2009; Ursini, Maiorino y Forman, 2016).

La capacidad de lidiar con las ERO es indispensable para la vida. En términos de defensas antioxidantes, hay una batería de enzimas detoxificantes: la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa dependiente de selenio, tiol-peroxidasa, entre otras. Dentro de la familia de las peroxidasa, las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (Gpx), fueron descubiertas en 1900 (Loew, 1900) y en 1957 (Mills, 1957) respectivamente, y han sido desde entonces estudiadas extensivamente. Para llevar a cabo la catálisis ambas necesitan de cofactores especiales, tanto un grupo hemo (catalasa) como un residuo selenocisteína (glutatión peroxidasa) y son muy efectivas catalíticamente, con constantes de velocidad de segundo orden  $k_{cat}/K_M$  cercanas a  $10^8$  y  $10^7 M^{-1} s^{-1}$  respectivamente (Karplus, 2015).

Hasta hace unos años atrás se pensaba que estas dos enzimas eran las más importantes dentro de las células a la hora de protegerlas frente a la acción de

peróxidos. Fue en 1994 debido a una comparación de secuencias entre proteínas que se reconoció un tercer tipo de peroxidases, que representan una familia de proteínas muy abundantes y altamente esparcidas en la naturaleza, conocidas hoy en día como peroxirredoxinas (Prxs) (Chae *et al.*, 1994; Karplus, 2015). En ese estudio las Prxs analizadas fueron solo tres, nombradas en ese momento como TSA (del inglés *thiol-specific antioxidants*) de levadura y de rata, y AhpC (del inglés *alkyl hydroperoxide reductase*) de *Salmonella typhimurium*. Al igual que todas las Prxs caracterizadas hasta ahora, estas no utilizan cofactores para la catálisis, sino que simplemente utilizan residuos de cisteína (Cys) para reducir a sus sustratos. Tanto uno como dos residuos Cys pueden estar involucrados en la catálisis, y basándose en el rol de cada uno se propuso llamarlos Cys “peroxidática” o C<sub>P</sub> y Cys “resolutiva” o C<sub>R</sub> (Karplus, 2015). La C<sub>P</sub> reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se oxida a ácido sulfénico. El ácido sulfénico es resuelto con la formación de un puente disulfuro con la C<sub>R</sub> en los casos en que se encuentra presente.

Por muchos años se creyó que las Prxs eran poco eficientes detoxificando peróxidos debido a que las constantes de velocidad de segundo orden reportadas eran de tan solo 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Hofmann, Hecht y Flohé, 2002). Esto cambió luego de que se reconoció que esta constante no estaba reflejando la velocidad intrínseca de la reacción de reducción de peróxido, si no que reflejaba la velocidad a la cual la enzima era regenerada por un reductor externo añadido en el ensayo. Luego de abordar este problema para la AhpC de *S. typhimurium*, se obtuvieron constantes de velocidad de segundo orden de 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Hofmann, Hecht y Flohé, 2002; Karplus, 2015), valor que hoy en día parece ser típico para las Prxs y las pone a la par de otras peroxidases.

Además, varios estudios empiezan a acumular evidencia de que ciertas proteínas miembros de la familia de las Prxs tienden a expresarse mucho más que la catalasa y Gpx (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Karplus, 2015; Leyens, Donnay y Knoop, 2003), por lo que se ha estimado que por encima del 99% del peróxido citosólico y por encima del 90% del peróxido mitocondrial de células humanas reaccionaría con las Prxs antes que con otras enzimas o tioles de bajo peso molecular (Cox, Winterbourn y Hampton, 2010; Karplus, 2015; Winterbourn y Hampton, 2008). Otros organismos directamente no expresan Gpx y/o catalasa pero si expresan Prxs,

lo que refuerza la importancia de estas en la detoxificación de peróxidos en la células (Castro y Tomás, 2008; Piñeyro *et al.*, 2011).

Muchos otros roles, y no menos importantes, han sido atribuidos a las Prxs. Estas pueden actuar como chaperonas formando estructuras macromoleculares (Karplus, 2015; Perkins *et al.*, 2015), participan en procesos de inflamación e inmunidad innata ya que son secretadas por las células, existiendo un campo de estudio muy grande de estas Prxs extracelulares (Ishii, Warabi e Yanagawa, 2012).

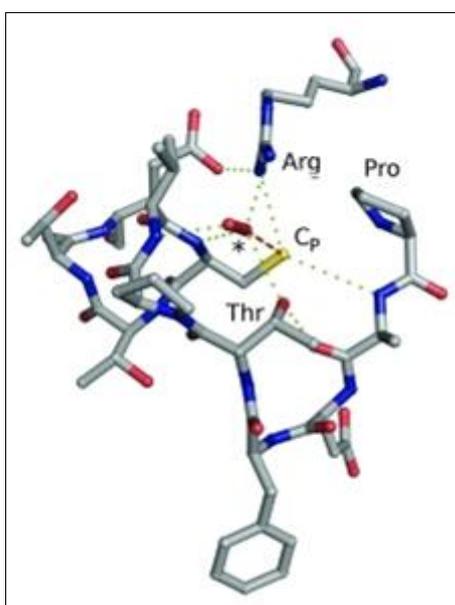
También han sido implicadas en la activación de factores de transcripción y en vías de señalización mediadas por peróxido de hidrogeno, entre las que se destacan cascadas que concluyen en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Ishii, Warabi e Yanagawa, 2012). Niveles de expresión elevados de Prxs han sido encontrados en ciertos tipos de cáncer, lo que se ha asociado a la resistencia de tumores malignos a tratamientos de quimioterapia y radioterapia (Ishii, Warabi e Yanagawa, 2012; Perkins *et al.*, 2015). También en individuos con la enfermedad de Alzheimer se han visto ciertas Prxs con nitraciones anormales (Perkins *et al.*, 2015). Adicionalmente, organismos patógenos a expensas de sus Prxs, son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero, haciéndolas blancos prometedoros para el desarrollo de nuevas drogas. Estos hallazgos motivan a seguir explorando los roles fisiológicos de estas proteínas tanto como los mecanismos moleculares involucrados en su función enzimática y en su regulación (Perkins *et al.*, 2015).

## 1.2 Características estructurales y clasificación de las peroxirredoxinas.

Las Prxs son proteínas simple dominio cuya estructura se encuentra basada en un plegamiento tipo tiorredoxina, con inserción de otros elementos de estructura secundaria. Este tipo de plegamiento puede ser encontrado en proteínas con una amplia variedad de funciones y se cree que todas ellas evolucionaron desde un ancestro común que presentaba tal plegamiento (Pedone *et al.*, 2010).

Todos los miembros de la familia de Prxs presentan un núcleo estructural común que consta de siete hojas  $\beta$  centrales rodeadas por cinco  $\alpha$  hélices (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015, Perkins *et al.*, 2015). Hoy en día se conocen más de cien estructuras tridimensionales, donde la cantidad de aminoácidos que las componen puede variar desde 160 a 220 residuos.

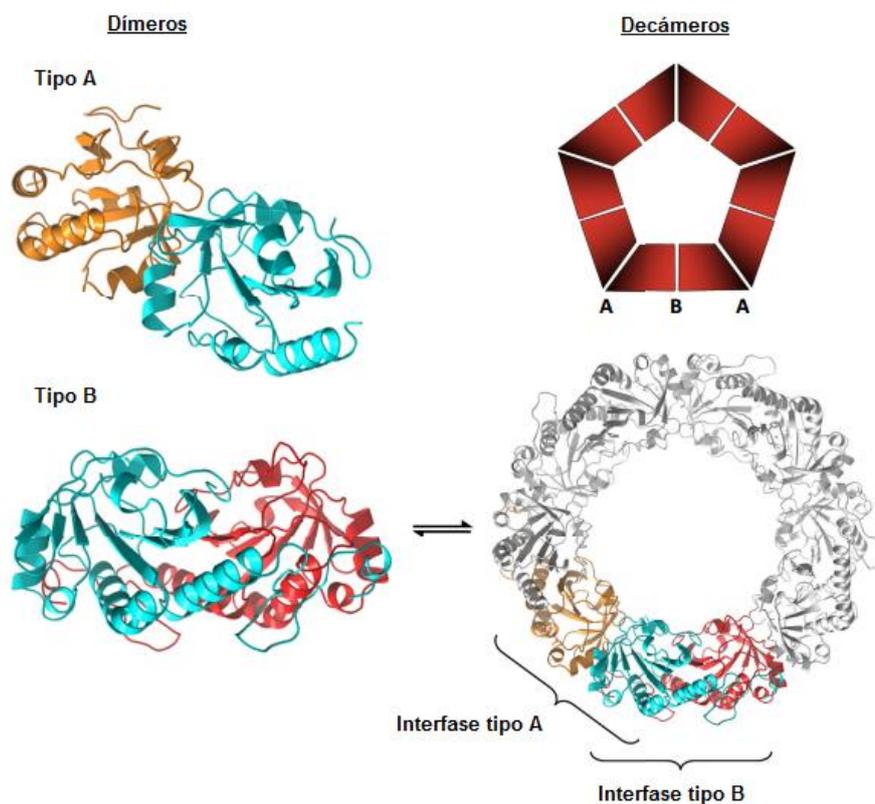
El sitio activo de las Prxs presenta una conformación espacial altamente conservada. Contiene a la  $C_P$  en el fondo de un bolsillo formado por un motivo búclic-hélice, donde la  $C_P$  se localiza en el primer giro de esta hélice, y queda rodeada por tres aminoácidos adicionales conservados: prolina (Pro), treonina (Thr) y arginina (Arg) (**figura1**) aunque el residuo Thr ocasionalmente es sustituido por una serina (Ser) (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015; Wood *et al.*, 2003). La  $C_P$  junto con la Thr y Pro forman parte de un motivo conservado de ocho residuos PXXXTXXC en todas las subfamilias de Prxs, en cambio la Arg se encuentra alejada de estos residuos en la estructura primaria, pero cercana espacialmente (Hall *et al.*, 2011).



**Figura 1. Residuos aminoacídicos conservados dentro del sitio activo de las Prxs.** Se puede apreciar el sitio activo de las Prxs con los residuos conservados Pro, Thr, Cys y Arg, con una molécula de  $H_2O_2$  unida mostrada en rojo. Imagen tomada de Hall *et al.*, 2011.

Los aminoácidos Thr y Arg junto con la  $C_P$  constituyen la triada catalítica cumpliendo roles cruciales dentro del sitio activo. Los primeros dos, Thr y Arg, junto con grupos amida de la cadena principal proteica establecen enlaces de hidrógeno con el sustrato hidroperóxido y con la cadena lateral de la  $C_P$ . (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015). Esto contribuye en parte a disminuir el  $pK_a$  de la  $C_P$  desde su valor típico de 8.4 (valor que hace referencia al  $pK_a$  de un residuo de Cys sin interactuar en un microambiente proteico) a valores que rondan entre 5.1 y 6.3 lo que estabiliza la forma tiolato aniónica ( $R-S^-$ ) a pH fisiológico (Perkins *et al.*, 2015). Además gracias a estudios recientes de modelado computacional y estructurales, se logró ver que los residuos conservados en el sitio activo en una conformación tridimensional totalmente plegada, orientan y activan al sustrato peróxido para que ocurra la catálisis, ya que proveen de enlaces de hidrógeno y de un ambiente estérico que crea un “camino de oxígeno” (o *oxygen track* en inglés) en el que los átomos de oxígeno del peróxido  $HO_A-O_BR$  (siendo  $O_A$  el átomo de oxígeno que es atacado por la  $C_P$  y  $O_B$  el que se encuentra asociado con el grupo saliente, ya sea alcóxido o hidróxido) se pueden mover hacia el tiolato  $C_P.S^-$  y alejándose uno del otro durante el curso de la reacción, lo que provocaría la ruptura del enlace  $O_A-O_B$  (Hall *et al.*, 2010; Perkins *et al.*, 2015; Rhee, 2016).

En lo que se refiere a estructura cuaternaria, las Prxs existen como monómeros, dímeros tipo A o tipo B, decámeros o dodecámeros ensamblados por cinco o seis dímeros tipo B que se asocian formando una estructura anular mediante la interacción de las interfases tipo A. Los dímeros tipo B se asocian vía los bordes de las hojas  $\beta$  de forma antiparalela, por lo que estos quedan formando una lámina  $\beta$  de 10-14 hojas  $\beta$ . En los dímeros tipo A en cambio, la asociación se da mayormente vía los bucles cercanos a la  $\alpha_3$  (**figura 2**) (Karplus, 2015; Perkins *et al.*, 2015). Además de las estructuras decaméricas y dodecaméricas, pueden llegar a formarse grandes complejos macromoleculares que forman agregados en forma esférica o de polímeros lineales con final abierto, dependiendo del estado redox de la  $C_P$  y de la concentración proteica. Estos macrocomplejos se han asociado mayormente a la función chaperona (Flohé y Harris, 2007; Perkins *et al.*, 2015).

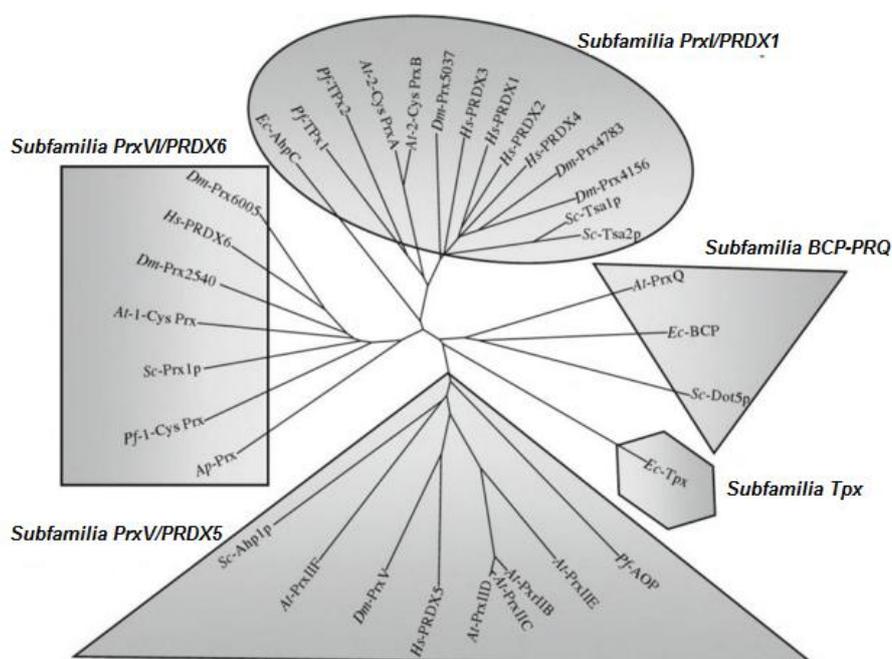


**Figura 2. Estructuras cuaternarias de las Prxs.** Tomado de Perkins *et al.*, 2015.

Las Prxs son clasificadas de dos maneras. La primera es en base al mecanismo de reacción y a la cantidad de residuos de Cys involucrados directamente en la catálisis, mientras que la segunda clasificación es en base a la homología de secuencia (Karplus, 2015). Según la primera se obtienen dos subfamilias: 1-Cys Prxs y 2-Cys Prxs (las 1-Cys Prxs presentan solo a la  $C_p$  y las 2-Cys Prxs presentan tanto la  $C_p$  como la  $C_R$ ). A su vez las 2-Cys Prxs se subdividen en dos grupos: típicas y atípicas (ya que difieren en su mecanismo de acción).

La segunda clasificación surgió a partir de la construcción de árboles filogenéticos basados en la secuencia de Prxs pertenecientes a procariotas, archaeas y eucariotas, lo que sirvió para poner en evidencia que existen subfamilias conformadas tanto por 2-Cys Prxs como por 1-Cys Prxs. En el árbol de la **figura 3** se pueden reconocer cinco subfamilias, y analizándolo detalladamente se ve que por ejemplo la Prx5 humana (Prxs 2-Cys atípicas) y la Ahp1p de *S. cerevisiae* (Prx 2-Cys

típica) mecanísticamente clasificadas en subfamilias distintas, con esta segunda clasificación pertenecen al clúster o subfamilia PrxV/ PRDX<sub>5</sub> (Flohé y Harris, 2007).



**Figura 3. Árbol filogenético de la familia de Prxs.** Se observan cinco subfamilias: PrxI/PRDX1, BCP/PrxQ, Tpx, PrxV/PRDX5 y PrxVI/PRDX6. *Ec:* *Escherichia coli*; *Ap:* *Aeropyrum pernix*; *Sc:* *Saccharomyces cerevisiae*; *Pf:* *Plasmodium falciparum*; *At:* *Arabidopsis thaliana*; *Dm:* *Drosophila melanogaster*; *Hs:* *Homo sapiens*. Adaptado de Flohé y Harris, 2007.

Sin embargo este esquema es un poco antiguo y hoy en día existe la base de datos PREX (cuyas siglas provienen del inglés *PeroxiRedoxin classification indEX*) que clasifica a las Prxs de manera no ambigua según información estructural y de secuencia del sitio activo (Soito *et al.*, 2010), resultando en la aparición de seis subfamilias en lugar de cinco (**tabla 1**). La subfamilia adicional encontrada es la AhpE, que al igual que las demás, su nombre es debido al miembro canónico. En esta última subfamilia el miembro canónico es la AhpE de *Mycobacterium tuberculosis*, la única que ha sido bien caracterizada hasta el momento dentro de esta subfamilia (Perkins *et al.*, 2015). En la **tabla 1** se puede observar la amplia distribución biológica de las subfamilias AhpC/Prx1 y Prx6. La subfamilia PrxQ parece estar ausente en animales, la subfamilia Prx5 no se ha caracterizado aún en archaeas, y las subfamilias Tpx y AhpE parecen estar presentes solo en bacterias.

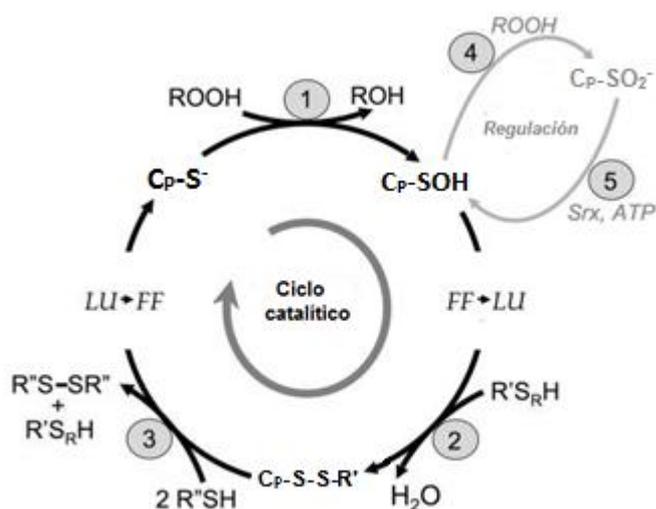
**Tabla 1: Resumen de las seis subfamilias de Prxs y sus características.** Adaptada de Perkins *et al.*, 2015 y de Soito *et al.*, 2010.

Subfamilia	Distribución filogenética	Grado de oligomerización e interfaces.	Conservación y localización de C <sub>R</sub> (si está presente)
<b>AhpC/Prx1</b>	Archaeas, bacterias, plantas y otros eucariotas	Dímeros tipo-B, decámeros y dodecámeros, a través de interface A.	C-terminal (~99%)
<b>BCP/PrxQ</b>	Archea, Bacterias, plantas y hongos (no animales)	Monómeros y dímeros tipo-A	Hélice α2 (~61%) Hélice α3 (~6%)
<b>Prx5</b>	Bacterias, plantas y eucariotas (no archea)	Dímeros tipo-A	Hélice α5 (~21%) Entre hojas β1 y β2 del N-terminal (~17%)
<b>Prx6</b>	Archaeas, bacterias, plantas y otros eucariotas	Dímeros tipo-B, decámeros a través de interfase A.	Sin CR (≥41%)
<b>Tpx</b>	Bacterias	Dímeros tipo-A	Hélice α3 (>95%)
<b>AhpE</b>	Bacterias	Dímeros tipo-A	Hélice α2 (~67%) Sin CR (≥19%)

### 1.3 Ciclo catalítico: oxidación de la cisteína peroxidática, resolución y reciclaje.

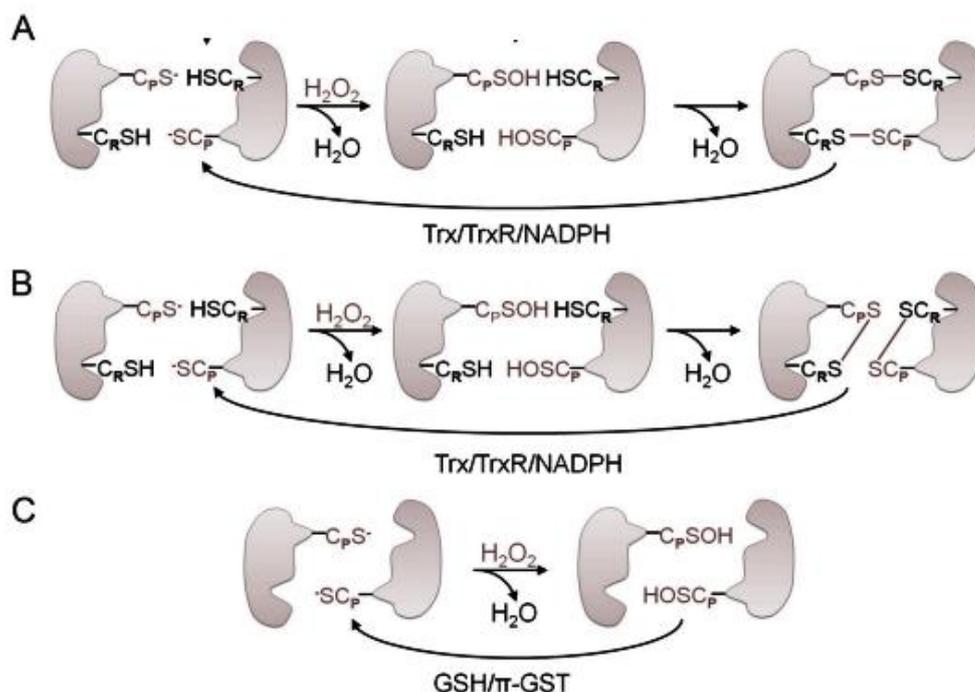
El ciclo catalítico de las Prxs involucra tres pasos fundamentales que se pueden ver esquematizados en la **figura 4**. Paso (1): *oxidación de la cisteína peroxidática*, reacción entre la C<sub>P</sub> en forma de tiolato (C<sub>P</sub>-S<sup>-</sup>) y una molécula de peróxido mediante un ataque nucleofílico de tipo S<sub>N</sub>2, resultando en la C<sub>P</sub> oxidada en la forma de ácido sulfénico (C<sub>P</sub>-SOH). Paso (2): *resolución*, donde un segundo tiol reacciona con C<sub>P</sub>-SOH para formar un enlace disulfuro. Y el paso (3): *reciclaje*, donde el enlace disulfuro formado anteriormente es regenerado y la C<sub>P</sub> retoma su estado inicial C<sub>P</sub>-S<sup>-</sup> (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015; Perkins *et al.*, 2015). El paso (1) es igual

en todas las Prxs, en cambio los siguientes dos pueden ser logrados de varias maneras, dependiendo de la Prx en cuestión.



**Figura 4. Ciclo catalítico de las Prxs.** Representado con flechas negras se pueden apreciar los tres pasos fundamentales del ciclo, común a todas las Prxs, (1) Peroxidación (2) Resolución (3) Reciclaje. Con flechas de color gris tenue se pueden apreciar pasos regulatorios (4) y (5) que pueden darse en las Prxs. Adaptado de Hall *et al.*, 2011.

La resolución puede ocurrir de tres maneras. En el caso de las 2-Cys Prxs típicas la  $C_R$  se localiza en la región C-terminal del monómero adyacente a donde se encuentra la  $C_P$ , por lo que se forma un enlace disulfuro intermolecular tras la oxidación de la  $C_P-S^-$  a  $C_P-SOH$  (**figura 5 A**). En el caso de las 2-Cys atípicas, la  $C_P$  se encuentra en el mismo monómero que la  $C_R$  por lo que el enlace disulfuro que se forma en este caso es intramolecular (**figura 5 B**). Por el contrario, las 1-Cys Prxs carecen de la  $C_R$ . Debido a esto, la  $C_P-SOH$  es reducida por otro tiol perteneciente a otra proteína o a una molécula de bajo peso molecular (**figura 5 C**) (Rhee *et al.*, 2011).



**Figura 5. Mecanismos de reacción de las tres subfamilias de Prxs.** (A) 2-Cys Prxs típicas, (B) 2-Cys Prxs típicas y (C) 1-Cys Prxs. Adaptado de Rhee *et al.*, 2011.

El reciclaje a la forma reducida puede llevarse a cabo por diferentes enzimas así como por una variedad de compuestos tiólicos de bajo peso molecular tales como el ditioneol (DTT) (Karplus, 2015; Perkins *et al.*, 2015). Para muchas Prxs el reductor fisiológico es la proteína tiorredoxina, pero para otras existen proteínas específicas que contienen un dominio tipo tiorredoxina. Un ejemplo de esto son las enzimas AhpF en bacterias, que son las encargadas de reducir a las Prxs AhpC (Poole *et al.*, 2000). Otros organismos como los parásitos tripanosomátidos utilizan a la enzima triparredoxina para concretar el paso de reducción, que pertenece a la superfamilia de tiorredoxinas, la que recibe electrones de un ditiol de bajo peso molecular presente únicamente en estos organismos denominado tripanotión (Castro y Tomás, 2008; Piñeyro *et al.*, 2011). Se han encontrado también otras proteínas inusuales capaces de reciclar a las Prxs a la forma reducida que presentan actividad tipo tiorredoxina pero su estructura es muy distinta a estas. Por ejemplo, la enzima AhpD que fue identificada como reductora de las AhpC en micobacterias (Hillas, 2000).

Durante el ciclo catalítico ocurren cambios conformacionales en el sitio activo, el que varía entre una conformación totalmente plegada (FF, *fully folded*) y una conformación localmente desplegada (LU, *locally unfolded*) (Perkins, Poole y Karplus, 2014). La primera se refiere a una conformación tridimensional muy bien definida y altamente conservada entre las Prxs requerida para que se dé una unión productiva del sustrato. En esta conformación la C<sub>P</sub> en su forma reducida se localiza en el primer giro de la hélice  $\alpha_2$  y queda posicionada en el fondo de un bolsillo rodeada por los residuos Pro, Thr y Arg conservados, lo que genera una accesibilidad limitada de la cadena lateral de la C<sub>P</sub> y la aleja de la C<sub>R</sub> previniendo que esta reaccione para formar un disulfuro (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015; Piñeyro *et al.*, 2005).

En contraste con la conformación FF que está altamente conservada y es esencial para todas las Prxs que presenten una actividad peroxidasa considerable, la conformación LU puede adoptar múltiples conformaciones, presentando grandes variaciones dentro de una Prx dada o entre distintas Prxs. Esta conformación LU es requerida para que ocurra el paso de resolución (paso 2, **figura 4**) y se caracteriza principalmente en que el bolsillo del sitio activo ya no se encuentra presente y la cadena lateral de la C<sub>P</sub> queda expuesta y disponible para reaccionar con otro tiol. Básicamente, ocurre un desenrollamiento local de la hélice  $\alpha_2$  en el bucle en el que se encuentra la C<sub>P</sub>, necesario para que se pueda formar el enlace disulfuro con la C<sub>R</sub> u otro tiol (Hall *et al.*, 2011; Karplus, 2015). En las formas C<sub>P</sub>-SH y C<sub>P</sub>-SOH las conformaciones FF y LU rápidamente se equilibran, pero en la forma disulfuro, las Prxs quedan atrapadas en la conformación LU hasta que puedan ser reducidas a la forma C<sub>P</sub>-SH (Perkins *et al.*, 2015). Para las Prxs que presentan un mecanismo de 2-Cys Prxs, también ocurren reordenamientos conformacionales en la región donde se localiza la C<sub>R</sub> necesarios para la formación del enlace disulfuro.

Otro aspecto importante del cambio conformacional FF  $\leftrightarrow$  LU es que existe una conexión entre la estructura cuaternaria de la proteína y la conformación del sitio activo en Prxs miembros de la subfamilia Prx1 o 2-Cys típicas que adoptan formas decaméricas por asociación de dímeros tipo B. En estas proteínas, los residuos cercanos al bucle que contiene la C<sub>P</sub> y el brazo C-terminal participan de las interacciones que se dan en la interfase entre dímeros para estabilizar estas formas decaméricas. Cuando ocurre el cambio a la forma LU estas interacciones se debilitan

desestabilizando al decámero, lo que significa que cuando la Prx se oxida y queda retenida en la conformación LU debido a la formación enlace disulfuro, esta tiende a disociarse en los respectivos dímeros tipo B (Guimarães *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2002).

#### 1.4 Hiperoxidación de la C<sub>P</sub> en las 2-Cys Prxs típicas.

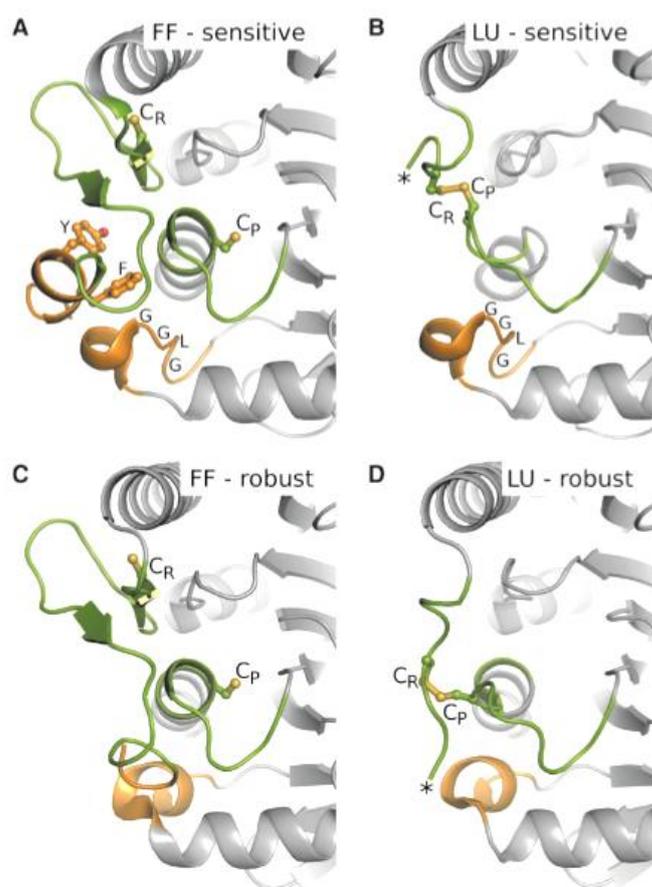
Además de la reacción de resolución descrita anteriormente (**figura 4, paso 2**), la C<sub>P</sub> en su forma C<sub>P</sub>-SOH puede reaccionar con otra molécula de peróxido, para producir el derivado sulfinico C<sub>P</sub>-SO<sub>2</sub><sup>-</sup>, lo que se conoce como *hiperoxidación* (**figura 4, paso 5**). En este estado, la enzima no puede continuar con el ciclo catalítico, si no que se encuentra atascada (Perkins, Poole y Karplus, 2014). Sin embargo, en muchos organismos eucariotas, incluyendo a los humanos, existen enzimas que restauran la proteína al estado C<sub>P</sub>-SOH a través de una reacción dependiente de ATP y Mg<sup>+2</sup>, como la enzima sulfiredoxina (Sxr) y las sestrinas (**figura 4, paso 6**) (Alpfmedical.info, 2016; Lowther y Haynes, 2011). De esta forma la Prxs podría retomar el ciclo catalítico. En lo que se conoce, esta reacción de reactivación ocurre solamente en ciertas Prxs pertenecientes a la subfamilia de las 2-Cys Prxs típicas o Prx1/AhpC (Biteau, Labarre y Toledano, 2003).

La inactivación oxidativa a niveles submilimolares de peróxido se observa en una cantidad de Prxs en organismos eucariotas, en cambio en procariontas, este proceso es poco observable. Existe una explicación estructural para esta mayor sensibilidad a la hiperoxidación por parte de las Prxs 2-Cys típicas eucariotas, y esta se basa en la arquitectura de la proteína que rodea el sitio activo (**figura 6**). En la conformación FF del sitio activo la C<sub>P</sub> y la C<sub>R</sub> se encuentran alejadas aproximadamente 14 Å, por lo tanto para que se pueda formar el enlace disulfuro intermolecular entre estas cisteínas debe ocurrir un reordenamiento estructural que involucra el primer giro de la hélice α<sub>2</sub> de una subunidad y el movimiento de la extensión C-terminal de la otra subunidad (Hall *et al.*, 2011). Cuando el movimiento de la región C-terminal es más lento puede sobrevenir la hiperoxidación ya que provoca una pausa en el ciclo catalítico, dando lugar a que una segunda molécula de peróxido reaccione con la C<sub>P</sub>-SOH. Una de las interacciones que causa esta pausa involucra a la secuencia consenso GGLG localizada en una estructura de bucle, en la misma

subunidad en la que se encuentra la C<sub>P</sub>. La otra interacción se da con la cola C-terminal que se extiende más allá de la C<sub>R</sub> en la segunda subunidad, que contiene a la secuencia consenso YF. Como se observa en la **figura 6**, el motivo YF contenido en una estructura en forma de hélice se posiciona por encima del sitio activo restringiendo la movilidad de esa región prolongando la exposición de la C<sub>P</sub> en su forma oxidada C<sub>P</sub>-SOH al medio. Las Prxs 2-Cys típicas bacterianas tipo-AhpC por el contrario, carecen de la región C-terminal que contiene al motivo YF y del bucle que contiene al motivo GGLG, lo que explica su robustez frente a la hiperoxidación (**figura 6, C y D**) (Hall *et al.*, 2011). Además, hay estudios que demuestran que Prxs eucariotas mutantes carentes de la región C-terminal se vuelven resistentes a la hiperoxidación al igual que las Prxs robustas bacterianas. Por lo tanto, se cree que variaciones de secuencia dentro de la región C-terminal que interrumpen su orientación y/o interacción con el sitio activo pueden aumentar la velocidad de formación del enlace disulfuro y por consiguiente disminuir la susceptibilidad a la hiperoxidación (Cox *et al.*, 2009).

El hecho de que las Prxs eucariotas puedan ser inactivadas y que esta inactivación pueda ser regulada por proteínas específicas (Srx y sestrinas) sugiere que existió una adaptación en estos organismos, para permitir que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se acumule hasta alcanzar niveles substanciales dentro de las células bajo ciertas circunstancias. En mamíferos, células de diferentes tejidos son capaces de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en respuesta a estímulos extracelulares utilizándolo como mensajero intracelular, para mediar la regulación de procesos tales como crecimiento celular, diferenciación celular y expresión génica (Rhee y Woo, 2011). Por ejemplo, en células estimuladas con factores de crecimiento tales como PDGF y EGF (del inglés *platelet-derived growth factor* y *epidermal growth factor* respectivamente) se induce la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular donde la inactivación reversible de ciertas Prxs vía hiperoxidación permitiría la acumulación de esta molécula señalizadora de una manera compartimentalizada, restringida a una zona acotada dentro de la célula, lo que se conoce como hipótesis de compuerta o “*floodgate*” (Karplus, 2015, 12, Perkins *et al.*, 2015; Rhee y Woo, 2011). Un ejemplo notable de esta función es la PrxIII de mamíferos que participa en el control de la producción de corticoesteroides mediante un proceso de retroalimentación negativa. Mientras que este proceso ocurre en las

mitocondrias de la glándula adrenal con un ritmo circadiano, el citocromo P450 activado por la hormona ACTH produce  $H_2O_2$  como subproducto de la producción de corticoesteroides, donde la inactivación de PrxIII por hiperoxidación permite que el  $H_2O_2$  producido se concentre lo suficiente para activar a la proteína p38. Activando a p38 se apaga la síntesis de la proteína STARD1 (del inglés *steroidogenic acute regulatory protein*) encargada de regular el transporte de colesterol dentro de la mitocondria (Perkins, Poole y Karplus, 2014; Rhee, 2016).



**Figura 6. Diferencias estructurales entre las Prxs sensibles y robustas a la hiperoxidación.** En la figura (A) y en la figura (B) se puede apreciar el sitio activo de 2-Cys Prxs sensibles, en la conformación FF y LU respectivamente. Ambas cadenas del dímero están representadas en gris. Las regiones coloreadas en verde representan aquellas que sufren cambios conformacionales en la transición a LU. En naranja se observan las estructuras conservadas YF y GGLG, que son específicas de las Prxs sensibles a la hiperoxidación como se explica en el texto. En la figura (B) se observa cómo en la conformación LU la hélice que contiene a la  $C_P$  y la región C-terminal adquieren una conformación desplegada para que se forme el enlace disulfuro, y cómo la hélice que contiene al motivo YF se posiciona de tal forma que dificulta el proceso. En (C) y (D) se muestra la conformación de las Prxs robustas que carecen de las estructuras YF y GGLG conservadas. Tomado de Hall *et al.*, 2011.

Otro rol importante de la hiperoxidación en las Prxs es que cuando se pierde la actividad peroxidasa, emerge la actividad chaperona debido a la formación de agregados de alto peso molecular compuestos por asociación de varios decámeros (Lee *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 2015; Rhee, 2016). En condiciones de estrés oxidativo o térmico esta ganancia de actividad chaperona serviría para restaurar la función y el correcto plegamiento estructural de otras proteínas. En las dos Prxs citosólicas cPrxI y II de levaduras por ejemplo, se ha visto que pueden formar agregados macromoleculares en respuesta al estrés que son capaces de prevenir significativamente la desnaturalización causada por radicales libres de la proteína  $\alpha$ -sinucleína, principal componente de los cuerpos de Lewy localizados en células neuronales de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Jang *et al.*, 2004). La actividad chaperona de la PrxI de mamíferos también ha sido estudiada, esta Prx tiene la particularidad de que presenta una Cys en la posición 83 (Cys<sup>83</sup>) de la cadena aminoacídica (diferente de la C<sub>P</sub> y C<sub>R</sub>) sensible a cambios redox y que está ausente en otras Prxs tanto de mamífero como de bacterias, levaduras o parásitos. Mediante estudios de cristalografía en los que utilizaban a la PrxI humana recombinante se observó que esta Cys única se encuentra en la interfase dímero-dímero de la estructura decamérica adoptada por la Prx y es capaz de formar un enlace disulfuro con la Cys<sup>83</sup> del siguiente dímero, lo que incrementaría la afinidad entre dos dímeros diferentes estabilizando la forma decamérica como estructura predominante. De esta manera se pierde la actividad peroxidasa ya que esta requiere la transición de decámero a dímero tras la formación del enlace disulfuro intermolecular entre C<sub>P</sub> y C<sub>R</sub>, y se incrementa la actividad chaperona que presenta esta Prx. Esto quedó demostrado tras analizar un mutante de la PrxI humana donde la Cys<sup>83</sup> se sustituyó por una serina. Este mutante presentó mayor actividad peroxidasa siendo más robusto frente a la hiperoxidación y perdió completamente la actividad chaperona (Lee *et al.*, 2007).

### 1.5 Múltiples funciones de las peroxirredoxinas en distintos organismos.

Como se nombró anteriormente las Prxs fueron identificadas inicialmente en levaduras, en cambio la identificación y caracterización de múltiples isoformas fue lograda por primera vez en células de mamíferos (Rhee, 2016). En estos organismos, entre ellos los seres humanos, existen seis isoformas de Prxs. Cuatro de ellas

pertenece a la subfamilia de Prx1 o 2-Cys Prxs típicas dependiendo de la clasificación. Estas son las Prx I y Prx II presentes en el núcleo y en citosol celular, la Prx III presente en la mitocondria y la Prx IV presente en el retículo endoplasmático. Otra Prx, la Prx V se clasifica como 2-Cys Prxs atípica o en la subfamilia de Prx5, y se localiza en peroxisomas, mitocondria y citosol. Por último se encuentra la Prx VI, que es citosólica y se clasifica como 1-Cys Prxs atípica o dentro de la subfamilia de Prx6 (Perkins *et al.*, 2015).

De manera indudable, las Prxs presentan actividad peroxidasa frente una variada especificidad de sustratos, y es crítica a la hora de proteger componentes celulares de daños oxidativos. Sin embargo, la coexistencia de múltiples enzimas capaces de remover peróxidos tales como catalasa, glutatión peroxidasa, ascorbato peroxidasa, y Prxs dentro de un solo organismo, célula, o compartimento subcelular indica que estas enzimas no existen únicamente como defensas antioxidantes. Diferentes peroxidasa y las variadas isoformas, utilizan distintos donadores de electrones y diferentes sustratos y están vinculadas a diferentes redes y vías redox (Rhee, 2016).

Las PrxI y PrxII humanas comparten más del 90 % de identidad de secuencia aminoacídica y ambas se encuentran elevadas en varios tipos de cáncer y muestran ser capaces de influir en muchos procesos celulares (Lee *et al.*, 2007). Sin embargo se han encontrado diferencias funcionales y estructurales entre ellas, que resultan en una distinta susceptibilidad a la hiperoxidación, a la fosforilación y a la actividad peroxidasa y chaperona. La PrxI es menos eficiente como peroxidasa siendo esta actividad más susceptible a la inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y posee una actividad chaperona molecular mayor que la PrxII. Como se mencionó anteriormente la PrxI posee una Cys<sup>83</sup> ausente en otras Prxs de mamíferos incluida la PrxII, que es sensible a cambios redox y es capaz de formar un enlace disulfuro con otra Cys<sup>83</sup> entre dos dímeros contiguos. Este residuo cumple un rol importante en las diferencias observadas entre la PrxI y PrxII, ya que mediante estudios de mutagénesis de la Cys<sup>83</sup> se observaron cambios dramáticos en las propiedades estructurales y funcionales de la PrxI, donde esta perdió completamente la capacidad chaperona y se volvió menos sensible a la inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adquiriendo un comportamiento más parecido al de la PrxII (Lee *et al.*, 2007).

Además estas dos Prxs cumplen distintas funciones en la señalización intracelular. Un porcentaje de la Prxl celular se encuentra asociada a la membrana plasmática en zonas llamadas balsas lipídicas, que son microdominios que sirven como plataforma para el ensamblado de varias proteínas señalizadoras. En estas la Prxl puede ser fosforilada en el residuo de tirosina 94 (Tyr<sup>94</sup>) principalmente por una tirosina quinasa de la familia Src, en células estimuladas vía receptores de factores de crecimiento tales como PDGF o EGF o vía receptores del sistema inmune tales como receptores de células T o B. Esta fosforilación genera una disminución marcada de la actividad peroxidasa lo que permite una acumulación compartimentalizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual es producido por enzimas NADPH oxidasas activadas ancladas también a estas zonas de balsas lipídicas. La acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a su vez promueve la inactivación de Prxl por fosforilación al activar las Src quinasas e inactivar tirosinas fosfatasa (PTPs). Este fenómeno permite mantener el señalamiento por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para la regulación respuestas biológicas (Rhee y Woo, 2011). Por el contrario, aunque la PrxII puede localizarse en zonas de balsas lipídicas, no se ha demostrado que pueda ser fosforilada en células estimuladas con factores EGF o PDGF. Adicionalmente otras funciones se han encontrado para estas Prxs. Participan en la regulación de la expresión génica, en reacciones biológicas asociadas a procesos inflamatorios tales como la reparación tisular, infección por organismos patógenos y progresión tumoral. Particularmente la Prxl es capaz de interactuar con factores de transcripción dentro del núcleo tales como c-Myc y NF-κB. Con c-Myc interactúa mediante un dominio altamente conservado Myc Box II (MBII) el cual es crítico en la regulación transcripcional. Se ha reportado además que la Prxl dentro del núcleo aumenta la actividad de NF-κB a diferencia de lo que ocurre fuera de este, donde la Prxl suprime su activación mediante la eliminación de peróxido. En cuanto a la participación en los procesos inflamatorios la Prxl es secretada desde ciertas células luego de la estimulación por citoquinas tales como TGF-β y IL-1. Esta Prxl secretada es detectada en fluidos corporales incluyendo el plasma y es capaz de unirse a receptores tipo *tol-4* para modular procesos inflamatorios y de reparación tisular (Ishii, Warabi y Yanagawa, 2012). Por otro lado, la PrxII es la tercer proteína más abundante en eritrocitos (luego de la hemoglobina y la anhidrasa carbónica) (Manta *et al.*, 2009). Ha sido muy estudiada por su potencial uso en el diagnóstico de enfermedades y en terapia y mediante estudios de proteómica fue considerada como posible biomarcador para el

diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, diagnóstico de tumores vasculares, y cáncer cervical (Yan *et al.*, 2012).

Otros organismos como patógenos protozoos y helmintos expresan Prxs, que son capaces modular la respuestas inmune del hospedero parcialmente a través de receptores tipo *toll-4* lo que contribuye a su sobrevivencia y replicación (Ishii, Warabi y Yanagawa, 2012). Como ejemplo, el parásito helminto *Fasciola hepatica*, importante patógeno en humanos y principalmente de ovinos y bovinos que constituyen sus hospedadores naturales, secreta una 2-Cys Prx típica (*FhePrx*) tras la infección. En el trabajo de Donnelly *et al.*, 2004 se vio que es capaz de modular la respuesta inmune ya que es secretada al medio donde induce la activación alternativa de macrófagos que producen altos niveles de IL-10 y potencia la inducción de una respuesta de tipo Th2, capaz de inhibir respuestas celulares Th1. Esta proteína ha sido también estudiada y caracterizada según su función protectora frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el trabajo de Sekiya *et al.*, 2006 se caracterizó su actividad peroxidasa mediante un ensayo acoplado de esta enzima obtenida de forma recombinante con la tiorredoxina y tiorredoxina peroxidasa de *Escherichia coli*, donde se determinó que presenta un comportamiento cinético de saturación tipo Michaelis-Menten con una constante de segundo orden para la reacción de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el orden de 10<sup>5</sup>, uno o dos órdenes de magnitud menores a los reportados para otras peroxidasas (Cox *et al.*, 2009b; Manta *et al.*, 2009; Nagy *et al.*, 2011; Ogusucu *et al.*, 2007; Peskin *et al.*, 2007; Piñeyro *et al.*, 2011). Además se observó que esta Prx era capaz de sufrir inactivación por hiperoxidación a concentraciones por encima de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que su velocidad de inactivación era comparable con la de otras Prxs reportadas como sensibles como la Prx 2 y Prx 3 de gusanos platelmintos del género *Schistosoma* y comparable también con la Prx1 humana. Debido a que *F. hepatica* no presenta catalasa y exhibe muy poca actividad de glutatión peroxidasa (Barrett, 1980), esta Prx es un elemento importante frente a el estrés oxidativo al que están expuestos dentro de sus hospederos.

Dentro del orden Kinetoplastidae, la familia Trypanosomatidae adquiere una importancia particular debido a que incluye a protozoarios flagelados que son parásitos en humanos tales como *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. Estos son los agentes causantes de la enfermedad del sueño y la enfermedad de Chagas

respectivamente (Castro y Tomás, 2008). La enfermedad de Chagas es originaria de Sudamérica, Centroamérica y México, regiones donde se estima que hay cerca de 8 millones de afectados y 20.000 muertes anuales, aunque los flujos migratorios han permitido la expansión de la enfermedad a otros continentes donde antes era desconocida (Barcelona, 2016). La enfermedad del sueño a su vez amenaza a millones de personas en 36 países del África subsahariana donde muchas de las poblaciones afectadas viven en zonas remotas con poco acceso a servicios de salud adecuados, lo que obstaculiza la vigilancia y por lo tanto el diagnóstico y tratamiento de los casos (Organización Mundial de la Salud, 2016). Ambos parásitos carecen tanto de la enzima catalasa como de glutatión peroxidasas dependientes de selenio por lo que su sistema único de defensa antioxidante depende del ditiol tripanotión como se nombro en otro apartado, que es un tiol de bajo peso molecular compuesto por dos moléculas de glutatión unidas covalentemente a una molécula de espermidina. En este sistema antioxidante único dependiente de tripanotión, participan una batería de enzimas donde las Prxs y otras peroxidasas obtienen sus equivalentes de reducción de una cascada compuesta por triparredoxina (TXN), tripanotión (T(SH)<sub>2</sub>), y la tripanotión reductasa (TR) siendo el NADPH la principal fuente de electrones (Castro y Tomás, 2008; Piacenza *et al.*, 2013). En ambos parásitos se han encontrado y caracterizado distintas peroxidasas dependientes de tripanotión que se diferencian en su localización intracelular y en la especificidad de sustrato, estas son las glutatión peroxidasas no dependientes de selenio (nsGPx), triparredoxinas peroxidasas (TXNPrxs) y ascorbato peroxidasas (APXs), aunque las APXs no se han encontrado en *T. brucei* pero si en *T. cruzi* (Castro y Tomás, 2008). Las triparredoxinas peroxidasas pertenecen a la familia de las Prxs, y ambos organismos presentan tanto la forma citosólica como mitocondrial (Castro y Tomás, 2008). Ambas pertenecen a la subfamilia de 2-Cys Prxs típicas y actúan descomponiendo tanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como hidroperóxidos orgánicos y peroxinitrito. En estudios donde se produjo la sobreexpresión de estas enzimas en *T. cruzi* se observó que estos se volvían más resistentes a hidroperóxidos y peroxinitrito añadidos de manera exógena y eran más virulentas (Piacenza *et al.*, 2007; Piñeyro *et al.*, 2007). Ambas Prxs son investigadas activamente dado que por su diferencia con los sistemas antioxidantes de mamífero podrían ser una herramienta para desarrollar una cura o terapias más eficientes a las existentes hoy en día para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos

patógenos (Piñeyro *et al.*, 2011). En el caso de la enfermedad de Chagas los agentes quimioterapéuticos que están disponibles hoy en día se encuentran restringidos a las infecciones agudas dejando sin tratamiento a la infección crónica y además causan muchos otros efectos adversos no deseados (Organización Mundial de la Salud, 2016).

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivos principales

- Este trabajo de tesina tuvo dos objetivos principales.
  - El primer objetivo fue realizar la expresión, purificación y caracterización de las Prxs recombinantes PrxI y PrxII humanas (*hPrxI* y *hPrxII*), la Prx de *F. hepatica* (*FhePrx*), la Alkylhidroperoxidasa reductasa C (AhpC) de *M. tuberculosis* y la triparredoxina peroxidasa (TXNPx) de *T. brucei*.
  - El segundo objetivo fue el clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasa mitocondrial (MPX) y citosólica (CPX) de *T. cruzi* en el vector de expresión pET28c.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Expresión de las proteínas *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbTXNPx* clonadas en vectores de expresión pQE30, en células de *E. coli*/M15.
2. Purificación de las proteínas obtenidas de forma recombinante mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC).
3. Estudios de actividad enzimática de las proteínas recombinantes obtenidas.
4. Clonar los genes codificantes para las proteínas *TcMPX* y *TcCPX* en el vector de expresión pET28c, vector que le confiere a las proteínas expresadas una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal seguido de un sitio de corte para la proteasa trombina. El objetivo es poder purificar estas proteínas y luego realizar el corte con trombina de la cola de histidinas.

Para ello, nos propusimos clonar estos genes en el vector de clonado pGEM-T easy y luego subclonar los genes de manera direccional en el vector de expresión pET28c.

## 3. Materiales y Métodos

---

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Soluciones.

*Soluciones utilizadas para la purificación de ADN plasmídico mediante el protocolo de lisis alcalina:*

- Solución I: 50 mM de glucosa, 25 mM Tris-Cl pH= 8, 10 mM EDTA.
- Solución II: 0.2N NaOH, 1% SDS.
- Solución III: CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 3 M y 11,5 % ácido acético glacial.

La solución I y III se autoclavan y se almacenan a 4°C. La solución II se prepara en el momento de realizar la protocolo de lisis de ADN plasmídico.

#### 3.1.2 Soluciones amortiguadoras o *buffers*.

*Buffers utilizados para geles de agarosa:*

- Buffer TAE: Solución stock 50X: 242 g/L de Tris base, 5,7 % ácido acético glacial, 0,05 M EDTA. Solución de trabajo: 1X.
- Buffer de muestra 6X: 0,25 % de azul de bromofenol, 0,25% de xylene cyanol FF, 30% glicerol en agua destilada.

*Buffers utilizados para geles de poliacrilamida SDS-PAGE:*

- Buffer stock para gel concentrador: Tris-HCl 1 M pH 6,8
- Buffer stock para gel separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

- Buffer de corrida Tris-glicina-SDS 10% solución stock 10X: Tris 250 mM, Glicina 2,5 M, SDS 10%
- Buffer de muestra 4X con DTT: Tris 200 mM pH 6,8, DTT 400 mM, SDS 8 %, Bromofenol Blue 0,4 %, Glicerol 40 %).
- Buffer de muestra 4X sin DTT: Tris 200 mM pH 6,8, SDS 8 %, Bromofenol Blue 0,4 %, Glicerol 40 %).

#### *Buffers utilizados en la expresión y purificación de Prxs:*

- Buffer de inicio o lisis: Fosfato de Sodio 50 mM, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol
- Buffer de lavado: Fosfato de Sodio 50 mM, 500 mM NaCl, 100 mM Imidazol
- Buffer de elución: Fosfato de Sodio 50 mM, 500 mM NaCl, 400 mM Imidazol.  
En los tres buffers el pH fue de 7,6.
- Buffer Hepes: hepes 50 mM, NaCl 100 mM pH 7,4.
- Buffer de lisis B: 100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl y 8 M de urea, pH 8,0.

### **3.1.3 Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizadas.**

#### *XL1-Blue*

El genotipo de estas células es recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].

Es una cepa de *E. coli* que presenta mutaciones producidas de manera artificial que la hacen propicia para la propagación de plásmidos recombinantes (mutaciones endA1, recA1, hsdR) y permite la selección de transformantes por alpha complementación. ZΔM15 es una mutación en el gen LacZ que genera que se exprese la enzima beta-galactosidasa sin la subunidad alpha. El gen Tn10 confiere resistencia al antibiótico tetraciclina (Stratagene, 2004).

### *M15*

Su genotipo es F-,  $\Phi 80\Delta$ lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+ , KmR, y contienen al plásmido pREP4, el que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina y una expresión constitutiva del represor lac, lo que la hace propicia para su utilización como cepa de expresión. En estas cepas la expresión regulada por el promotor T5 del fago de E. coli.

### *DH5- $\alpha$*

Su genotipo es fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi 80'$  lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.

Al igual que las cepas XL1-blue descritas anteriormente es una cepa ampliamente utilizada para la propagación de plásmidos. La mutación endA1 inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plasmídico; la mutación hsdR17 elimina la endonucleasa de restricción del sistema de modificación-restricción *EcoKI*, y por lo tanto los fragmentos de DNA que poseen metilaciones en los sitios *EcoKI* no son degradados; y la mutación recA elimina la posibilidad de recombinación homóloga.

#### **3.1.4 Medios de cultivo.**

Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio nutritivo LB Luria-Bertani en medio sólido (con el agregado de agar al 15%) y en medio líquida. Este medio contiene triptona a una concentración de 10 g/L y extracto de levadura a una concentración de 5 g/L, componentes que proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de las bacterias. También contiene cloruro de sodio a una concentración de 10 g/L que mantiene un equilibrio osmótico apropiado.

#### **3.1.5 Vectores plasmídicos.**

##### *pGEM-T easy*® (Promega)

Es un vector de clonado, que en su conformación lineal posee timidinas 3' terminales en ambos extremos, característica que lo hace apropiado para la inserción y ligación de productos de PCR que en cuyos extremos posean adeninas terminales. En la secuencia nucleotídica del vector se encuentran los promotores T7 y SP6 para

ARN polimerasa que flanquean el sitio de policlonado. Esto hace posible su secuenciación utilizando los cebadores T7 y SP6. La región de policlonado además presenta una región que codifica para el péptido  $\alpha$  de la enzima beta-galactosidasa. Si un gen de interés se logra insertar en dicha región se puede identificar a los transformantes a través del sistema de  $\alpha$ -complementación sobre placas de Petri con medio de cultivo conteniendo ampicilina/IPTG/X-Gal (Manual Promega, 2015).

#### *pQE-30 (QIAGEN)*

Es un vector de expresión, que permite obtener proteínas recombinantes fusionadas a una cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal (proteína de fusión) permitiendo la purificación mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC) conteniendo una resina de Ni-NTA (ácido níquel-nitrilotriacético). En su secuencia el vector presenta el promotor del fago T5 que es reconocido por la RNA polimerasa de *E. coli* y dos operadores lac O lo que asegura la represión génica. También posee un sitio de unión al ribosoma para generar una alta tasa de traducción y un gen que le confiere resistencia a ampicilina (QIAGEN, 2003).

#### *pET-28C (Novagen)*

Pertenece al sistema de vectores de expresión pET de Novagen, el que permite una expresión de proteínas recombinantes bajo un promotor fuerte T7, donde la expresión proteica es inducida utilizando una cepa que tenga en su material genético al gen codificante de la ARN polimerasa T7 proveniente del fago  $\lambda$ .

El vector posee un gen de resistencia a kanamicina, y le confiere a la proteína recombinante expresada, en el extremo N-terminal, una cola de seis residuos de histidina más un sitio de clivaje para la peptidasa trombina lo que permite que luego de la purificación por cromatografía de afinidad se pueda eliminar la secuencia de histidinas de la cadena polipeptídica. Además, posee una etiqueta T7-Tag N-terminal, luego del sitio de corte para trombina, útil para la detección de la proteína por *Western-Blot*. De manera opcional presenta una secuencia para etiqueta de seis histidinas para la región C-terminal (Novagen, 2006).

Tanto el vector pQE-30 (QIAGEN) como el vector pET-28c (Novagen) permiten la inducción de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG, isopropil- $\beta$ -

D-tiogalactopiranosido, un inductor del operón *lac*, ya que es capaz de unirse al represor *lacI* e inactivarlo. Es un análogo estructural de la lactosa pero la ventaja que tiene sobre esta es que no puede ser metabolizado por la bacteria, lo que permite que su concentración en el medio de cultivo permanezca constante.

### 3.1.6 Enzimas ADN polimerasas.

Se utilizaron para la amplificación de material genético la ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad Phusion® (Biolabs), y la enzima Taq polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus*.

### 3.1.7 Enzimas de restricción.

Se utilizaron las enzimas *EcoRI* 10 U/μL de Roche, *NdeI* de Invitrogen 5 U/μL, y *XhoI* 10 U/ μL de Roche.

### 3.1.8 Enzimas ADN ligasas.

Las enzimas utilizadas fueron: T4 ADN ligasa, procedente del bacteriófago T4, de Promega (3 U/μL) y de ThermoFisher Scientific (5 U/μL).

### 3.1.9 Reactivos químicos y otros materiales.

Se partieron de construcciones plasmídicas realizadas previamente en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Las diferentes construcciones utilizadas fueron las siguientes: pQE-30-*hPrxI*, pQE-30-*hPrxII*, pQE-30-*FhePrx*, pQE-30-*MtAhpC*, pQE-30-*TbTXNPx*. Se utilizaron proteínas recombinantes purificadas en dicha Unidad: las triparredoxinas peroxidases mitocondrial (*TcMPX*), citosólica (*TcCPX*), el mutante de la *TcCPX* en la cisteína peroxidática, *TcCPXC52S* y la triparredoxina 1 (*TcTXN1*) de *Trypanosoma cruzi*.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Métodos relacionados a la preparación de cepas de *E. coli*.

#### 3.2.1.1 Preparación de células electrocompetentes.

Para introducir ADN plasmídico en células bacterianas se requiere tener una preparación de células competentes, es decir, capaces de incorporar plásmidos. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento. A partir de stocks de cepas bacterianas *E. coli* DH5- $\alpha$  o XL1-blue se inocularon 3 mL de LB (en el caso de las XL1-blue conteniendo tetraciclina a una concentración final de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se cultivaron durante toda la noche en agitación constante a 37°C. Luego se transfirieron los 3 mL a 200 mL de LB sin antibióticos y se incubaron a 37°C durante el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $\text{D.O}_{600}$ ) de 0,6. Luego los 200 mL de cultivo se dividieron en tubos de 50 mL y se centrifugaron a 4000 x g a 4 °C durante 20 minutos para obtener el pellet celular, descartando el medio de cultivo. El resto del procedimiento para la obtención de células competentes se realizó en hielo y a 4 °C con el fin de mantener la cadena de frío. Las células obtenidas se resuspendieron en 45 mL de agua MiliQ estéril y fría y se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos. Luego las células se resuspendieron en dos tubos lavándolas con 20 mL de agua MiliQ estéril y fría y se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos. Estas últimas células se resuspendieron en un tubo agregándoles 4 mL de glicerol 10% estéril y se centrifugaron a 4000 x g durante 15 minutos. Por último, las bacterias se resuspendieron en 600  $\mu\text{L}$  de glicerol 10% estéril, se dividieron en alícuotas de a 40  $\mu\text{L}$  y se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

#### 3.2.1.2 Transformación de células electrocompetentes.

Para introducir ADN plasmídico dentro de bacterias competentes en cultivo se utilizó la técnica de electroporación. Consiste en la aplicación de pulsos de corriente eléctrica que generan la apertura de poros transitorios por donde se da la entrada del ADN exógeno.

Las bacterias *E. coli* competentes mantenidas a -80 °C se dejaron descongelar manteniéndolas en hielo. Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de plásmido de concentración 10-40  $\text{ng}/\mu\text{L}$  o 5

$\mu\text{L}$  de un producto de ligación y se mezclaron con las células competentes. Se introdujo la mezcla en una cubeta de electroporación de 1 mm fría y estéril y se le aplicó un pulso eléctrico unipolar con los siguientes parámetros: 500 V y 8 milisegundos. Inmediatamente se le agregó medio LB y se incubaron las células 30-45 minutos a 37 °C. Por último, se transfirieron a placas de Petri conteniendo medio semisólido LB agar con antibiótico, entre 100 y 300  $\mu\text{L}$  del cultivo. Para el caso de la cepa DH5- $\alpha$  se utilizó el antibiótico kanamicina para la selección del vector incorporado a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para la cepa XL1-blue se le agregó al medio semisólido ampicilina a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , IPTG y X-Gal con el fin de seleccionar las colonias que incorporaron el vector con el inserto de interés. Además se transformaron bacterias M15 electrocompetentes con los plásmidos pQE-30 conteniendo como inserto al gen de la proteína *MtAhpC* y *TbTXNPx*, las que se crecieron en medio semisólido y líquido con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y kanamicina 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de concentración final.

### 3.2.2 Métodos relacionados al análisis de ADN.

#### 3.2.2.1 Purificación de ADN plasmídico a partir de bacterias.

##### *Purificación mediante el protocolo de lisis alcalina.*

Se partió de 3 mL de un cultivo de bacterias incubado durante toda la noche con el antibiótico apropiado para la selección del plásmido y se lo centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos. Luego de remover el sobrenadante se resuspendió el precipitado celular en 100  $\mu\text{L}$  de la solución I agregándole la enzima RNAsa a una concentración final de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Para lisis las células se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de la solución II y luego de 5 min. se les agregó 150  $\mu\text{L}$  de la solución III para neutralizar el pH. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. y se transfirió todo el sobrenadante a un tubo nuevo y se le agregó 800  $\mu\text{L}$  de etanol 100% para precipitar el ADN mezclando por inversión. Nuevamente se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y el precipitado (ADN plasmídico) se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 75%. Luego de lavar se centrifugó brevemente y el ADN se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de DNAsas.

*Purificación mediante el Kit de invitrogen™ PureLink® Quick Plasmid miniprep.*

Se siguió el protocolo administrado por el kit comercial. Este permite aislar a partir de un cultivo bacteriano, ADN plasmídico con baja cantidad de contaminantes. Luego de ser precipitado, el ADN queda retenido en una resina, donde se lava y se eluye con agua destilada libre de DNAsas.

### 3.2.2.2 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

Luego de digerir ADN plasmídico con enzimas de restricción, los fragmentos de ADN de interés separados mediante geles de agarosa fueron purificados utilizando el kit comercial Illustra™ GFX PCR DNA y Gel By Purification de GE Healthcare. Se siguió exactamente el protocolo proporcionado para purificar ADN desde geles de agarosa hechos con TAE o TBE. Básicamente se cortó la región del gel donde se encuentra el fragmento de interés y se calentó a 60 °C en presencia de una solución que contiene un agente caotrópico de guanidina, que separa el ADN de la agarosa. Luego de disolverse el gel, se retuvo el ADN en una membrana de silicio donde se lavó con etanol y se eluyó con 30 o 40 µL agua.

### 3.2.2.3 Cuantificación de ADN.

La concentración de ADN en solución fue determinada por espectrofotometría midiendo la absorción de luz a 260 nm debido a que a esta longitud de onda las bases púricas y pirimidínicas del ADN presentan un máximo de absorción. De este modo, se consideró que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena. La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la lectura de absorbancias a 260 y 280 nm donde la relación DO 260/280 debe ser entre 1.8 y 2 (Zavala Castro, 2005).

### 3.2.2.4 Electroforesis en gel de Agarosa.

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica capaz de resolver fragmentos de ADN donde se localizan con el agregado de un agente intercalante de ADN y su posterior visualización bajo luz ultravioleta. Bajo la acción de un campo eléctrico, las moléculas migran a una velocidad que es inversamente proporcional al

$\log_{10}$  de su tamaño en pares de bases. La velocidad de migración también se encuentra afectada por la concentración de la agarosa en el gel, por la conformación de ADN, el voltaje aplicado, la temperatura y la composición del buffer de corrida.

Se utilizaron en todos los casos geles de agarosa al 1 % ya sea para la visualización de ácidos nucleicos como para la purificación de estos a partir del gel. La agarosa se fundió en buffer TAE 1x calentándola en un microondas hasta que se disolviera completamente. Luego se dejó enfriar un instante a temperatura ambiente y se adicionó Bromuro de Etidio a una concentración final de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o el intercalante comercial GoodView®. Luego de gelificada la agarosa las muestras se cargaron con buffer de muestra a una concentración final 1X. Para la corrida electroforética se aplico un voltaje de 1 a 5 V/cm y se utilizó el buffer TAE.

#### 3.2.2.5 Amplificación por PCR de los genes codificantes para las proteínas *TcMPX* y *TcCPX*.

Se amplificaron los genes de *TcCPX* y *TcMPX* utilizando como molde ADN genómico de la cepa Dm28c de *T. cruzi* y de plásmidos pQE-30 conteniendo como inserto uno u otro de los genes nombrados anteriormente. Se utilizó para esto la ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad Phusion® (Biolabs) a una concentración final 0.02 U/ $\mu\text{L}$ . El volumen de reacción fue de 25  $\mu\text{L}$  el que contenía 0,5  $\mu\text{M}$  final de cada cebador específico para cada gen. Los cebadores “*forward*” agregan un sitio de restricción *NdeI* y los cebadores “*reverse*” agregan un sitio de restricción para la enzima *XhoI*. Los cuatro deoxinucleótidos fueron agregados a una concentración final de 200  $\mu\text{M}$  cada uno.

Las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción fueron: para la amplificación del gen *TcCPX*: 98°C 30 seg. 1 ciclo, 98°C 10 seg, 60° 30 seg. por 25 ciclos y una extensión a 72 °C por 10 min. Para la amplificación del gen *TcMPX* se utilizaron las mismas temperaturas y tiempos que para *TcCPX* excepto la temperatura de “*annealing*” que fue de 55°C.

### 3.2.2.6 Agregado de deoxinucleótidos de adenina (dATP) a los productos de PCR generados por la ADN polimerasa Phusion™.

A los productos de PCR obtenidos a partir de la DNA polimerasa Phusion™ (los genes codificantes para las proteínas *TcCPX* y *TcMPX*) se les agregó mediante la enzima Taq polimerasa de *Thermus aquaticus* los deoxinucleótidos de adenina en los extremos 5' y 3' para después poder insertar estos genes en el vector pGEM-T easy (Promega). La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, utilizando como ADN molde los productos de PCR obtenidos a partir de ADN plasmídico de los vectores pQE30-*TcMPX* y pQE30-*TcCPX*, 1 U de Taq polimerasa, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200  $\mu$ M de dATPs (Invitrogen) concentración final y buffer 1X suministrado por la empresa que comercializa la Taq polimerasa. La reacción se incubó a 70°C durante 25 minutos.

### 3.2.2.7 “Colony” PCR.

Esta técnica fue realizada luego de transformar las bacterias con ADN plasmídico producto de una ligación o de un protocolo de lisis. Se utilizó para corroborar la presencia del gen de interés en el plásmido, esto es, para encontrar clones positivos.

En todos los casos la reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la ADN polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*, en un volumen final de 25  $\mu$ L, los cebadores a una concentración final de 4  $\mu$ M o 3  $\mu$ M, los dNTPs a una concentración final de 160  $\mu$ M cada uno, MgCl<sub>2</sub> 4mM concentración final, y buffer PCR 1X (Invitrogen). En esta técnica el ADN molde se introduce tocando con una punta para pipeta de 10 o 20  $\mu$ L, una colonia transformada con el plásmido, crecida una placa de Petri con LB agar, e introduciendo luego la punta en el tubo de reacción de la PCR. De esta forma, durante el ciclo de PCR las bacterias se lisan por el calor liberando el ADN para poder ser amplificado.

Las condiciones fueron: 94°C 5 min., 94°C 15 seg., 55°C 30 seg., y 72°C por 5 min. durante 25 ciclos. Y por último 5 min a 72°C.

### 3.2.2.8 Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasa *TcCPX* y *TdMPX* en el vector de expresión pET28c.

Los genes amplificados por la enzima Phusion<sup>®</sup> fueron clonados en primer lugar en el vector de clonado pGEM-T easy y a partir de este fueron subclonados de forma direccional en el vector de expresión pET28c.

#### *Clonado en el vector pGEM-T easy:*

Se realizó una reacción de ligación en un volumen final de 10  $\mu$ L, utilizando 3U de la enzima T4 ADN ligasa procedente del bacteriófago T4 (Promega), una relación molar vector: inserto de 1:3, en buffer 1X suministrado por Promega. La reacción se dejó transcurrir durante 1h a temperatura ambiente.

#### *Subclonado en el vector pET28c:*

Los vectores resultantes de la ligación de los genes de *TcCPX* y *TdMPX* con pGEM-T easy se utilizaron para transformar las cepas bacterianas XL1-blue electrocompetentes. A partir de varias colonias blancas de XL1-blue se realizó el protocolo de lisis alcalina con el fin de purificar el ADN plasmídico. Este se digirió con la endonucleasa de restricción *EcoRI* (Roche) que corta hacia ambos extremos del inserto para luego visualizarlo en un gel de agarosa al 1%. A partir de los clones con el inserto de interés se realizó una purificación del ADN plasmídico. Se realizó una doble digestión con las endonucleasas de restricción *NdeI* (Invitrogen) y *XhoI* (Roche), de los plásmidos pGEM-T-*TcCPX* y pGEM-T-*TdMPX* aislados y del plásmido pET28c. La digestión de ambos plásmidos se llevo a cabo en varias condiciones: utilizando de 1,5 a 10 U de enzima por  $\mu$ g de ADN, en un volumen de reacción de 20 $\mu$ L – 30  $\mu$ L, y dejándola transcurrir por 2 o 3 horas a 37 °C.

Luego el volumen total de la digestión fue cargado en un gel de agarosa al 1% donde tanto la banda correspondiente al plásmido pET28c en su conformación lineal como la banda correspondiente a los genes de *TcCPX* y *TdMPX*, fueron visualizadas y purificadas a partir del gel mediante el kit comercial Illustra<sup>™</sup> de GE Healthcare.

Una vez obtenidos los genes y el plásmido purificados en solución se llevo a cabo una ligación, que al igual que la digestión doble, se probaron varias condiciones. El volumen final de reacción fue de 15, 20 o 25  $\mu$ L, con una relación vector: inserto de

1:3, 1:2 o 1:1. Se utilizaron dos enzimas ligasa: la T4 ADN ligasa de ThermoFisher Scientific 5 U por reacción, y la ADN T4 de Promega 3 U por reacción. Para la primera enzima se dejó incubando el tubo de reacción 1 hora a temperatura ambiente, y para la segunda enzima 1 hora a temperatura ambiente o 16 horas a 4 °C.

### 3.2.2.9 Defosforilación del vector de expresión pET28c.

Los grupos 5'-fosfatos de ambos extremos del vector pET28c en conformación lineal fueron removidos en presencia de la enzima fosfatasa antártica (Biolabs), impidiendo de esta manera la recircularización del vector que puede ocurrir tras una ligación. El vector digerido y purificado a partir del gel de agarosa fue tratado con 5 unidades de fosfatasa antártica en un buffer suministrado por la empresa que comercializa la enzima e incubado por 15 minutos a 37 °C. La enzima fue inactivada incubándola 5 min. a 65 °C y se prosiguió con ligación.

## 3.2.3 Métodos relacionados a la expresión y análisis de proteínas.

### 3.2.3.1 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes.

Se inocularon 3 mL de LB a partir de una colonia aislada de distintas preparaciones de bacterias M15 transformadas con los siguientes vectores: pQE-30-*hPrxI*, pQE-30-*hPrxII*, pQE-30-*FhePrx*, pQE-30-*MtAhpC*, pQE-30-*TbTXNPx* en presencia de ampicilina y kanamicina a una concentración final de 100 µg/µL y 25 µg/µL respectivamente dejando en incubación toda la noche a 37°C y en agitación a 220 rpm. Este pre-cultivo se transfirió a 50 mL de LB estéril sin antibióticos (ya que se considera que la selección se hizo en el cultivo anterior) y se incubó a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6 o más. Este segundo crecimiento desde una alícuota del cultivo saturado asegura que todos los cultivos hayan crecido hasta una densidad celular similar antes de la inducción. Del cultivo con una DO<sub>600</sub> de 0.6 se sacó una alícuota de 1 mL (**control sin inducir**) que se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. para bajar las células, que se resuspendieron en 50 µL de buffer de muestra 1X con DTT para SDS-PAGE. La expresión de las proteínas recombinantes se realizó por 4 horas a 37°C y se indujo añadiendo IPTG a una concentración final de 0.5 mM para las proteínas *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC*, y *TbTXNPx*. Además, para las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* se usó una concentración 1 mM de IPTG, y una incubación a 25

°C durante toda la noche. En todos los casos se mantuvo una agitación constante de 220 rpm. Luego de la inducción se tomó otra alícuota de 1 mL (**control inducido**) que se centrifugó y se resuspendió 100 µL de buffer de muestra 1X con DTT para SDS-PAGE. El cultivo inducido se centrifugó a 4000 x g por 20 min. a 4 °C; el pellet de células obtenido se resuspendió en 5 mL de buffer de inicio ( Fosfato de sodio 50 mM, 20 mM de imidazol, 300 mM NaCl pH=7.6) y se lo incubó con lisozima 1 mg/mL durante 30 min. manteniéndolo en hielo. Las bacterias se lisaron mediante sonicación con 6 pulsos de 10s de duración alternándolos con 10s de pausa en hielo. El lisado obtenido se centrifugó a 10000 x g a 4 °C por 20-30 min. donde se obtuvo por un lado el sobrenadante, que corresponde a la **fracción soluble** de proteínas y por otro lado el precipitado que se resuspendió en 5 mL de buffer de inicio que corresponde a la **fracción insoluble**. A partir de las 2 muestras obtenidas por este procedimiento fracción soluble y fracción insoluble se tomaron alícuotas de 20 µL y le agregaron 6 µL de buffer de muestra 4X con DTT para electroforesis SDS-PAGE. Las cuatro muestras obtenidas control sin inducir, control inducido, fracción soluble y fracción insoluble fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 %.

### 3.2.3.2 “*Screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes.

Este protocolo se llevó a cabo únicamente para las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Es una prueba para corroborar la expresión de proteínas recombinantes a partir de cultivos pequeños donde las bacterias son resuspendidas en un buffer de lisis desnaturizante conteniendo urea a una concentración 8 M. Las condiciones desnaturizantes permiten obtener a la mayoría de las proteínas de fusión de forma soluble independientemente de su localización dentro de la célula (QIAgen, 2008).

Se inocularon 1,5 mL de LB conteniendo ampicilina y kanamicina a una concentración final de 100 µg/µL y 25 µg/µL respectivamente dejando en incubación toda la noche a 37°C y en agitación a 220 rpm. A partir de 500 µL de este cultivo se inocularon 10 mL de LB sin antibióticos y se dejó incubando hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 0.6 o más. Luego de alcanzada la DO se tomó una alícuota como control **sin inducir**, se centrifugó y se resuspendió en buffer de muestra 1X con DTT para electroforesis SDS-PAGE 1X. Se indujo la expresión con el agregado de IPTG 1 mM y se incubó durante 4 horas a 25, 30, y 37 °C con agitación constante a 220 rpm. El

cultivo se centrifugó y el pellet celular se resuspendió en 400  $\mu$ L de buffer de lisis B (100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl y 8 M de urea, pH=8.0) y el lisado obtenido se centrifugó por 20 min. a 15000 x g. conservando únicamente el sobrenadante (**fracción inducida**). Por último se visualizaron las muestras control sin inducir y fracción inducida mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%.

Un segundo procedimiento se llevó a cabo luego de obtener el sobrenadante de la inducción a 25°C durante toda la noche y fue el ensayo de “captura” de la proteína recombinante para poder obtener, si es que se expresa, a la proteína concentrada con respecto al total de proteínas solubilizadas obtenidas en la fracción inducida. 350  $\mu$ L del sobrenadante se incubaron con 30  $\mu$ L de resina NTA-níquel limpia durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación en *batch*. Se centrifugó por 3 min. a 5000 xg, se descartó el sobrenadante, y la resina obtenida en el fondo del tubo se lavó cuatro veces con 1 mL de Buffer de inicio para purificación centrifugando a 8000 xg por 2 min. entre cada lavado, y por último se descarto el sobrenadante. Para eluir se agregaron 30  $\mu$ L de buffer de muestra de electroforesis 1X y se calentó a 90 °C por 5 min. El sobrenadante de este último paso corresponde a la fracción de la proteína que se adhirió a la resina a la que se la nombró como **fracción concentrada**. Las muestras obtenidas control sin inducir, fracción inducida y fracción concentrada se visualizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%.

### 3.2.3.3 Expresión y purificación de las Prx *FhePrx* y *hPrxI* y *hPrxII*.

#### *Cultivo de las cepas M15 y expresión de las proteínas*

Se inoculó un stock de bacterias transformadas en 20 mL de LB en presencia de ampicilina y kanamicina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ $\mu$ L y 50  $\mu$ g/ $\mu$ L respectivamente. El cultivo se incubó toda la noche en agitación a 220 rpm y 37 °C. 10 mL de este cultivo se transfirieron a 500 mL de LB estéril sin antibióticos y se mantuvo en agitación a 220 rpm y 37°C hasta alcanzar una DO 600 de 0.6. En ese punto se tomó una alícuota de 1 mL (**control sin inducir**) la que se centrifugó y se resuspendió en 50  $\mu$ L de buffer de muestra con DTT 1X para SDS-PAGE. Se indujo la expresión por incubación con IPTG 0.5 mM 4 horas a 37 °C. Previo a recolectar las células se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo inducido (**control inducido**) la que se centrifugó y se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer de muestra 1X con DTT para SDS-

PAGE. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 4000 x g durante 30 min. descartando el sobrenadante (medio de cultivo) y fueron resuspendidas en 5 mL de buffer de lisis o inicio agregándole el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM y lisozima a una concentración final de 1 mg/mL. Se mantuvieron en hielo por 30 min. y luego fueron lisadas por sonicación en hielo por un minuto (6 pulsos de 10s con intervalos de 10s ). Se centrifugó el lisado a 15000 x g por 25 min. a 4°C y se obtuvo la **fracción soluble** con la proteína de interés y la **fracción insoluble** para luego ser corroborada la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 %.

#### *Purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad en columnas de Níquel.*

La fracción soluble conteniendo un lisado bacteriano con las proteínas recombinantes de interés, fue filtrada con filtros de 0,22 µm para eliminar restos celulares insolubles que puedan entorpecer la purificación.

Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad, ya que en su extremo N-terminal presentan una secuencia de poli-histidinas otorgándole a las proteínas una afinidad específica a iones de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). Para esto se utilizaron columnas de 5 mL HisTrap™ HP de GE Healthcare aplicando un flujo de 4 mL/min. Estas contienen partículas de agarosa con un alto grado de entrecruzamiento, las que son cargadas con iones de níquel para que se de la unión con las proteínas de interés.

Debido a que se utilizó la misma columna para purificar tres proteínas distintas, en primer lugar se despegó el  $\text{Ni}^{2+}$  inmovilizado con 5 volúmenes de EDTA 0,05M, y se lavó con 10 volúmenes de agua MiliQ filtrada. Las columnas se volvieron a cargar con  $\text{Ni}^{2+}$  utilizando una solución de  $\text{NiSO}_4$  0.1 M y luego se lavaron con 10 volúmenes de agua MiliQ filtrada.

Se realizó una corrida en blanco con 5 volúmenes de buffer fosfato para purificación que contienen diferentes concentraciones de IMIDAZOL: 20 mM, 100 mM y 400 mM respectivamente; y se equilibró la columna con 10 volúmenes de buffer de inicio con IMIDAZOL 20 mM para luego recircular la fracción soluble filtrada por una hora.

Finalmente se realizaron lavados con 5 volúmenes de buffer de inicio (20 mM de imidazol), luego 10 volúmenes de buffer de lavado (100 mM de imidazol) y finalmente se eluyó la proteína con buffer de elución (400 mM de Imidazol).

La visualización e identificación de las fracciones en las que estaba presente la proteína recombinante se hizo mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%. En esta se cargaron 20  $\mu$ L de fracción no unida (la fracción que se obtiene luego de recircular el sobrenadante), el mismo volumen de una muestra correspondiente al primer lavado, tres muestras del segundo lavado, y todos los eluidos obtenidos con el fin de analizar la pureza de estos.

Una vez comprobada la presencia de la proteína de interés en los eluidos, estos se juntaron en un mismo tubo y se dializaron con el fin de quitar el imidazol, utilizando Vivaspin® 20 mL con un cut-off de 10 KDa contra buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl a pH= 7.4.

#### 3.2.3.4 Cuantificación de proteínas en solución.

Se determinó la concentración proteica de las proteínas purificadas una vez concentradas y desaladas, por el ensayo colorimétrico de Bradford. Este se basa en la formación de un complejo entre el colorante, Brilliant Blue G, y las proteínas en solución. El complejo causa un corrimiento en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la cantidad proteína presente. Como estándar, se realizó una curva de calibración con diluciones de BSA (proteína albúmina de suero bovina) a diferentes concentraciones.

#### 3.2.3.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 12% (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas en solución se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS en un sistema de buffer discontinuo. El SDS es un detergente aniónico que actúa como agente desnaturante de las proteínas. En la concentración adecuada, se une a la mayoría de las proteínas en una relación peso/peso constante, por lo que la carga aportada por este es proporcional a la masa de la proteína. De esta forma todos los complejos SDS-proteína tienen la misma densidad de carga haciendo que durante el proceso la separación se dé únicamente por la masa molecular proteica. Por otro lado, los geles discontinuos aumentan la

resolución de la electroforesis utilizando una primera parte concentradora (gel concentrador) y una segunda parte separadora (gel separador). El gel concentrador contiene iones cloruro que migran más rápido a través del gel que la muestra de proteínas, mientras que el buffer de corrida contiene iones glicina que migran más lentamente. Las moléculas de proteína son atrapadas en una banda delgada entre estos iones por lo que entran todas juntas al gel separador. Cuando las proteínas entran a este gel que contiene un tamaño de poro menor, un mayor pH y una alta concentración salina, la glicina se ioniza y el gradiente de pH se disipa y las proteínas son entonces separadas por su tamaño. Para la preparación de los geles concentrador y separador se utilizaron los reactivos en las proporciones indicadas en la siguiente tabla:

	Gel separador	Gel concentrador
<b>Acrilamida-bisacrilamida</b>	12%	5%
<b>Buffer Tris-HCl</b>	380 mM Tris pH 8,8	127 mM Tris pH 6,8
<b>SDS</b>	0,10 %	1%
<b>Persulfato amónico</b>	0,10 %	1%
<b>TEMED</b>	0,04 %	0,10 %

La preparación de las muestras para cargar en el gel se realizó con el buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE con DTT o sin DTT a una concentración final 1X. Luego de preparadas se calentaron a 95 °C por 5 min. para desnaturalizar las proteínas y se centrifugaron brevemente.

La separación de proteínas se realizó aplicando un amperaje de 25 mA por gel hasta que el frente de corrida alcanzara el final del gel. Se utilizó un buffer de corrida Tris-Glicina-SDS 10% 1X, y las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomassie incubando el gel en agitación suave entre 20 y 30 minutos, con posteriores lavados con solución decolorante ( 45% de Etanol 95% y 10 % de ácido acético glacial). Se utilizaron como marcadores de peso molecular PageRuler™ Unstained y PageRuler™ Plus Prestained de ThermoFisher Scientific.

### 3.2.3.6 Digestión proteolítica de la His- *TcTXN1* con trombina.

La remoción de la cola de seis residuos de histidina de la región N-terminal de la *TcTXN1* se realizó mediante la incubación de esta con 3 U de proteasa por miligramo de proteína durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con el agregado de 1  $\mu$ M del inhibidor de proteasas PMSF y se la concentró y dializó contra buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl a pH= 7.4, utilizando Vivaspin® 500  $\mu$ L con un cut-off de 10 KDa.

### 3.2.3.7 Reducción de *TcTXN1* con DTT.

Se incubó a *TcTXN1* 150  $\mu$ M con 3 mM de DTT (relación *TcTXN* 1: DTT 1:20), una hora a temperatura ambiente. Luego se desaló la solución proteica con el fin de remover el DDT mediante una columna de desalado, Vivaspin 500 de GE Healthcare.

### 3.2.3.8 Ensayos de actividad consumo de $H_2O_2$ *in vitro* por parte de las proteínas recombinantes.

El consumo de  $H_2O_2$  por parte de las Prx *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, expresadas y purificadas, y de las Prxs *TcCPX* y *TdMPX* y el mutante *TcCPXC52S* de *CPX*<sup>1</sup>, fue determinado mediante el método colorimétrico del ferritocinato (Harder *et al.*, 2006; Sun, Liu y Li, 2010; Yu *et al.*, 2011). Este se basa en que el  $H_2O_2$  presente en una muestra es capaz de oxidar al Fe (II) generando Fe (III), el que forma un complejo con iones tiocianato ( $SCN^-$ ) capaz de absorber luz a 490 nm. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos.

Se realizaron tres tipos de ensayos:

1. Dependencia del consumo de  $H_2O_2$  de la concentración de Prx,
2. Consumo de  $H_2O_2$  de las Prxs a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ ,
3. Dependencia del consumo de  $H_2O_2$  del reductor utilizado para reducir las Prx.

---

<sup>1</sup> Todas las proteínas analizadas presentan en su extremo N-terminal una cola de 6 histidinas ya que fueron obtenidas de forma heteróloga a partir del vector pQE-30 (QIAGEN).

### 1. Dependencia del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la concentración de Prx:

En un primer ensayo, la mezcla de reacción conteniendo buffer Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 y a la Prx a concentraciones de 1, 5, o 10  $\mu$ M la que fue incubada con 2,5 mM de DTT o sin DTT durante 30 min. a temperatura ambiente. Luego de la incubación se añadieron 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final) para iniciar la reacción, la que se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 15 min. y se detuvo mediante el agregado de 10  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (vol/vol). Por último se agregaron 10  $\mu$ L de la sal sulfato de amonio ferroso (Fe(II)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 10 mM disuelta en ácido sulfúrico 2,5 M, y 20  $\mu$ L de tiocianato de potasio KSCN 2,5 M. La absorbancia de la mezcla fue medida a 490 nm. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final fue determinada espectrofotométricamente usando preparaciones de concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como estándares. La concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinó por espectofotometría, midiendo la absorbancia a 240 nm, con un coeficiente de extinción molar de 43.6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 2. Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las Prxs a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

De forma similar se determinó el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variando la concentración inicial de este añadida a la mezcla de reacción. Para esto se incubó a la Prx a una concentración de 5  $\mu$ M en buffer Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4, tratada con 2,5 mM de DTT por 30 min. con 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se prosiguió con el procedimiento de la misma forma en la que se explico anteriormente.

### 3. Dependencia del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del reductor utilizado para reducir las Prx:

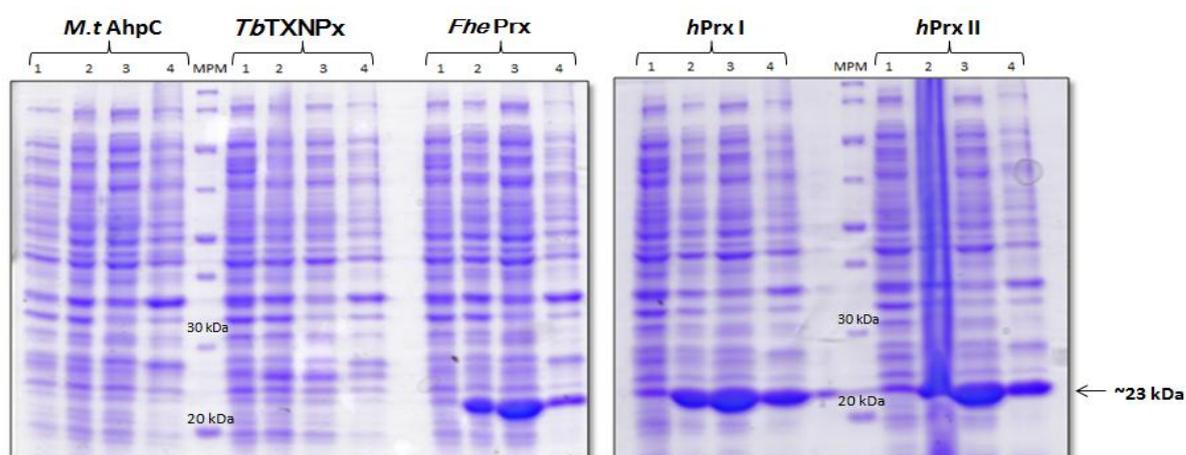
Se realizó un tercer ensayo en el que se utilizó una concentración fija de proteína de 5  $\mu$ M en buffer Hepes 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 y se midió el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50  $\mu$ M por parte de estas en tres condiciones: incubando a la proteína por 30 min. a temperatura ambiente con DTT (a una concentración final 2,5 mM), sin DTT, o con la TcTXN1 a una concentración final de 12  $\mu$ M en su forma reducida.

## 4. Resultados

### 4.1 Expresión de las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbTXNPx*.

#### 4.1.1 Análisis de la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes.

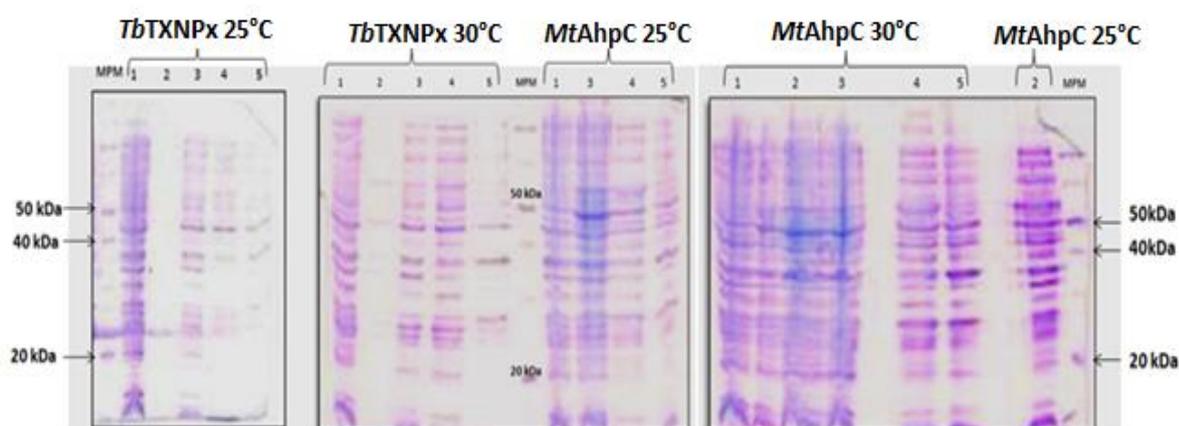
Para el análisis de la expresión y la solubilidad de las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbTXNPx* se partió de un stock de células de *E. coli* M15 transformadas con el plásmido de expresión pQE-30 conteniendo cada uno el gen codificante para la proteína de interés. Se siguió el protocolo detallado en materiales y métodos, donde la inducción se realizó adicionando IPTG al medio a una concentración final de 0,5 mM y una posterior incubación por 4 hs. a 37 °C. Con las muestras obtenidas **fracción soluble e insoluble** y los **controles sin inducir e inducido**, se realizó un gel de poliacrilamida-SDS 12 % cuyo resultado se observa en la **figura 7**.



**Figura 7.** Análisis de la expresión y la solubilidad para las proteínas *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbTXNPx*, SDS-PAGE al 12%. Se realizó la inducción con 0,5 mM de IPTG 4hs. a 37 °C. **Carriles 1:** control sin inducir, **2:** control inducido, **3:** fracción soluble, **4:** fracción insoluble. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

Como resultado de este ensayo se observa que hubo expresión de las proteínas *hPrxI* y *hPrxII* y *FhePrx*, de peso molecular esperado para el monómero de

las Prxs más la cola de seis residuos de histidina<sup>2</sup>, encontrándose las tres, mayormente expresadas de forma soluble (carriles 3, **figura 7**). En cambio, para las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* no se observó expresión en las condiciones dadas. Debido a esto se repitió el procedimiento anterior para estas dos proteínas<sup>3</sup>, pero esta vez disminuyendo la temperatura de expresión a 25 o a 30 °C. La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es de 37 °C, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas. Al utilizar temperaturas más bajas que la de crecimiento óptimo, se pueden reducir las respuestas metabólicas indeseadas para la síntesis de proteínas extrañas para el hospedero y, de esta manera, mejorar el rendimiento y/o la solubilidad de la proteína de interés. La concentración del inductor IPTG y el tiempo de expresión fue el mismo que para el ensayo anterior. Los resultados se muestran en la **figura 8**.

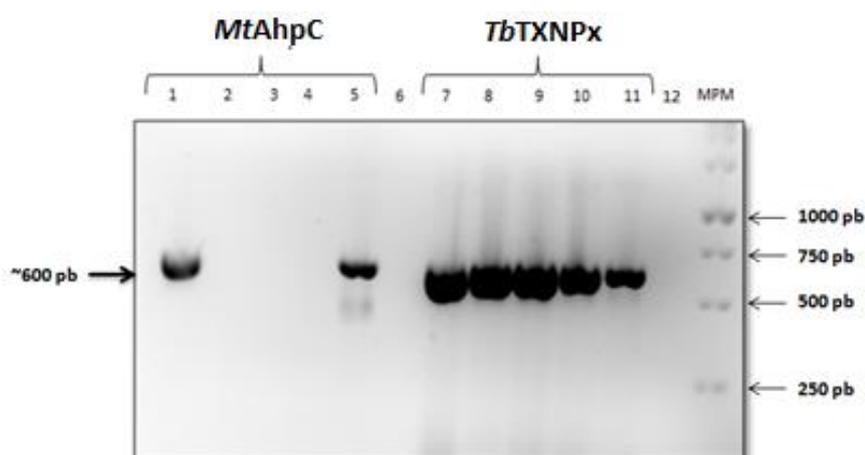


**Figura 8.** Análisis de la expresión y solubilidad para las proteínas *TbTXNPx* y *MtAhpC*, SDS-PAGE al 12%. Se realizó la inducción con 0,5 mM de IPTG 4hs a 25 y 30 °C. **Carriles 1:** control sin inducir, **2:** control inducido 1, **3:** control inducido 2, **4:** fracción soluble, **5:** fracción precipitada. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

<sup>2</sup> El peso molecular teórico del monómero de las proteínas son: Prx I humana 23,2 kDa, Prx II humana 23 kDa, Fhe prx 22, 5 kDa. Calculado mediante el programa ExPASy *Bioinformatics Resource Portal*, utilizo la secuencia amionoacídica de las proteínas mas la cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal.

<sup>3</sup> Se obtuvieron dos controles inducidos, donde el control inducido 1 fue a partir del sobrenadante obtenido luego de centrifugar las células a 4000 xg, y el control inducido 2 fue tomado luego de resuspender las células en buffer de inicio o lisis.

Con estos resultados no se observó inducción al probar temperaturas inferiores a 37 °C para la expresión. Debido a que se había partido de “stocks” de bacterias transformadas con los plásmidos de expresión pQE-30 conteniendo los insertos de interés, se dudó del estado y calidad de los mismos para producir las proteínas de interés. Por este motivo se continuó con una transformación de células de *E. coli* M15 competentes con los vectores pQE-30 conteniendo los insertos de las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*, a una concentración 10-40 ng/μL, obtenidos mediante el protocolo de extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina. La transformación se llevó a cabo tal como se explica en materiales y métodos. Luego se procedió con la identificación de las colonias que lograron incorporar el plásmido con los insertos de interés mediante “colony” PCR utilizando cebadores específicos y la posterior visualización de los productos de reacción en un gel de agarosa 1%, tal como se observa en la **figura 9**. Se analizaron con esta técnica 5 colonias transformadas. Como control negativo se utilizaron todos los componentes de reacción detallados en materiales y métodos menos el ADN a amplificar.

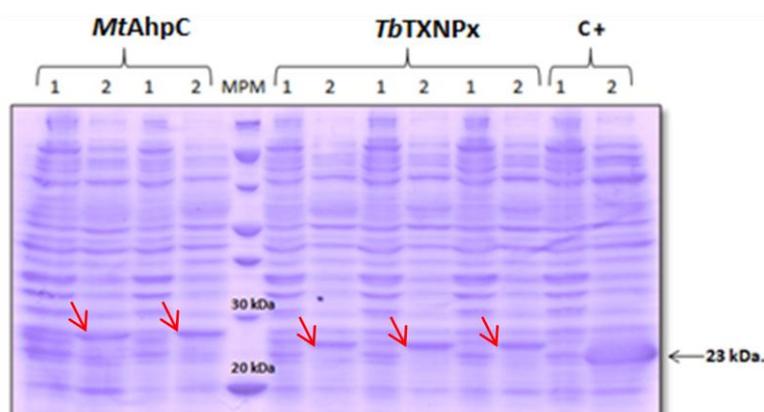


**Figura 9. Resultado de la “colony” PCR. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de colony PCR de colonias transformadas con los plásmidos pQE-30-*MtAhpC* y pQE-30-*TbTXNPx*. Pocillos del 1 al 5: productos obtenidos de los cinco transformantes para *MtAhpC*. Pocillo 6: control negativo. Pocillos del 7 al 11: productos obtenidos de los cinco transformantes para *TbTXNPx*. Pocillo 12: control negativo. MPM: Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, ready-to-use.**

Como se observa en la **figura 9**, se obtuvieron dos colonias que llevaban los plásmidos con los insertos de interés (colonias positivas) codificantes para la proteína *MtAhpC*, y 5 colonias positivas para la proteína *TbTXNPx*.

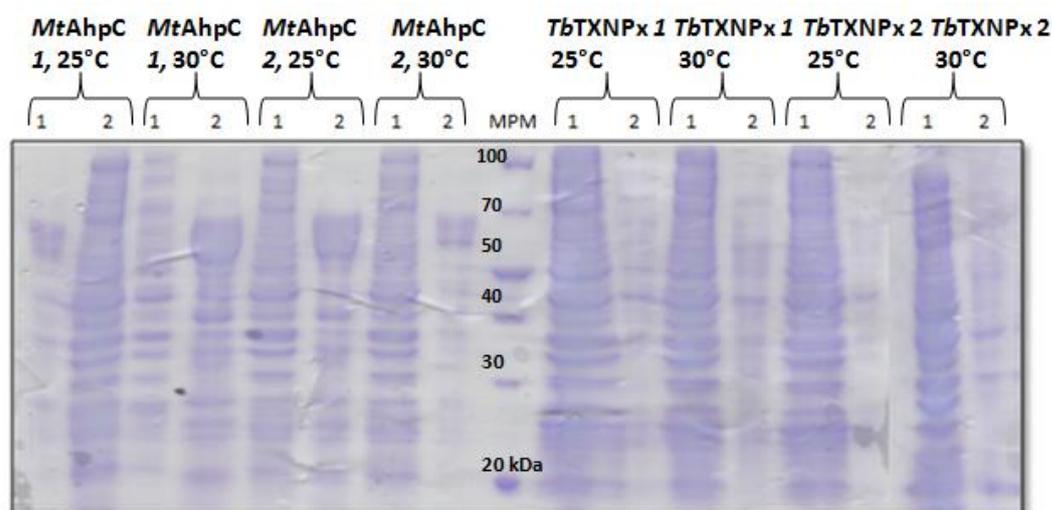
#### 4.1.2 “*Screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes *MtAhpC* y *TbTXNPx*.

A partir de las dos colonias positivas para *MtAhpC* y tres colonias positivas para *TbTXNPx* se realizó un “*screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes, en el cual se utilizan volúmenes de cultivo menores y condiciones desnaturizantes, ya que, luego de la expresión, las bacterias se resuspenden y se lisan en un buffer conteniendo urea 8 M, con el fin de solubilizar y recuperar todas las proteínas expresadas independientemente de su localización intracelular. La inducción se realizó a 37 °C por 4 hs. y se aumentó la concentración del inductor agregado a 1 mM. Al igual que la temperatura de inducción, la concentración del inductor agregado también puede afectar el nivel de expresión de la proteína recombinante tanto como su solubilidad. En la **figura 10** se muestra un gel SDS-PAGE al 12% donde se visualizan las muestras **sin inducir** e **inducidas** obtenidas de la inducción de los dos clones positivos de *MtAhpC* y los tres clones positivos de *TbTXNPx*. También se corrió en el gel un **control positivo** (C +) al cual se lo sometió al mismo procedimiento de “*screening*” de expresión, y corresponde a la expresión de la proteína *TcCPX* cuyo gen se encuentra clonado en el vector de expresión pQE-30, para la cual ya se había confirmado su expresión en otro trabajo.



**Figura 10.** “*Screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes *MtAhpC* y *TbTXNPx*, SDS-PAGE al 12 %. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG 4hs a 37 °C. **Carriles 1:** muestra sin inducir. **Carriles 2:** muestra inducida. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

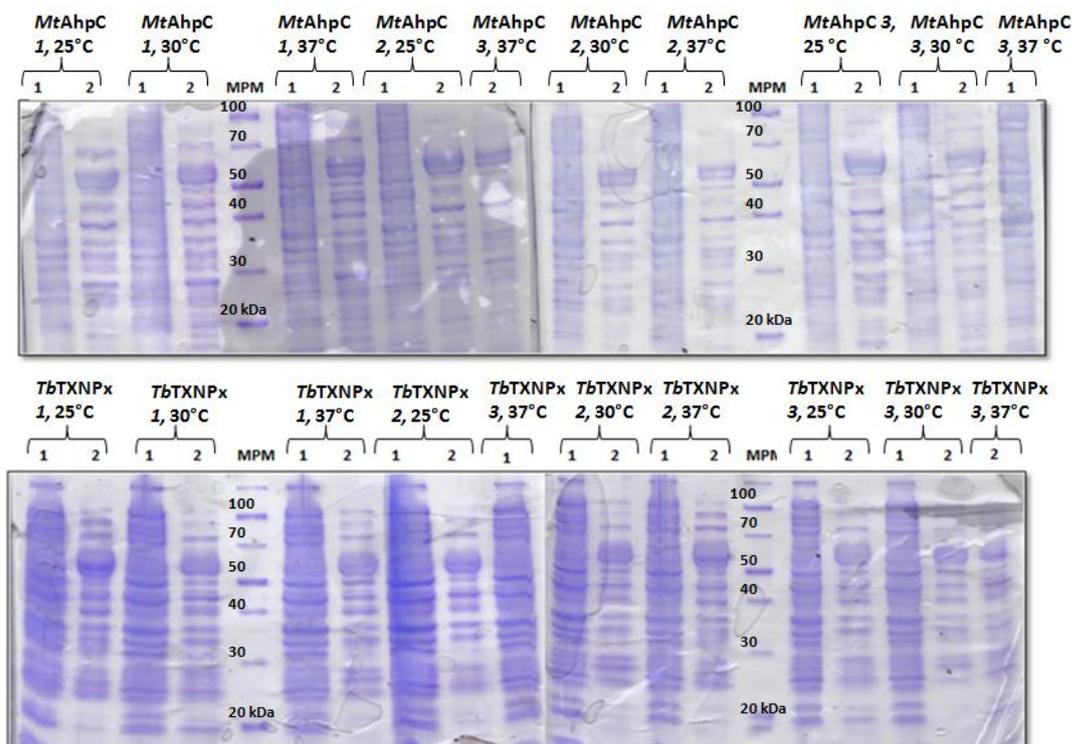
Como resultado de este ensayo parece observarse expresión de las proteínas analizadas, observándose bandas de peso molecular correspondiente a las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* en los carriles 2 de la **figura 10**, pero en baja cantidad con respecto al control positivo. A partir de estos mismos clones (se eligieron dos de los tres clones positivos para *TbTXNPx*) se analizó la expresión abordando el mismo procedimiento, utilizando 1 mM IPTG pero a temperaturas menores de inducción, esto es, a 25 y 30 °C, con lo que no se detectó una clara expresión, como se puede ver en la **figura 11**.



**Figura 11.** “*Screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12 %. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG 4hs a 25 y 30 °C. **Carriles 1:** muestra sin inducir. **Carriles 2:** muestra inducida. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

Teniendo en cuenta que las proteínas parecieron expresarse a 37°C utilizando 1 mM de IPTG y que no se observó expresión alguna a al bajar la temperatura de expresión, se decidió repetir el procedimiento a las tres temperaturas analizadas. Igualmente los clones con los que se analizó esa expresión (figuras 10 y 11) se perdieron debido a que no se realizaron en el debido momento “*stocks*” para almacenar a -80 °C, por lo que se volvieron a transformar células *E. coli* M15 competentes, con los vectores pQE-30-*MtAhpC* y pQE-30-*TbTXNPx* y se volvieron a analizar colonias que lograron incorporar el plásmido con los insertos de interés mediante “*colony*” PCR utilizando cebadores específicos. A partir de tres colonias

positivas para *MtAhpC* y tres colonias positivas para *TbTXNPx*, se volvió a hacer un “*screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes, utilizando volúmenes de cultivo menores y condiciones desnaturalizantes. Los resultados de este ensayo se muestran en la **figura 12**.



**Figura 12.** “*Screening*” rápido de expresión de proteínas recombinantes *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Electroforesis SDS-PAGE al 12 %. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG 4hs a 25, 30 y 37 °C. **Carriles 1:** muestra sin inducir. **Carriles 2:** muestra inducida. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

Al resumir los resultados obtenidos hasta la **figura 12**, en una primera transformación de células de *E. coli* M15 y un “*screening*” rápido de expresión a 37°C pareció observarse expresión de las proteínas recombinantes, pero al analizar la expresión a temperaturas menores no se observó expresión. Al volver a transformar células de *E. coli* M15 con los mismos plásmidos y repetir el *screening* rápido de expresión a las tres temperaturas anteriormente analizadas (**figura 12**), no se observó el mismo patrón de expresión a 37°C obtenido anteriormente (**figura 10**) y en ningún caso se observó una sobreexpresión fácilmente interpretable de las proteínas

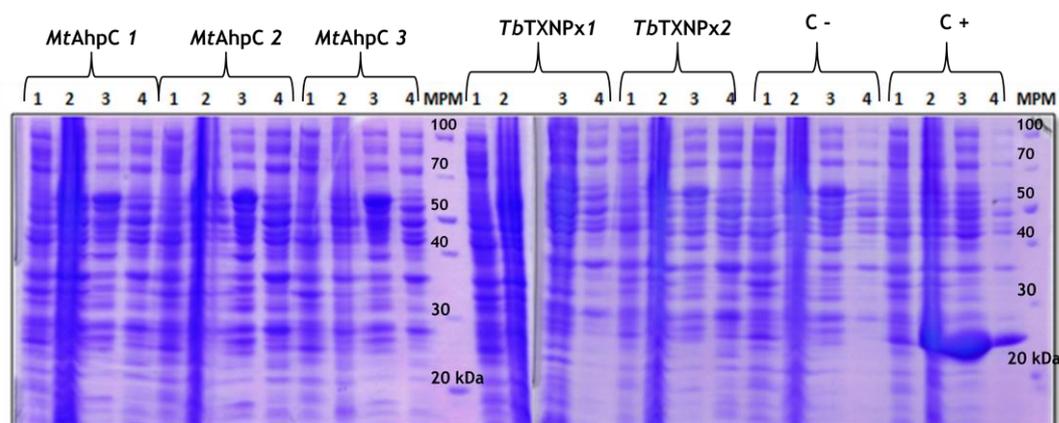
recombinantes de interés de PM esperado de aproximadamente 23 kDa para ambas<sup>4</sup> (como lo fue para *hPrxI* y *hPrxII* y *FhePrx*).

### Ensayo de captura:

Debido a que no se estaba seguro si había o no expresión muy baja de la *MtAhpC* y *TbTXNPx* en la fracción soluble se realizó un ensayo de “captura” de las proteínas recombinantes explicado en materiales y métodos, con el fin de descartar que hubiera muy poca expresión, pero aunque muy poca, que esta estuviera ocurriendo. Para este ensayo se volvieron a transformar células de *E.coli* M15 con los plásmidos pQE-30- *MtAhpC* y pQE-30- *TbTXNPx* y a partir de “colony” PCR se seleccionaron tres colonias positivas para la proteína *MtAhpC* y dos colonias positivas para *TbTXNPx*. Se realizó en primer lugar, un ensayo de expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes, con un **control positivo** (C+) correspondiente a la expresión de la proteína *TcCPX* a partir de bacterias M15 transformadas pQE-30- *TcCPX* y un **control negativo** para el cual se utilizó un *stock* de bacterias M15 transformadas con un vector pQE-30 vacío, esto es, sin inserto clonado para la expresión. Se utilizó para la inducción de las proteínas 1 mM de IPTG y la expresión se realizó a 25°C durante toda noche. Al igual que los demás ensayos de expresión y solubilidad se obtuvieron las muestras fracción **soluble** e **insoluble** y los controles: **control sin inducir** y **control inducido**. Con estas muestras se realizó un gel SDS-PAGE al 12 % (**figura 13**).

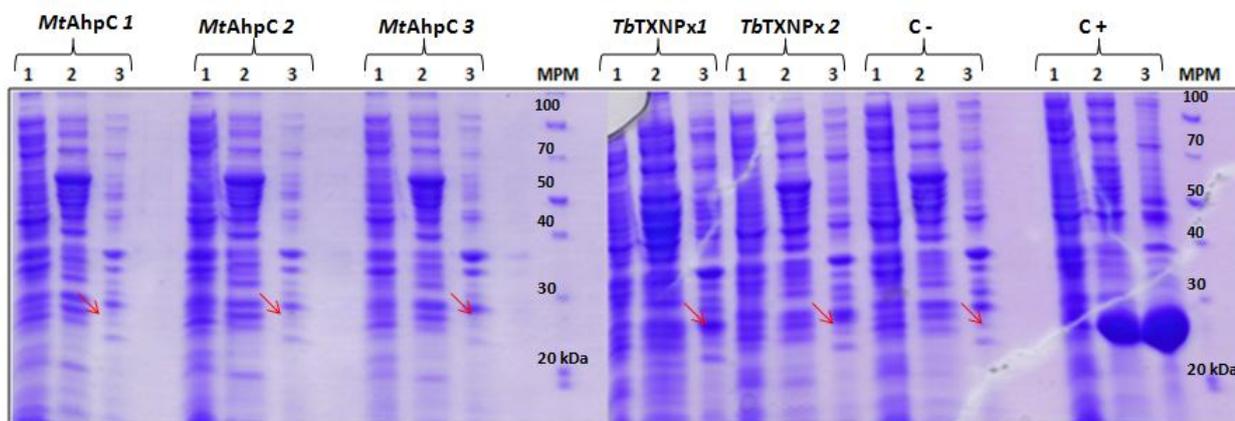
---

<sup>4</sup> El peso molecular de *MtAhpC* se obtuvo de la base de datos *TubercuList* y es de 22,4 kDa. El peso molecular de *TbTXNPx* de 23,3 kDa se obtuvo utilizando el programa *ExpASy Bioinformatics Resource Portal* a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína. En ambos se tuvo en cuenta la cola de seis histidinas.



**Figura 13. Análisis de la expresión y solubilidad para las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*, SDS-PAGE al 12 %. La inducción se realizó con 1 mM de IPTG incubándolas toda la noche a 25°C. Carriles 1: control sin inducir, 2: control inducido, 3: fracción soluble, 4: fracción insoluble. MPM: *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.**

Se realizó el ensayo de captura, donde a 350  $\mu$ L de la fracción soluble de cada proteína obtenida del ensayo anterior y de los controles negativo y positivo, se incubaron con 30  $\mu$ L de resina NTA-níquel limpia durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó por 3 min. a 5000x g, se descartó el sobrenadante, y la resina se lavó cuatro veces con 1 mL de buffer de inicio o lisis centrifugando a 8000x g por 2 min. entre cada lavado, y por último se descartó el sobrenadante. Para eluir se agregaron 30  $\mu$ L de buffer de muestra de electroforesis 1X y se calentó a 90 °C por 5 min. El sobrenadante de este último paso corresponde a la fracción de la proteína que se adhirió a la resina, la que se nombró como **fracción concentrada**. Se realizó un gel SDS-PAGE al 12% para visualizar el resultado, con as muestras control sin inducir, fracción soluble y fracción concentrada (figura 14).



**Figura 14.** Ensayo de “captura” de las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Electroforesis en gel de SDS-PAGE 12 %. Carriles 1: control sin inducir, 2: fracción soluble, 3: fracción concentrada. MPM: *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder*.

En la **figura 14** se puede observar que ningún clon expresó la proteína recombinante de interés, ya que no se ve ninguna banda que corresponda con el tamaño esperado de las proteínas (mostrado en flechas rojas) y ya que no aprecian diferencias en cuanto al patrón de bandas de los carriles 2 y 3, entre el control negativo y los clones conteniendo el inserto codificante de las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Con el control positivo se puede ver en el carril 3 de este, que efectivamente la proteína es concentrada mediante el ensayo de “captura” al quedar retenida en la resina NTA-níquel. Como no hubo expresión de estas proteínas se procedió a la expresión y purificación de las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII* y *FhePrx*.

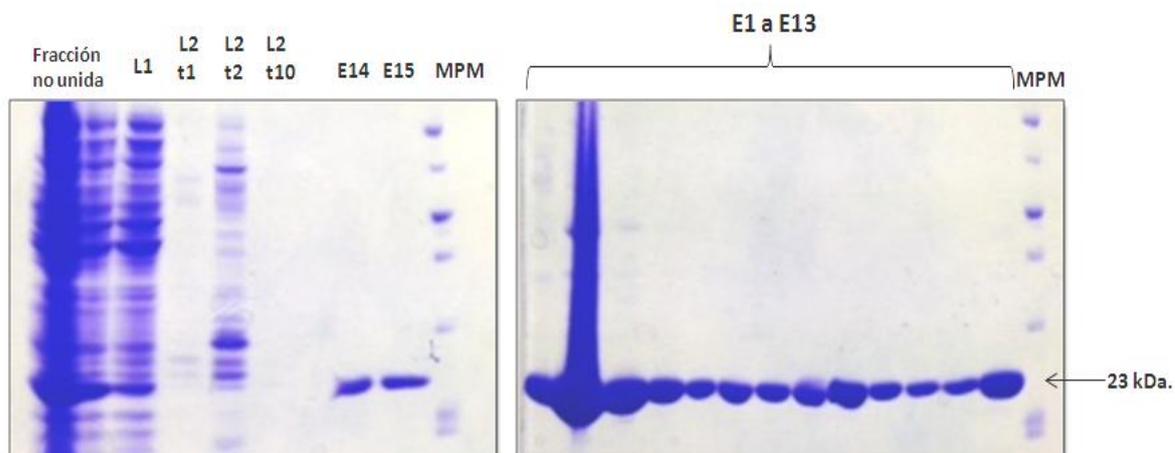
## 4.2 Expresión y purificación de las proteínas *hPrxI*, *hPrxII* y *FhePrx*.

Se expresaron y purificaron las proteínas *hPrxI*, *hPrxII* y *FhePrx* siguiendo el procedimiento explicado en materiales y métodos. Se partió del stock de células de *E. coli* M15 transformadas con los plásmidos pQE-30 conteniendo el gen para la expresión de estas proteínas, a las cuales se les analizó su solubilidad y expresión (**figura 7**). La inducción para la expresión y purificación se llevó a cabo con 0,5 mM de IPTG por 4 hs. a 37 °C. Luego de recolectadas las células y lisadas se centrifugó el lisado, obteniendo una fracción soluble e insoluble. A partir de la fracción soluble conteniendo a la proteína recombinante de interés se procedió con la purificación.

### 4.2.1 Purificación de la proteína recombinante *hPrxI*.

Las proteínas recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad, ya que debido al vector de expresión utilizado, las proteínas presentan en su extremo N-terminal una cola de seis residuos de histidina, otorgándoles una afinidad específica a iones de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). En primer lugar se equilibró un columna HisTrap™ 5 mL, con 10 volúmenes de buffer de (inicio imidazol 20 mM) para luego recircular la fracción soluble filtrada por una hora. Finalmente se realizaron lavados con 5 volúmenes de buffer de inicio (20 mM de imidazol), luego 10 volúmenes de buffer de lavado (100 mM de imidazol) y finalmente se eluyó la proteína con buffer de elución (400 mM de Imidazol).

La visualización e identificación de las fracciones en las que estaba presente la proteína recombinante se hizo mediante electroforesis SDS-PAGE al 12%. En este se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de fracción no unida (la fracción que se obtiene luego de recircular el sobrenadante), el mismo volumen de una muestra correspondiente al primer lavado con buffer de inicio (L1), tres muestras del segundo lavado con buffer de lavado (L2 t1, L2 t2, L2 t10), y todos los eluidos (E1- E15) obtenidos con el fin de analizar la pureza de estos. Los resultados se observan en la **figura 15**.

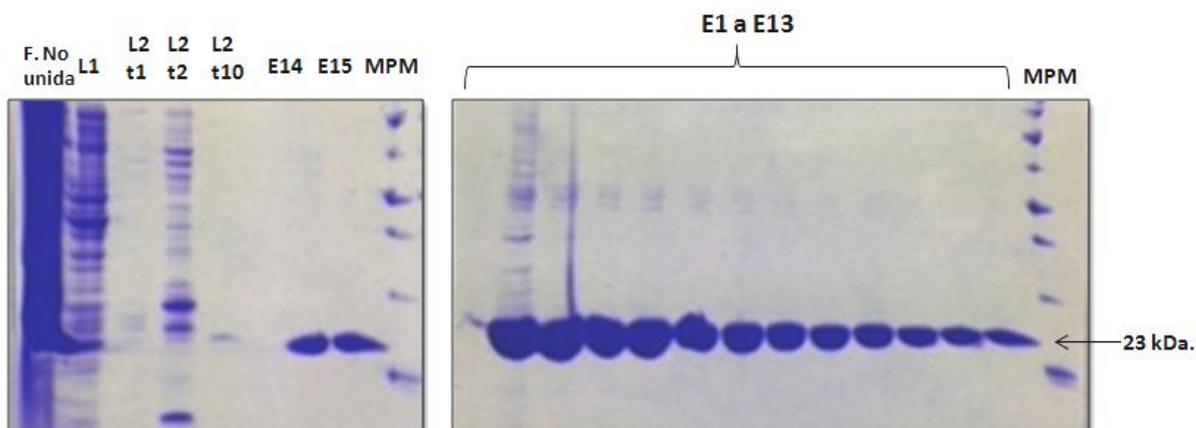


**Figura 15.** Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante *hPrxI*, SDS- PAGE al 12%. Carriles: L1, lavado 1. L2 t1, lavado 2 tubo 1. L2 t3, lavado 2 tubo 3. L2 t10, lavado 2 tubo 10. E 1 – 15, eluidos tubos del 1 al 15. **MPM:** *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein ladder*.

En la **figura 15** se puede observar en los carriles correspondientes a los eluidos (E1-E15) la presencia de la proteína *hPrxI* como una banda de 23 kDa de acuerdo al peso molecular teórico del monómero de esta proteína más la secuencia de seis residuos de histidina calculado mediante el programa ExPASy Bioinformatics Resource Portal. Se juntaron los eluidos E3-E15 en un mismo tubo y se dializaron y concentraron contra buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl a pH 7.4, ya que en estos eluidos no se observó ninguna banda que correspondiera a otra proteína.

#### 4.2.2 Purificación de la proteína recombinante *hPrxII*.

Siguiendo el mismo procedimiento que para la purificación de la *hPrxI*, se purificó la proteína *hPrxII* donde las muestras obtenidas, fracción no unida, primer lavado (L1), tres muestras del segundo lavado (L2 t1, L2 t2, L2 t10) y todos los eluidos (E1- E15) obtenidos se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% (**figura 16**).

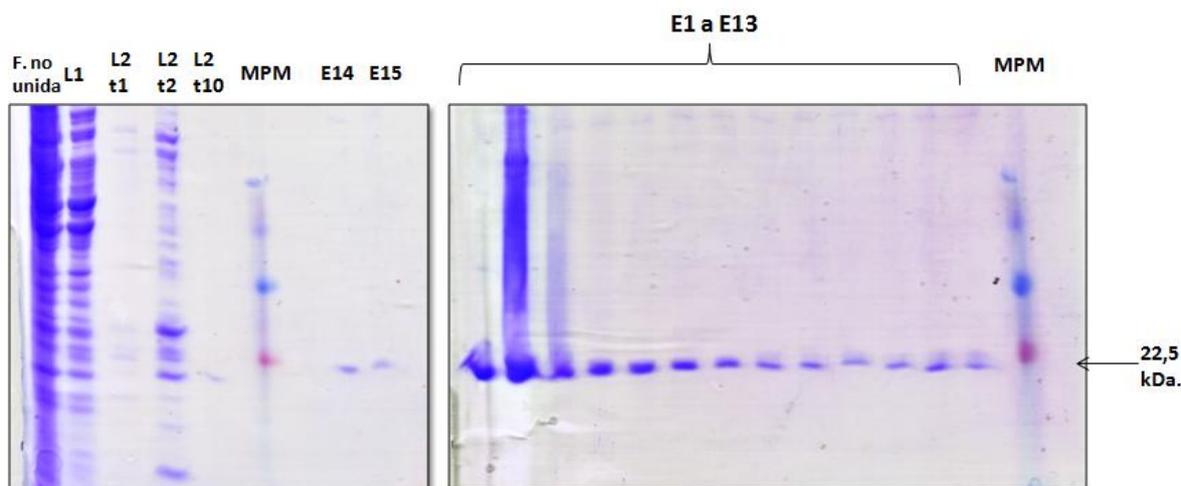


**Figura 16. Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante *hPrxII*, SDS-PAGE al 12%. Carriles: L1, lavado 1. L2 t1, lavado 2 tubo 1. L2 t3, lavado 2 tubo 3. L2 t10, lavado 2 tubo 10. E 1 – 15, eluidos tubos del 1 al 15. MPM: *Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein ladder*.**

Se puede observar en la **figura 16** en los carriles correspondientes a los eluidos (E1-E15) la presencia de la proteína *hPrxII* como una banda de 23 kDa de acuerdo al peso molecular teórico del monómero de esta proteína más la secuencia de seis histidinas calculado mediante el programa ExPASy *Bioinformatics Resource Portal*. Se juntaron todos los eluidos E4-E15 en un mismo tubo y se dializaron y concentraron contra buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl a pH 7.4.

#### 4.2.3 Purificación de la proteína recombinante *FhePrx*.

Para purificar la proteína recombinante *FhePrx* se siguió el mismo procedimiento de purificación que para las proteínas *hPrxI* y *hPrxII*, donde las muestras obtenidas, fracción no unida, primer lavado (L1), tres muestras del segundo lavado (L2 t1, L2 t2, L2 t10) y todos los eluidos (E1- E15) obtenidos se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% (**figura 17**).

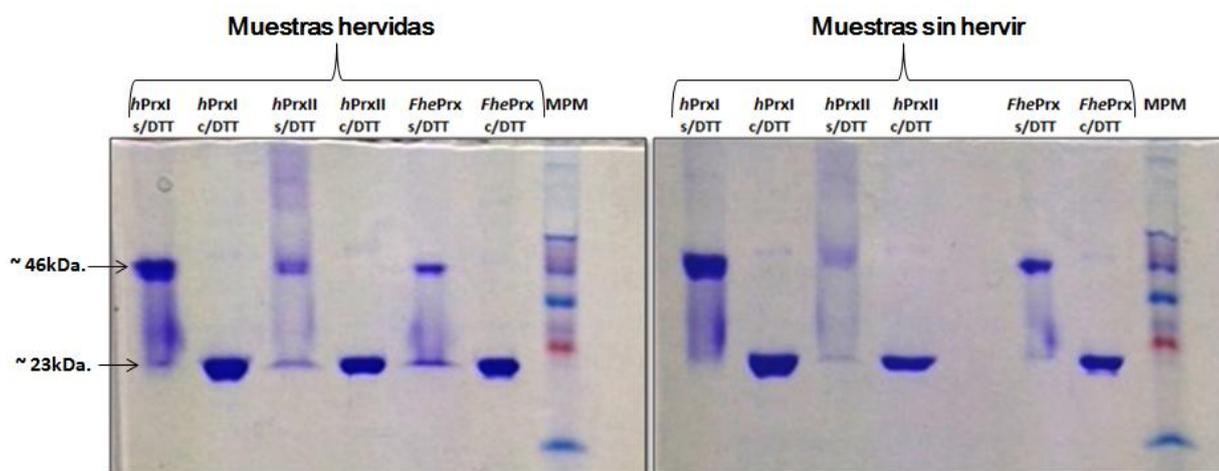


**Figura 17. Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante *FhePrx*, SDS-PAGE al 12%. Carriles: L1, lavado 1. L2 t1, lavado 2 tubo 1. L2 t3, lavado 2 tubo 3. L2 t10, lavado 2 tubo 10. E 1 – 15, eluidos tubos del 1 al 15. MPM: *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*.**

Se observa en la **figura 17** en los carriles correspondientes a los eluidos (E1-E15) la presencia de la proteína como una banda acorde al peso molecular teórico del monómero de esta proteína más la secuencia de seis residuos de histidina. Se juntaron los eluidos E3-E15 en un mismo tubo y se dializaron y concentraron contra buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl a pH 7.4.

#### 4.2.4 Análisis de las proteínas recombinantes purificadas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras y no reductoras.

Luego de la diálisis y concentración en buffer Hepes 50mM, 100 mM de NaCl pH 7.4 de las tres proteínas recombinantes purificadas, se midió la concentración proteica mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. Se analizaron las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras y no reductoras, esto es en presencia de DTT o sin DTT, e hirviendo la proteína o sin hervirla. Para esto se prepararon muestras por duplicado de las proteínas purificadas en buffer de muestra 1X para electroforesis con DTT o en buffer de muestra sin DTT. A un par de las muestras con DTT o sin DTT para cada proteína se las hirvió a 90°C por cinco minutos. Se sembraron 10 µL de cada muestra conteniendo 2 µg de proteína por carril en gels para electroforesis SDS-PAGE al 12% (**figura 18**).



**Figura 18.** Perfil electroforético de las proteínas recombinantes en condiciones reductoras y no reductoras, hervidas y sin hervir, SDS-PAGE al 12%. **s/DTT:** proteínas en buffer de muestra 1X sin DTT. **c/DTT:** proteínas en buffer de muestra 1X conteniendo DTT **MPM:** *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*.

Para las tres Prxs se puede observar en la **figura 18** la diferencia en la migración cuando la proteína es incubada con DTT o sin DTT. En presencia del agente reductor se ve que las proteínas migran mayoritariamente como una banda correspondiente a la forma monomérica, que es lo que se observó en las electroforesis anteriores. En cambio en ausencia del reductor las proteínas migran mayormente como una banda de mayor peso molecular, correspondiente a la forma de dímeros unidos por un enlace disulfuro. Esto concuerda con el hecho de que las tres proteínas analizadas pertenecen a la subfamilia de 2-Cys Prxs, donde estas forman dímeros mediante enlaces disulfuro intermoleculares.

En cuanto a las diferencias observadas en las muestras hervidas y sin hervir, se observa que cuando las proteínas son cargadas en buffer de muestra sin DTT y son hervidas la proteína migra como dos bandas (correspondiente al monómero y al dímero) ya que por efecto de las altas temperaturas parte del dímero se transforma en monómero. En cambio, cuando la proteína no es hervida y no se trata con DTT, la banda predominante es la correspondiente al dímero. También se observa en las proteínas sin hervir y con DTT una banda tenue de mayor peso molecular correspondiente a la forma dimérica, lo que muestra que a pesar de que hayan sido tratadas con DTT no se logró reducir del todo los enlaces disulfuro.

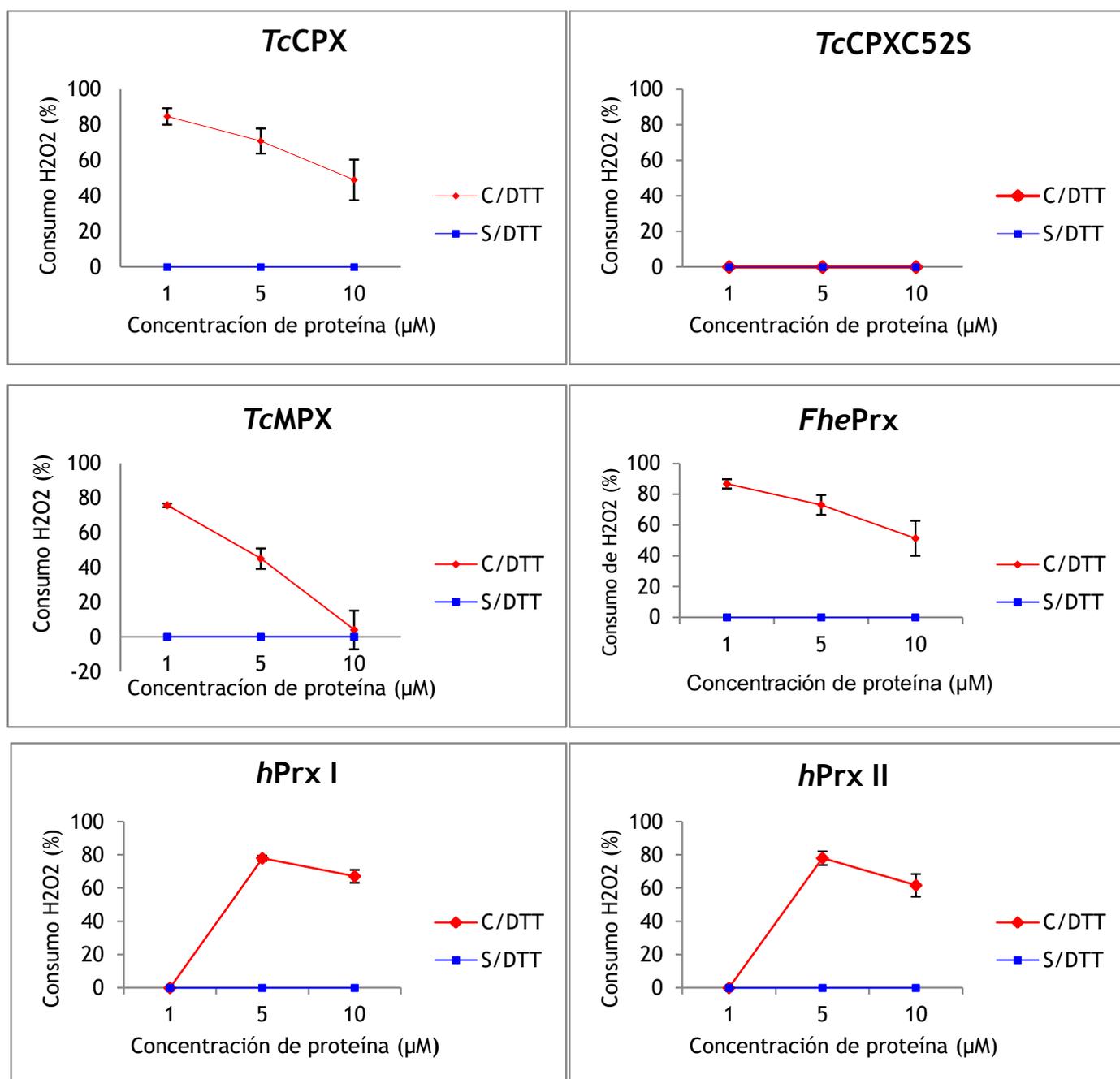
### 4.3 Ensayos de actividad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* por parte de las proteínas recombinantes.

El consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las Prxs *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, expresadas y purificadas en este trabajo, y de las Prxs *TcCPX* y *TcMPX* y el mutante *TcCPXC52S* fue determinado mediante el método colorimétrico del ferritiocinato tal como se describe en materiales y métodos.

#### 4.3.1 Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o ausencia de DTT en función de la concentración de proteína.

En este ensayo se analizó la habilidad de remoción de peróxido de hidrógeno de las proteínas recombinantes midiendo el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia o ausencia de DTT, en función de la concentración de proteína. Se utilizaron tres concentraciones: 1, 5 y 10 μM de cada proteína en buffer Hepes pH 7,4, las que fueron incubadas con 2,5 mM de DTT o sin DTT durante 30 min. a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentración final) para iniciar la reacción, la que se detuvo a los 15 min. agregando de 10 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (vol/vol). Por último se agregaron 10 μL de la sal sulfato de amonio ferroso (Fe(II)(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 10 mM disuelta en ácido sulfúrico 2,5 M, y 20 μL de tiocianato de potasio KSCN 2,5 M. La absorbancia fue medida a 490 nm. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final fue determinada espectrofotométricamente usando preparaciones de concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como estándares. Los resultados se muestran en la **figura 19**.

Como se observa en la **figura 19** las proteínas recombinantes analizadas (excepto el mutante C52S), catalizan en presencia de DTT la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manera dependiente de la concentración proteica. Sin embargo, en ausencia de DTT estas pierden la actividad peroxidasa al no observarse remoción alguna de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados muestran que las proteínas recombinantes estudiadas presentan actividad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma dependiente de tiol. El mutante C52S es un mutante de la proteína *TcCPX* en donde el residuo de cisteína 52 (la C<sub>P</sub>) se encuentra sustituido por una serina. Como se puede apreciar en la **figura 19**, este mutante no fue capaz de consumir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en presencia como en ausencia de DTT.



**Figura 19.** Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de DTT por parte de las proteínas *TcCPX*, *TcCPXC52S*, *TcMPX*, *FhePrx*, *hPrx I* y *hPrx II* en función de la concentración de proteína. Los valores mostrados se refieren a los promedios, las barras de error a la desviación estándar de tres experimentos independientes. En rojo se muestran los resultados al incubar a las proteínas con 2,5 mM de DTT (C/DTT) por 30 min. a temperatura ambiente y en azul los resultados tras incubar a las proteínas en ausencia de DTT (S/DTT).

#### 4.3.2 Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en función de la concentración de sustrato.

De forma similar se determinó el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las proteínas recombinantes variando la concentración inicial de este añadida a la mezcla de reacción. Para esto se incubó a las Prxs a una concentración fija de 5 μM en buffer Hepes pH 7,4 con 2,5 mM de DTT por 30 min. y se inició la reacción con 20, 40, 60, 80 y 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dejándola transcurrir por 15 min. a temperatura ambiente. Se siguió con el protocolo como se explicó anteriormente. Los resultados se muestran en la **figura 20**.

Para las proteínas *TcCPX*, *TcMPX* y *Fhe Prx*, se obtuvo que cuanto mayor fue la concentración del sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida a la reacción mayor fue el consumo de este, donde con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agregado se alcanzó a consumir un 80 % o más de este. En cambio para las Prxs humanas, el comportamiento fue diferente, ya que se alcanzaron porcentajes de consumo cercanos al 80 % a concentraciones de sustrato intermedias, (40 y 60 μM para PrxI y 60 μM para PrxII), pero a concentraciones mayores, 80 y 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la capacidad de consumo de peróxido de estas proteínas disminuyó. El mutante *TcCPXC52S* fue incapaz de consumir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> independientemente de la concentración de sustrato, mostrándose totalmente inactivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo anterior.

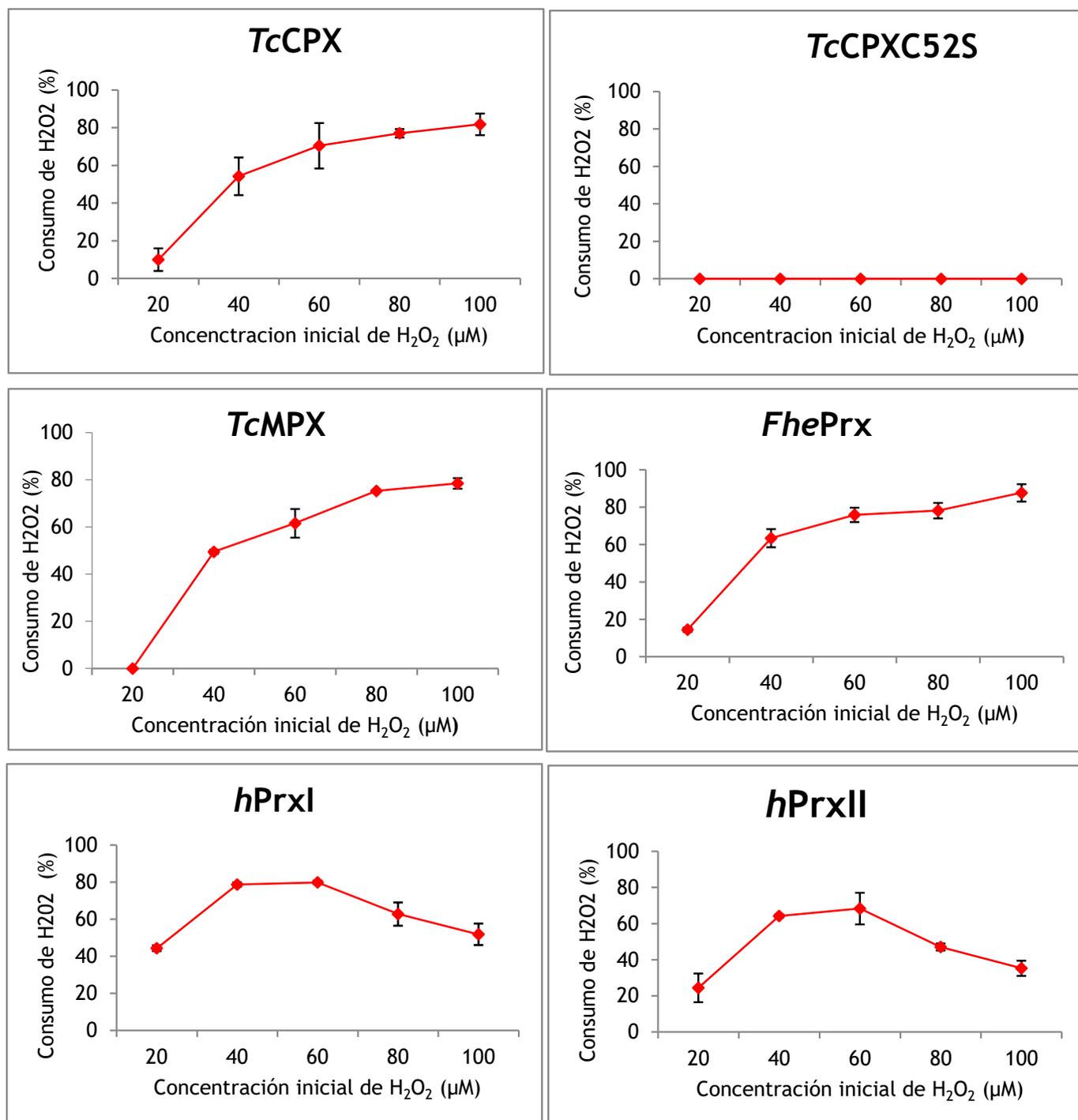


Figura 20. Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las proteínas *TcCPX*, *TcCPXC52S*, *TcMPX*, *FhePrx*, *hPrxI* y *hPrxII* en función de la concentración de sustrato. Los valores mostrados se refieren a los promedios, las barras de error a la desviación estándar de dos experimentos independientes. Se muestran en rojo los resultados al incubar a las proteínas con 2,5 mM de DTT (C/DTT).

#### 4.3.3 Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de DTT o de la proteína TcTXN1.

Se realizó un tercer ensayo de análisis de consumo de 50 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para analizar la capacidad de las Prxs recombinantes de usar a la proteína TcTXN1 en su forma reducida como fuente de equivalentes de reducción durante la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta proteína es una oxidorreductasa dependiente de tripanotión y miembro de la superfamilia de las tiorredoxinas. Forma parte del sistema antioxidante único dependiente de tripanotión común a todos los tripanosomátidos. En este sistema las triparredoxinas dependiendo de su localización intracelular, regeneran a las distintas triparredoxinas peroxidasas hacia su forma reducida. Aunque el protocolo utilizado permite medir el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando tanto a las proteínas tiorredoxinas/triparredoxinas u otro reductante fisiológico apropiado, como al DTT para actuar como agente reductante, se ha reportado que este último es menos eficiente que las proteínas fisiológicas y que además a concentraciones mayores a 1mM podría reaccionar directamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nelson y Parsonage, 2011).

En este ensayo se utilizó una concentración fija de proteína de 5 µM en buffer Hepes pH 7,4 y se midió el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM por parte de esta en tres condiciones: incubando a la proteína por 30 min. a temperatura ambiente con DTT (a una concentración final 2,5 mM), sin DTT, o con la TcTXN1 a una concentración final de 12 µM en su forma reducida. La TcTXN1 fue expresada y purificada en otro trabajo mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC), donde luego de expresada fue digerida con trombina con el fin de eliminar la cola de seis residuos de histidina de su región N-terminal, y fue reducida tras la incubación con DTT como se explica en materiales y métodos.

Los resultados del ensayo de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestran en la **figura 21**, donde se obtuvo que ninguna de las Prxs recombinantes analizadas presentan actividad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la incubación con TcTXN1 ya que el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue nulo, ni siquiera para la TcCPX la que se conoce que es sustrato de la TcTXN1. En concordancia con los ensayos anteriores sí hubo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las Prxs tras la incubación con DTT y no lo hubo en ausencia de este.

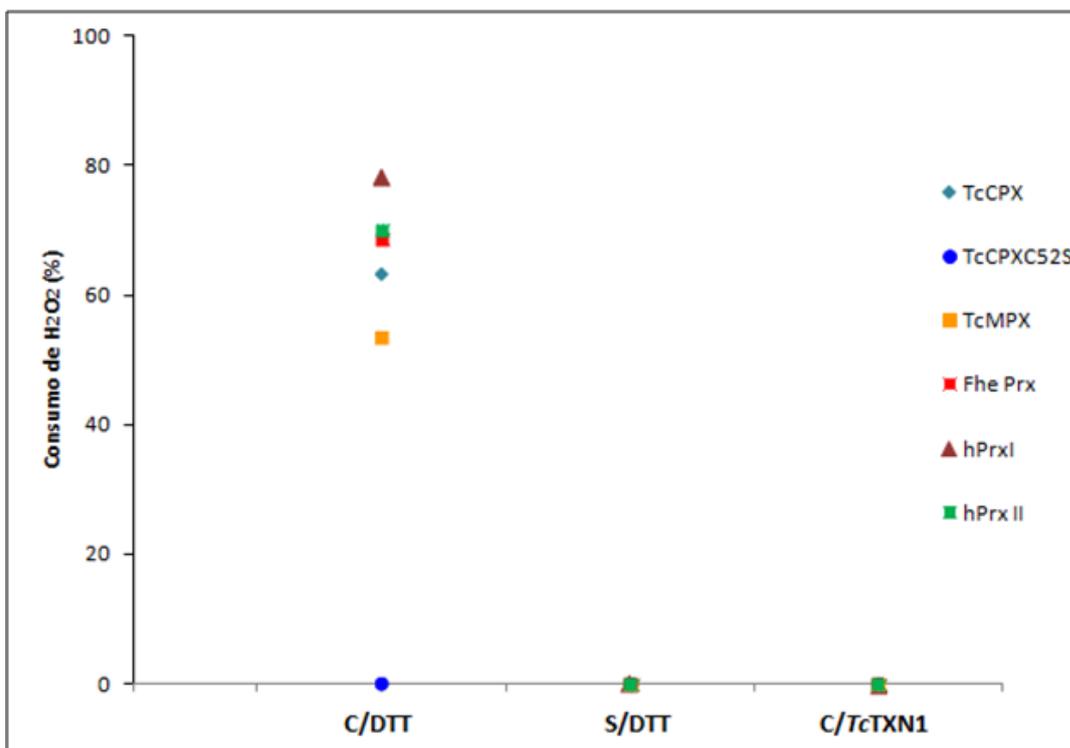


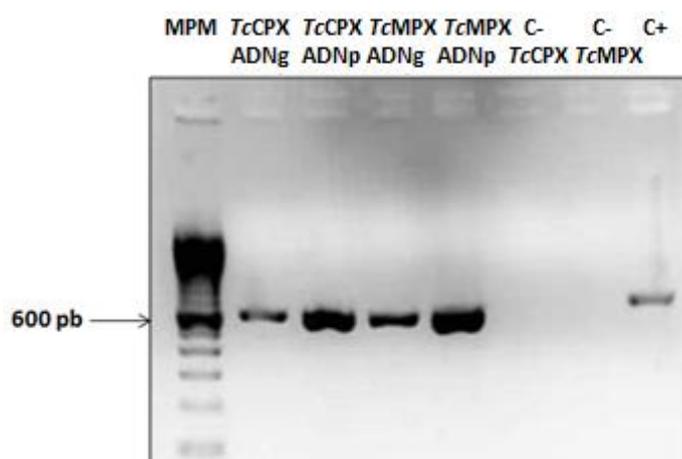
Figura 21. Consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las proteínas *TcCPX*, *TcCPXC52S*, *TcMPX*, *FhePrx*, *hPrxI* y *hPrxII* en presencia o ausencia de DTT, o en presencia de la proteína *TcTXN1*. Se muestra el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de las proteínas al incubarlas por 30 min. a temperatura ambiente con 2,5 mM de DTT (C/DTT), sin DTT (s/DTT), o con 12 μM de la proteína *TcTXN1*.

#### 4.4 Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasa mitocondrial (*TcMPX*) y citosólica (*TcCPX*) de *T. cruzi* en el vector de expresión pET28c.

##### 4.4.1 Amplificación por PCR de los genes codificantes para las proteínas *TcMPX* y *TcCPX*.

Se amplificaron los genes de *TcCPX* y *TcMPX* utilizando como molde ADN genómico de la cepa Dm28c de *T. cruzi* y plasmídico del vector pQE-30 conteniendo como inserto uno u otro de los genes nombrados anteriormente. Se utilizó la ADN polimerasa termoestable de alta fidelidad Phusion® (Biolabs) en las condiciones de reacción que se describe en materiales y métodos. Los productos de PCR obtenidos

fueron visualizados en un gel de agarosa 1 %, teñidos con bromuro de etidio (**figura 22**).

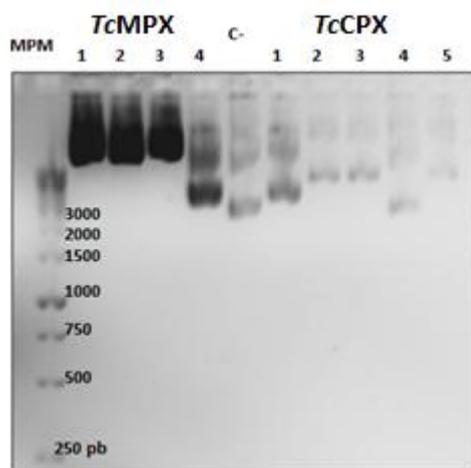


**Figura 22.** PCR de los genes codificantes para las proteínas TcMPX y TcCPX a partir de ADN genómico y ADN plasmídico. Electroforesis en gel de agarosa 1% conteniendo 10  $\mu$ L de los productos de reacción. **Carriles:** ADNg: producto de amplificación a partir de ADN genómico. ADNp: producto de amplificación a partir de ADN plasmídico. **MPM:** 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific.

En la **figura 22** se observan los productos de PCR como bandas de 600 pares de bases, tamaño esperado en la amplificación de estos genes. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen codificante para MPX eliminan la señal de importación a la mitocondria, que al ser una región muy hidrofóbica produce que la proteína precipite durante su purificación. Por este motivo, los productos de PCR de ambas proteínas presentan el mismo tamaño en pares de bases.

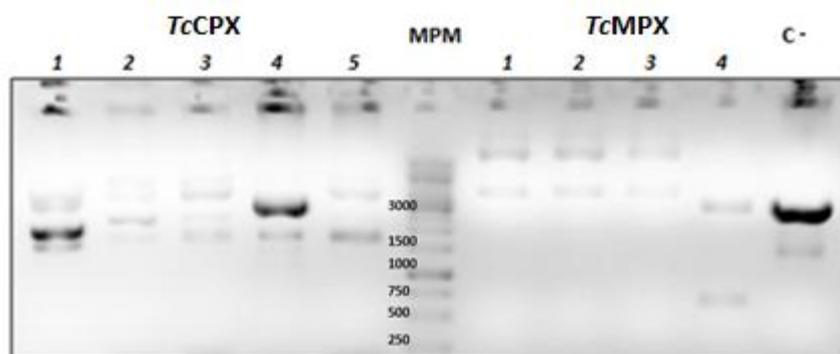
A los productos de PCR obtenidos a partir de la DNA polimerasa Phusion™ (los genes codificantes para las proteínas TcCPX y TcMPX) se les agregó mediante la enzima Taq polimerasa de *Thermus aquaticus* los deoxinucleótidos de adenina en los extremos 5' y 3'. Luego mediante una ligación utilizando la enzima T4 ligasa (Promega), los genes obtenidos a partir de ADN plasmídico fueron clonados en el vector de clonado pGEM-T easy según se describe en materiales y métodos. Los productos de ligación: TcCPX-pGEM-T y TcMPX-pGEM-T fueron electroporados en

células de *E. coli* XL1-Blue electrocompetentes. Las colonias transformadas con estos plásmidos fueron seleccionadas por el sistema de  $\alpha$ -complementación y por resistencia al antibiótico ampicilina. A partir de colonias blancas obtenidas se aisló el ADN plasmídico (*TcCPX*-pGEM-T easy y *TcMPX*-pGEM-T) mediante el protocolo de lisis alcalina, se midió la concentración de ADN, y este se visualizó en gel de agarosa 1% (**figura 23**).



**Figura 23.** Purificación de ADN plasmídico de los plásmidos *TcCPX*- pGEM-T y *TcMPX*-pGEM-T a partir de células XL1-blue transformadas. Electroforesis en gel de agarosa 1%. **Carriles:** *TcMPX* 1-4, ADN plasmídico a partir de cuatro colonias transformadas con *TcMPX*-pGEM-T. *TcCPX* 1-5: ADN plasmídico a partir de cinco colonias transformadas con *TcCPX*-pGEM-T. C- : control negativo correspondiente al plásmido pGEM-T sin inserto. **MPM:** *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder*,

En la **figura 23** se puede observar el ADN plasmídico en las distintas conformaciones que este puede adoptar. Para corroborar la presencia del inserto se realizó una digestión enzimática con *EcoRI* ya que esta corta hacia ambos extremos del gen insertado, por lo que luego de la digestión este se libera del plásmido. Se digirieron ambos plásmidos, *TcCPX*-pGEM-T y *TcMPX*-pGEM-T, con la enzima *EcoRI* como se describe en materiales y métodos y se visualizó la digestión en gel de agarosa 1%. (**figura 24**).



**Figura 24.** Digestión enzimática de los plásmidos *TcCPX*-pGEM-T y *TcMPX*-pGEM-T con *EcoRI*. Carriles: *TcCPX* 1-5: productos de la digestión con *EcoRI* de *TcCPX*-pGEM-T obtenidos de cinco colonias transformadas. *TcMPX* 1-4: productos de la digestión con *EcoRI* de *TcMPX*-pGEM-T obtenidos de cuatro colonias transformadas. C- : control negativo correspondiente al plásmido pGEM-T easy sin inserto. **MPM:** *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use*.

Como resultado de la digestión con *EcoRI* (**figura 24**) el inserto se ve únicamente en el clon *TcMPX* 4 como una banda de tamaño esperado de 600 pares de bases. En las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de digestión la enzima no logró digerir a ninguno de los plásmidos con el inserto de *TcCPX* ya que no se observa la banda de tamaño esperado pero en cambio se observan bandas correspondientes a las distintas conformaciones plasmídicas.

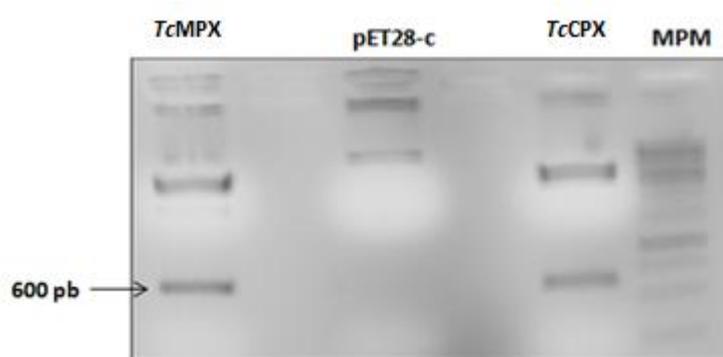
Sin embargo, si se compara la **figura 24** con la **figura 23** se puede ver un perfil de bandas similar entre *TcMPX* 4 y *TcCPX* 1 por lo que se consideró que ambos plásmidos obtenidos de estos clones presentaban el inserto de interés y fueron seleccionados para continuar con el subclonado direccional en el vector pET28c.

#### 4.4.2 Subclonado de los genes codificantes para *TcCPX* y *TcMPX* en el vector de expresión pET28c.

Con el fin de subclonar estos genes en el vector pET28c, se realizó una digestión doble de ADN plasmídico (*TcCPX*-pGEM-T, *TcMPX*-pGEM-T y pET28c) con las

endonucleasas de restricción *NdeI* (Invitrogen) y *XhoI* (Roche)<sup>5</sup> ya que las dos enzimas son 100% activas en el mismo buffer de reacción según los protocolos de las empresas que comercializan estas enzimas.

La digestión doble se realizó utilizando entre 1 y 2 unidades de enzima por microgramo de ADN en un volumen total de 20  $\mu$ L, y se incubó 2 hs. a 37°C. El volumen total de la digestión de los plásmidos CPX/ pGEM-T y MPX/pGEM-T y del plásmido pET28c se cargó en un gel de agarosa 1% (**figura 25**), donde se confirmó la presencia del inserto en los plásmidos, y las bandas correspondientes a los insertos de interés y al plásmido en su conformación lineal (5367bp) fueron purificadas para luego ligar los genes de CPX y MPX al vector de expresión pET28c.



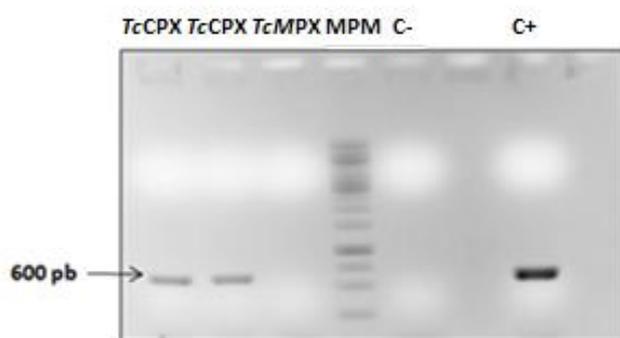
**Figura 25.** Digestión doble de los plásmidos *TcCPX*- pGEM-T y *TcMPX*-pGEM-T y del plásmido pET28c con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Carriles: MPX: producto de digestión del plásmido *TcMPX*-pGEM-T. pET28c: producto de digestión del plásmido pET28c. CPX: producto de digestión del plásmido *TcCPX*-pGEM-T .  
**MPM:** *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use.*

Luego de la reacción de ligación entre los genes de *TcCPX* y *TcMPX* y vector de expresión pET28c, se procedió a electroporar cepas de *E. coli* DH5- $\alpha$  electrocompetentes con los productos de ligación con el fin de propagar el plásmido y poder aislarlo en altas concentraciones. Se examinó por “*colony*” PCR la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas. En este paso del procedimiento de subclonado de los genes se obtuvieron resultados negativos, esto es, no se

<sup>5</sup>En la amplificación por PCR con la enzima Phusion® los cebadores forward agregaban un sitio de restricción para *NdeI* y los cebadores reverse agregaban un sitio de restricción para la enzima *XhoI*, para luego poder clonar los genes de forma direccional en el vector de expresión pET28c.

obtenían colonias que contuvieran el plásmido pET28c con los insertos de interés. Por este motivo se modificaron por un lado, las condiciones de reacción de ligación modificando la relación vector: inserto (1:3, 1:2 o 1:1), se cambió la enzima (se utilizó la T4 ADN ligasa de ThermoFisher Scientific y la T4 ADN ligasa de Promega), se varió el volumen, el tiempo de incubación y la temperatura de reacción (1h a temperatura ambiente o 16 hs. a 4 °C). Se prepararon células de *E. coli* DH5- $\alpha$  electrocompetentes repetidas veces para descartar la falta de competencia de las mismas. También se defosforiló el vector pET28c con la enzima fosfatasa antártica (Biolabs), para impedir de esta manera una posible recircularización del vector que puede ocurrir tras una ligación.

Luego de tratar al vector con fosfatasa antártica y realizar la ligación de este a los insertos de *TcCPX* y *TcMPX* en una relación vector: inserto 1: 2, utilizando 3 U de la enzima T4 ADN ligasa de Promega, e incubando la reacción por 16 hs. a 4 °C se transformaron 40  $\mu$ L de células de *E. coli* DH5- $\alpha$  electrocompetentes con 6  $\mu$ L de cada ligación. Se examinó por “*colony*” PCR la presencia del inserto de interés en las colonias transformadas. Se analizaron dos colonias transformadas con la ligación *TcCPX*-pET28c y una colonia de *TcMPX*-pET28c. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1% utilizando el intercalante GoodView® (Figura 26).



**Figura 26.** “*Colony*” PCR de colonias transformadas con los productos de ligación *TcCPX*-pET28c y *TcMPX*-pET28c. C+: plásmido *TcCPX*-pQE-30. C-: Reacción sin ADN MPM: *Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use*.

En la **figura 26** se observa el inserto de *TcCPX* como una banda de 600 pares de bases por lo que las dos colonias transformadas presentaban el plásmido conteniendo el inserto de interés. A partir de estas se aisló el ADN plasmídico. En cambio no se obtuvieron colonias transformadas con el plásmido producto de la ligación *TcMPX*-pET28c. Con este resultado entonces, se pudo subclonar el gen para *TcCPX* en el vector de expresión pero quedó pendiente en su momento chequear la expresión de la proteína a partir de esta construcción. Este análisis se hizo luego en el laboratorio por otra persona donde se vio efectivamente la expresión de *TcCPX* en células de *E.coli* BL21 (DE3).

## 5. Discusión

---

### 5.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbTXNPx*.

Existen numerosos sistemas de expresión en *E. coli* que permiten obtener importantes niveles de expresión de proteína recombinante a partir del gen de interés. En el laboratorio se contaba con los genes codificantes para las proteínas PrxI y PrxII humanas, *FhePrx* del parásito helminto *F.hepatica*, AhpC de la bacteria *M. tuberculosis*, y para la proteína TXNPx de *T. brucei*, todos estos clonados en vectores de expresión pQE-30 de QIAGEN, el cual permite obtener proteínas recombinantes fusionadas a una cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal, permitiendo la purificación mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC).

Se logró expresar y purificar de esta manera a tres de las proteínas que se encontraban clonadas, esto es, a las *hPrxI* y *hPrxII*, y a la proteína *FhePrx* obteniéndolas de forma soluble tras la inducción con 0,5 mM de IPTG, por 4 horas a 37 °C en agitación constante, en cepas de *E. coli* M15 (**figuras 15, 16 y 17**). La purificación de estas proteínas mediante cromatografía de afinidad fue altamente exitosa, ya que se logró obtenerlas de forma prácticamente pura y en alta cantidad. Igualmente no se descartan evaluar otras técnicas de purificación con las que se pueda ver incrementado el estado de pureza, como por ejemplo cromatografía de

intercambio iónico y exclusión molecular. La electroforesis en geles SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, al hervir las soluciones proteicas y sin hervir, muestran que las Prxs obtenidas presentan un perfil electroforético similar, si no idéntico, al perfil de otras Prxs pertenecientes a la subfamilia de las 2-Cys Prxs. En estas se vio una banda de peso molecular en el entorno de los 23 kDa. correspondiente a la forma monomérica que estas adoptan en presencia del agente reductor DTT, y en ausencia de este se vio una banda predominante de mayor peso molecular correspondiente a la forma dimérica de estas proteínas, producida por la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre los residuos de cisteína reactivos. Además, estos enlaces parecen ser muy estables ya que aún en presencia del reductor, se pueden ver byas correspondientes al dímero. En cuanto al efecto de las altas temperaturas sobre las proteínas, se pudo observar que en las muestras hervidas se favoreció la formación del monómero en comparación con las muestras no hervidas.

Las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* no lograron ser expresadas. Cuando se desea obtener una proteína en un sistema heterólogo, la expresión proteica no siempre se observa claramente mediante electroforesis SDS-PAGE con tinción con colorante brillante de Coomassie. Por este motivo se recurre a veces a técnicas más sensibles como electroforesis SDS-PAGE con tinción con plata o *Western blot*. Si de todas formas la expresión no logra ser observada, una de las cuestiones importantes para comprobar son las condiciones del vector y el correcto posicionamiento del marco de lectura para la expresión. En cuanto a las variables a tener en cuenta para la producción exitosa de proteínas recombinantes existen muchas, entre estas se encuentran la eficiencia transcripcional y traduccional, la estabilidad del vector de expresión y de los transcritos, la estabilidad de las proteínas frente al metabolismo del hospedero, además de la localización y el plegamiento. Muchos estudios muestran que la expresión puede incrementarse al cambiar de una cepa hospedera a otra, al igual que al variar otros parámetros como lo son el medio de cultivo y las condiciones de este, como la temperatura y tiempo de incubación. Para las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* se varió la temperatura, la concentración de inductor y el tiempo de incubación luego de la inducción, pero no se observó en ningún caso una sobreexpresión clara de estas proteínas mediante el análisis en

electroforesis SDS-PAGE. Se podría probar en primer lugar una estrategia sencilla como cambiar el medio de cultivo LB por un medio enriquecido como lo es el Terrific Broth (TB), ya que la composición del medio a la hora de la inducción puede tener un efecto significativo en la expresión de la proteína de interés. Esto se debe en parte a que la sobre-expresión proteica produce una carga metabólica adicional en la cepa hospedera, generando una respuesta de estrés poco favorable para producir la proteína recombinante. Por otro lado, las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* ya han sido exitosamente clonadas y expresadas en otros trabajos publicados (Alphey, König y Fairlamb, 2008; Guimarães *et al.*, 2005; Tetaud *et al.*, 2001), los cuales utilizan las cepas BL21 D3 o sus variantes como BL21Codon Plus y pLysS con el sistema de expresión pET de Novagen. Por lo tanto cambiar de vector y de cepa de expresión podría ser otra alternativa a probar.

## 5.2 Ensayos de actividad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* por parte de las proteínas recombinantes.

Las Prxs son enzimas que presentan una amplia especificidad de sustrato, reduciendo tanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como alquilhidroperóxidos y peroxinitritos. En este trabajo se estudió la actividad de consumo del sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante el método colorimétrico de ferritocianato por parte de las proteínas recombinantes obtenidas y de las proteínas *TcCPX*, *TcMPX* y el mutante *TcCPXC52S* que fueron expresadas y purificadas de forma similar en otro trabajo. De todas formas existen otros ensayos que son utilizados comúnmente para caracterizar a las Prxs, como por ejemplo: el ensayo de actividad peroxidasa dependiente de triparredoxina/tiorredoxina y el de competencia con la peroxidasa de rábano (HRP). En el ensayo de competencia con HRP, esta proteína reacciona con el peróxido para formar el compuesto I donde su formación puede ser medida espectrofotométricamente a 403 nm. En este se evalúa la capacidad de la Prx por competir con la HRP lo que disminuye la formación del compuesto I (Nelson y Parsonage, 2011). El ensayo dependiente de triparredoxina/tiorredoxina donde se sigue la oxidación de NADPH a 340 nm en presencia de todos los componentes del sistema antioxidante no pudo realizarse ya que no se contaba con todas las enzimas necesarias para el mismo. Para las proteínas pertenecientes a tripanosomátidos este sistema hubiera sido: NADPH, tripanotión reductasa, tripanotión, triparredoxina y la triparredoxina peroxidasa. Para

las Prxs humanas y de *F. hepatica* el sistema debería contener: NADPH, tiorredoxina reductasa, tiorredoxina y la Prx. Primero se mezclan todos los componentes del sistema y se agrega el peróxido por último, y si la Prx es activa se debería oxidar el NADPH viéndose una disminución en la absorbancia a 340nm (Nelson y Parsonage, 2011; Piñeyro *et al.*, 2011). En este trabajo se utilizó el método colorimétrico del ferritocianato, ya que es más sencillo y permite determinar si las proteínas obtenidas presentan actividad de consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo que daría una idea sobre la actividad peroxidasa por parte de estas.

Mediante el método de ferritocianato se determinó en un primer ensayo que todas las enzimas analizadas lograron ser activas, ya que lograron consumir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este consumo fue dependiente de tiorredoxina y dependiente de la concentración de proteína, excepto para el mutante *TcCPXC52S* que no presentó actividad. Como se menciona en otro apartado esta proteína es un mutante de *TcCPX* en donde el residuo de cisteína 52 se encuentra sustituido por una serina. El hecho de que haya sido incapaz de catalizar la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en presencia como en ausencia de DTT indica la importancia del residuo mutado para la catálisis. Este resultado concuerda con trabajos anteriores publicados donde se construyó y caracterizó este mutante (Piñeyro *et al.*, 2011). Las *hPrxI* y *hPrxII* mostraron un comportamiento similar entre sí donde a concentraciones de 1 µM de proteína no se observó consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el máximo se observó a 5 µM y luego disminuyó con 10 µM de proteína. Las peroxirredoxinas *TcCPX*, *TcMPX* y *FhePrx* mostraron un mayor consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1 µM de proteína donde luego fue disminuyendo a medida que la concentración proteica aumentaba. Este comportamiento es contrario a los resultados obtenidos en otros trabajos donde utilizan el mismo ensayo colorimétrico para medir el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de Prxs de distintas especies, donde se obtiene que a mayor concentración proteica el consumo aumenta (Harder *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2011). En estos trabajos se utiliza una concentración proteica en el rango de 20 a 100 µg/ml, mientras que en nuestro trabajo se utilizaron concentraciones bastante mayores. Las diferencias encontradas con esos resultados podría deberse a que cuando la proteína está más concentrada esta se puede agregar, perdiendo la capacidad de remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pasando a tener otro tipo de actividad como la actividad chaperona.

Una vez sabido que las proteínas recombinantes eran activas y dependientes de tiol, se estudió la actividad de consumo de peróxido a distintas concentraciones de sustrato. Se utilizó para esto una concentración fija de proteína de 5  $\mu\text{M}$  la que se incubó con DTT por 30 min. Otra vez se observaron similitudes entre las *hPrx I* y *hPrxII*, y entre *TcCPX*, *TcMPX* y *FhePrx*. En estas tres últimas proteínas se obtuvo que cuanto mayor fue la concentración del sustrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  añadida a la reacción mayor fue el consumo de este, alcanzándose valores máximos al agregar 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  donde se consumió el 80 % o más. En cambio para las Prxs humanas, el comportamiento fue diferente, ya que se alcanzaron porcentajes de consumo cercanos al 80 % a concentraciones de sustrato intermedias, (40 y 60  $\mu\text{M}$  para *hPrxI* y 60  $\mu\text{M}$  para *hPrxII*), pero a concentraciones mayores, 80 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la capacidad de consumo de estas proteínas disminuyó. Este hecho podría estar relacionado a la inactivación que pueden sufrir estas enzimas a altas concentraciones de peróxido, debido a un exceso de oxidación del tiol activo a ácido sulfinico. Para corroborar esta hipótesis harían falta otros estudios que puedan comprobar dicha oxidación, como por ejemplo hacer un análisis por *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra ácido sulfinico ( $\text{SO}_2\text{H}$ ) que permita confirmar la presencia de cisteínas oxidadas. Existen muchos estudios acerca de la inactivación de las 2-Cys Prxs de mamíferos tras la hiperoxidación, mostrando que dentro de este grupo, las proteínas *hPrxI* y *hPrxII* son altamente susceptibles a la pérdida de actividad por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que se atribuye a los distintos roles que cumplen en el interior celular como actividad chaperona y mediadoras en cascadas de señalización intracelular, siendo la *hPrxI* la más susceptible a dichos cambios como se menciona en la introducción (Lee et al., 2007).

Las TXNPxs de *T. cruzi* catalizan la reducción de diferentes peróxidos, y para regenerarse utilizan a la triparredoxina que les transfiere los equivalentes de reducción desde el tripanotión en combinación con la triparredoxina reductasa y NADPH con el fin de mantener el estado redox dentro del parásito (Piacenza *et al.*, 2013; Piñeyro *et al.*, 2011). Este sistema dependiente de tripanotión es único de tripanosomátidos, mientras que para las proteínas *hPrx I* y *hPrxII* y *FhePrx* el sistema de mantención del estado redox del que forman parte es distinto, donde los componentes principales son la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa utilizando electrones provenientes de NADPH

(Lowther y Haynes, 2011; Sekiya *et al.*, 2006). Luego de evaluar el consumo de  $H_2O_2$  por parte de las proteínas recombinantes tras incubarlas previamente con la proteína *TcTXN1*, ninguna presentó actividad enzimática en estas condiciones ni siquiera la proteína *TcCPX* la que se conoce que es sustrato de la *TcTXN1*. Para las demás proteínas recombinantes el resultado no sería sorprendente ya que no son sustratos específicos. Seguramente la falta de actividad por parte de la *TcTXN1* fue debida a una degradación parcial de la proteína que se corroboró luego mediante electroforesis SDS-PAGE. Este ensayo habría que repetirlo entonces utilizando *TcTXN1* fresca para ver si los resultados que se obtienen son similares.

### 5.3 Clonado direccional de los genes codificantes para las triparredoxina peroxidasa *TdMPX* y *TcCPX* en el vector de expresión pET28c.

Como punto de partida se contaba con los genes codificantes para las Prxs *TcCPX* y *TdMPX* clonados en el vector pQE-30. Como se explicó este es un vector de expresión que permite obtener proteínas recombinantes fusionadas a una cola de seis residuos de histidina en el extremo N-terminal (proteína de fusión) permitiendo la purificación mediante cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado (IMAC). Sin embargo el vector pQE-30 no posee un sitio de corte para la cola de histidina. Por lo que se propuso cambiar este vector por el pET28c, que a diferencia del pQE-30, le confiere a las proteínas expresadas una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal seguido de un sitio de corte para la proteasa trombina (la que elimina el tag de la secuencia proteica). En otros estudios se ha visto que tanto la función como las propiedades de oligomerización de ciertas Prxs varían dependiendo de si la cola de seis histidinas se encuentra presente o no (Cao, Bhella y Lindsay, 2007; König *et al.*, 2013), motivo por el cual se quiere estudiar este hecho en las *TcCPX* y *TdMPX*.

Para este fin se amplificaron los genes de *TcCPX* y *TdMPX* mediante PCR con una enzima que presenta alta fidelidad, con cebadores específicos que añadían sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. Los productos fueron clonados en primer lugar en el vector de clonado pGEM-T easy y a partir de este se procedió con el subclonado de forma direccional en el vector de expresión pET28c. Esto fue logrado únicamente para el gen de *TcCPX* ya que se confirmó una ligación exitosa mediante “*colony*” PCR de cepas DH5- $\alpha$  transformadas con el plásmido producto de ligación *TcCPX*-pET28c. En

cambio el gen de *TcMPX* no pudo ser clonado bajo las mismas condiciones de ligación. La eficiencia de la transformación fue muy baja ya que se obtuvo solo una colonia de cepas DH5- $\alpha$  transformadas con el producto de ligación *TcMPX*-pET28c donde tras ser analizada por “*colony*” PCR no se observó presencia del inserto (**figura 26**). Este resultado no fue debido a una falta de competencia por parte de las células ya que esta se corroboró mediante la transformación con un control positivo con un plásmido cerrado. Seguramente fue la reacción de ligación que no funcionó. Dado que se utilizó la misma ligasa que para la ligación *TcCPX*-pET28c que si funcionó, se descarta que la enzima estuviera inactiva o que los componentes necesarios del buffer de reacción como ATP estuvieran degradados. La relación inserto: vector utilizada fue de 2: 1 por lo que el problema podría ser que esta relación no fue la adecuada. Habría que repetir la ligación con las mismas condiciones pero utilizando una relación inserto: vector 3: 1 o mayor. Otra estrategia que se podría probar para incrementar la cantidad de colonias obtenidas sería purificar el ADN luego de la ligación y previo a la transformación de las bacterias, con el fin de remover el buffer de reacción que contiene sales y otros elementos que interfieren en el proceso de electroporación.

Por lo tanto, se logró realizar uno de los clonados, donde se obtuvo el plásmido *TcCPX*-pET28c que en el momento quedó pendiente chequear la expresión de la proteína a partir de esta construcción. Este análisis se hizo en el laboratorio tiempo después donde se vio efectivamente la expresión de *TcCPX* en células de *E.coli* BL21 (DE3).

## 6. Conclusiones

---

### 6.1 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII*, *FhePrx*, *MtAhpC* y *TbXNPx*.

- Las proteínas *hPrxI* y *hPrxII* y *FhePrx* se obtuvieron de forma recombinante fusionadas a una cola de seis residuos de histidina, a partir de su expresión en células de *E. coli* M15, y se purificaron por

cromatografía de afinidad lo que permitió obtenerlas de forma soluble con un alto nivel pureza y en gran cantidad.

- La expresión recombinante de las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* no se logró en el sistema utilizado, ya que no se detectó la presencia de estas mediante electroforesis SDS-PAGE.

## 6.2 Ensayos de actividad de consumo de $H_2O_2$ *in vitro* por parte de las proteínas recombinantes.

- Las proteínas recombinantes *hPrxI* y *hPrxII* y *FhePrx* mostraron ser activas tras observarse consumo de  $H_2O_2$  *in vitro*. Esta actividad fue dependiente de tior, de la concentración proteica y de la concentración de sustrato añadida a la reacción.

## 6.3 Clonado direccional de los genes codificantes para las proteínas *TcMPX* y *TcCPX* en el vector de expresión pET28c.

- Se logró realizar el clonado de forma direccional del gen codificante para *TcCPX* en el vector de expresión pET28c. Contrariamente, el gen codificante para *TcMPX* no logró ser clonado.

# 7. Perspectivas

---

Durante el desarrollo de este trabajo hubo ciertos objetivos que no fueron logrados. Como perspectivas futuras, queda por conseguir:

1. La obtención recombinante de las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx*. Como no se logró expresarlas variando tanto la temperatura como la concentración de inductor y el tiempo de incubación luego de la inducción, habría que probar otras estrategias. En primer lugar se podría cambiar el medio de cultivo LB por otro medio como TB que es un medio enriquecido, o se podría suplementar directamente el medio LB. Este procedimiento simple se conoce que ha resultado en una producción exitosa de proteínas en muchos otros casos. En las últimas décadas ha habido un gran avance

en cuanto a la tecnología existente para la producción de proteínas recombinantes. Se han desarrollado distintas cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para solucionar problemas encontrados a la hora de la producción proteica. Las proteínas *MtAhpC* y *TbTXNPx* no requieren de modificaciones postraduccionales y no tienen pesos moleculares muy altos que generalmente son los inconvenientes que existen a la hora de producir otras proteínas, sobre todo las eucariotas. Por esta razón no sería necesario cambiar de *E. coli* a otro sistema como células de insecto, mamífero o levaduras, pero si se podría cambiar de vector de expresión y de cepa por ejemplo al sistema BL21(DE3) de Invitrogen que carece de las proteasas *lon* y *ompT* lo que reduce la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en estas células.

2. Determinar si la disminución de consumo de  $H_2O_2$  que se observó en las *hPrxI* y *hPrxII* a concentraciones de 80 y 100  $\mu M$  de  $H_2O_2$  es debida a la inactivación que pueden sufrir estas proteínas debido al fenómeno de hiperoxidación de la  $C_P$ . Este hecho pensamos corroborarlo mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico contra ácido sulfínico ( $SO_2H$ ) que permita confirmar la presencia de cisteínas oxidadas.
3. Repetir el ensayo de consumo de  $H_2O_2$  por parte de las Prxs en presencia de la proteína *TcTXN1*, utilizando *TcTXN1* fresca ya que la que se utilizó en este trabajo se vio que estaba degradada al hacer una electroforesis SDS-PAGE.
4. Queda pendiente también lograr el clonado direccional del gen codificante para *TcMPX* en el vector de expresión pET28c, que como se explicó anteriormente habría que repetir la ligación utilizando una relación vector: inserto adecuada con el fin de obtener más colonias que puedan contener la construcción *TcMPX*-pET28c ya que cuando realizamos la ligación solo se obtuvo una única colonia para analizar.
5. Con la construcción que sí se logró obtener *TcCPX*-pET28c quedó pendiente chequear la expresión de la proteína, y si esta se expresa de forma soluble. Este ensayo se realizó tiempo después en el laboratorio donde la expresión fue exitosa. Luego de expresada la proteína de forma soluble se pretende purificarla por cromatografía de afinidad con un metal

inmovilizado (IMAC) y luego quitarle la cola de seis histidinas de la región N-terminal utilizando la proteasa trombina, con el fin de realizar ensayos funcionales y estructurales de *TcCPX*.

## 8. Referencias bibliográficas

---

- Alphey, M., König, J. y Fairlamb, A. (2008). Structural y mechanistic insights into type II trypanosomatid tryparedoxin-dependent peroxidases. *Biochem. J.*, 414(3), pp.375-381.
- Alpfmedical.info. (2016). *Retroreduction of typical 2cys peroxiredoxins - hydrogen peroxide*. [online] Available at: <http://www.alpfmedical.info/hydrogen-peroxide/retroreduction-of-typical-2cys-peroxiredoxins.html> [Accessed 19 May 2016].
- Barcelona, I. (2016). *InfoChagas - COALICIÓN CHAGAS*. [online] Available at: <http://www.infochagas.org/> [Accessed 18 May 2016].
- Barrett, J. (1980). Peroxide metabolism in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology*, 66(4), p.697.
- Biteau, B., Labarre, J. y Toledano, M. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, 425(6961), pp.980-984.
- Cao, Z., Bhella, D. y Lindsay, J. (2007). Reconstitution of the mitochondrial PrxIII antioxidant defense pathway: general properties and factors affecting PrxIII activity and oligomeric state. *Journal of Molecular Biology*, 372(4), pp.1022-1033.
- Castro, H. y Tomás, A. (2008). Peroxidases of Trypanosomatids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), pp.1593-1606.
- Chae, H., Robison, K., Poole, L., Church, G., Storz, G. y Rhee, S. (1994). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), pp.7017-7021.
- Cox, A., Peskin, A., Paton, L., Winterbourn, C. y Hampton, M. (2009). Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. *Biochemistry*, 48(27), pp.6495-6501.
- Cox, A., Pearson, A., Pullar, J., Jönsson, T., Lowther, W., Winterbourn, C. y Hampton, M. (2009). Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem. J.*, 421(1), pp.51-58.
- Cox, A., Winterbourn, C. y Hampton, M. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.*, 425(2), pp.313-325.
- Donnelly, S., O'Neill, S., Sekiya, M., Mulcahy, G. y Dalton, J. (2004). Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*, 73(1), pp.166-173.

- Flohé, L. y Harris, J. (2007). *Subcellular biochemistry*. New York: Springer.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W., Bower, K., Howson, R., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. y Weissman, J. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), pp.737-741.
- Guimarães, B., Souchon, H., Honoré, N., Saint-Joanis, B., Brosch, R., Shepard, W., Cole, S. y Alzari, P. (2005). Structure and mechanism of the alkyl hydroperoxidase AhpC, a key element of the mycobacterium tuberculosis defense system against oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(27), pp.25735-25742.
- Hall, A., Karplus, P. y Poole, L. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(9), pp.2469-2477.
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L. y Karplus, P. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3), pp.795-815.
- Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. y Karplus, P. (2010). Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. *Journal of Molecular Biology*, 402(1), pp.194-209.
- Harder, S., Bente, M., Isermann, K. y Bruchhaus, I. (2006). Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryotic Cell*, 5(5), pp.861-870.
- Herrera, B. (2001). Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor beta in fetal hepatocytes. *The FASEB Journal*, 15(3), pp.741-751.
- Hillas, P. (2000). The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), pp.18801-18809.
- Hofmann, B., Hecht, H. y Flohé, L. (2002). Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*, 383(3-4).
- Ishii, T., Warabi, E. y Yanagawa, T. (2012). Physiological relevance of antioxidant/redox genes; learning from genetically modified animals guest editor: Junichi Fujii novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer y innate immunity. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 50(2), pp.91-105.
- Jang, H., Lee, K., Chi, Y., Jung, B., Park, S., Park, J., Lee, J., Lee, S., Moon, J., Yun, J., Choi, Y., Kim, W., Kang, J., Cheong, G., Yun, D., Rhee, S., Cho, M. y Lee, S. (2004). Two enzymes in one. *Cell*, 117(5), pp.625-635.
- JIANG, Q., YAN, Y., HU, G. y ZHANG, Y. (2005). Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from phanerochaete chrysosporium. *Cellular & molecular biology letters*, 10(4), pp.659 – 668.
- Karplus, P. (2015). A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radical Biology y Medicine*, 80, pp.183-190.

- König, J., Galliardt, H., Jütte, P., Schaper, S., Dittmann, L. y Dietz, K. (2013). The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *Journal of Experimental Botany*, 64(11), pp.3483-3497.
- Lee, W., Choi, K., Riddell, J., Ip, C., Ghosh, D., Park, J. y Park, Y. (2007). Human peroxiredoxin 1 y 2 are not duplicate proteins: the unique presence of Cys83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 y Prx2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), pp.22011-22022.
- Leyens, G., Donnay, I. y Knoops, B. (2003). Cloning of bovine peroxiredoxins—gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. *Comparative Biochemistry y Physiology Part B: Biochemistry y Molecular Biology*, 136(4), pp.943-955.
- Loew, O. (1900). A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science*, 11(279), pp.701-702.
- Lowther, W. y Haynes, A. (2011). Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(1), pp.99-109.
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M. y Denicola, A. (2009). The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of Biochemistry y Biophysics*, 484(2), pp.146-154.
- Manual: pGEM®-T y pGEM®-T easy Vector Systems, June 2015, Promega.
- Manual: QIAexpressionist™, A handbook for high level expression and purification of 6x His-tagged proteins, 5th Edition, June 2003, QIAGEN.
- Manual: XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells, 2004, Stratagene
- Mills, G. (1957). Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, 229(1), pp.189-197.
- Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A., Pace, P., O'Reilly, R., Hampton, M., Radom, L. y Winterbourn, C. (2011). Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 y 3 with hydrogen peroxide: a kinetic y computational study. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), pp.18048-18055.
- Nelson, K. y Parsonage, D. (2011). Measurement of peroxiredoxin activity. *Current Protocols in Toxicology*.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D., Soares Netto, L. y Augusto, O. (2007). Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radical Biology y Medicine*, 42(3), pp.326-334.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Accessed 18 May 2016].
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *La trypanosomiasis africana (enfermedad del sueño)*. [online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/es/> [Accessed 18 May 2016].

- Pedone, E., Limauro, D., D'Ambrosio, K., De Simone, G. y Bartolucci, S. (2010). Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(22), pp.3797-3814.
- Perkins, A., Nelson, K., Parsonage, D., Poole, L. y Karplus, P. (2015). Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), pp.435-445.
- Perkins, A., Poole, L. y Karplus, P. (2014). Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles. *Biochemistry*, 53(49), pp.7693-7705.
- Peskin, A., Low, F., Paton, L., Maghzal, G., Hampton, M. y Winterbourn, C. (2007). The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), pp.11885-11892.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M., Martínez, A. y Radi, R. (2013). Trypanosoma cruzi Antioxidant Enzymes As Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7), pp.723-734.
- Piñeyro, M., Arcari, T., Robello, C., Radi, R. y Trujillo, M. (2011). Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: High efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Archives of Biochemistry y Biophysics*, 507(2), pp.287-295.
- Piñeyro, M., Parodi-Talice, A., Arcari, T. y Robello, C. (2008). Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?. *Gene*, 408(1-2), pp.45-50.
- Pineyro, M., Pizarro, J., Lema, F., Pritsch, O., Cayota, A., Bentley, G. y Robello, C. (2005). Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Structural Biology*, 150(1), pp.11-22.
- Poole, L., Reynolds, C., Wood, Z., Karplus, P., Ellis, H. y Li Calzi, M. (2000). AhpF y other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267(20), pp.6126-6133.
- Rhee, S. (2016). Overview on peroxiredoxin. *Molecules y Cells*, 39(1), pp.1-5.
- Rhee, S. y Woo, H. (2011). Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and protein chaperones. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(3), pp.781-794.
- Rhee, S., Woo, H., Kil, I. y Bae, S. (2011). Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), pp.4403-4410.
- San-Miguel, A. y Martin-Gil, F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), pp.106-113.
- Sekiya, M., Mulcahy, G., Irwin, J., Stack, C., Donnelly, S., Xu, W., Collins, P. y Dalton, J. (2006). Biochemical characterisation of the recombinant peroxiredoxin (FhePrx) of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *FEBS Letters*, 580(21), pp.5016-5022.

- Shi, G., Yu, Q., Shi, L. y Zhang, Z. (2012). Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin 4 involved in protection against oxidative stress in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 21(6), pp.581-592.
- Soito, L., Williamson, C., Knutson, S., Fetrow, J., Poole, L. y Nelson, K. (2010). PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), pp.D332-D337.
- Sun, J., Liu, X. and Li, Q. (2010). Molecular cloning, expression and antioxidant activity of a peroxiredoxin 2 homologue from *Lampetra japonica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5-6), pp.795-801.
- Tetaud, E., Giroud, C., Prescott, A., Parkin, D., Baltz, D., Biteau, N., Baltz, T. y Fairlamb, A. (2001). Molecular characterisation of mitochondrial and cytosolic trypanothione-dependent tryparedoxin peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *Molecular y Biochemical Parasitology*, 116(2), pp.171-183.
- Ursini, F., Maiorino, M. y Forman, H. (2016). Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living. *Redox Biology*, 8, pp.205-215.
- Winterbourn, C. y Hampton, M. (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology y Medicine*, 45(5), pp.549-561.
- Wood, Z., Poole, L., Hantgan, R. y Karplus, P. (2002). Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-Cysteine peroxiredoxins † , ‡. *Biochemistry*, 41(17), pp.5493-5504.
- Wood, Z., Schröder, E., Robin Harris, J. y Poole, L. (2003). Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(1), pp.32-40.
- Yan, S., Chen, S., Li, Z., Wang, H., Huang, T., Wang, X. y Wang, J. (2012). Biochemical characterization of human peroxiredoxin 2, an antioxidative protein. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44(9), pp.759-764.
- Yu, F., Kang, M., Meng, F., Guo, X. y Xu, B. (2011). Molecular cloning and characterization of a thioredoxin peroxidase gene from *Apis cerana cerana*. *Insect Molecular Biology*, 20(3), pp.367-378.
- Zavala Castro, J. (2005). *Manual de técnicas básicas de biología molecular*. Mérida, Yuc.: Universidad Autónoma de Yucatán, Dirección General de Desarrollo Académico, Coordinación General de Extensión, Departamento Editorial.