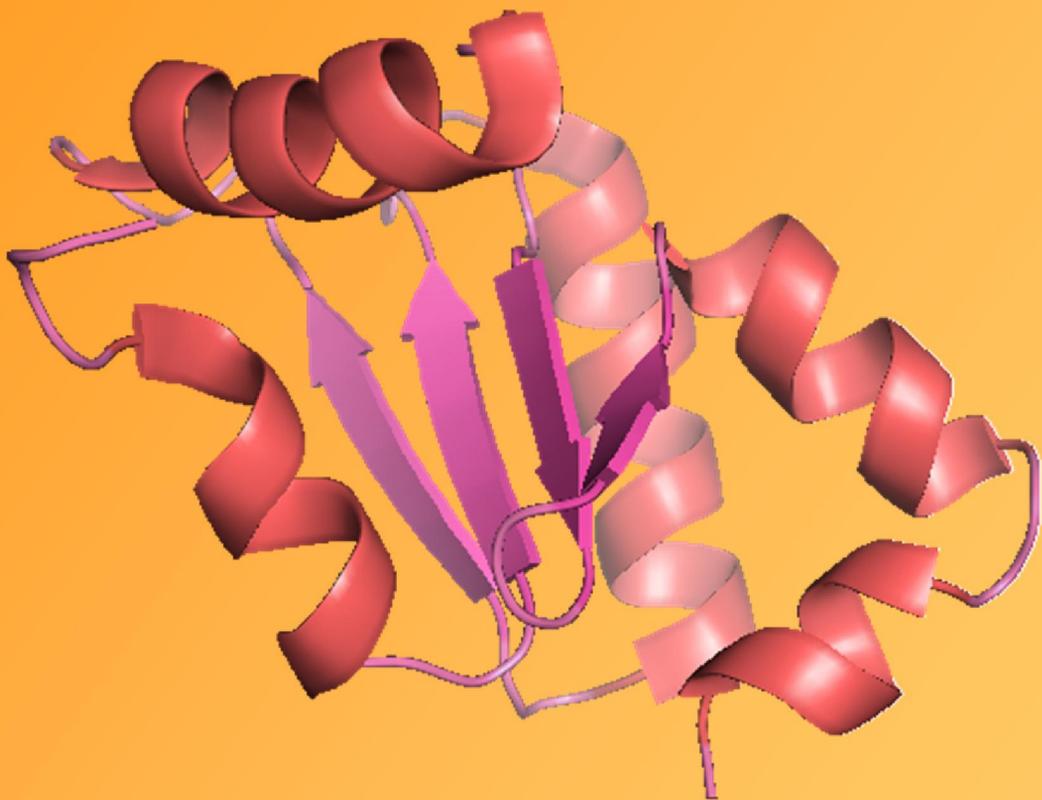


**Determinación de propiedades
del sitio activo como indicadores
de relación estructura-función
en Glutarredoxinas de clase I y II
de *Trypanosoma brucei***



Camila Sagasti

Tutor: Gerardo Ferrer

**LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA
BIOLÓGICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
Julio - 2016**

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor, Gerardo, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesina en el laboratorio, por su dedicación, enseñanzas y consejos.

A los integrantes del Laboratorio de Fisicoquímica Biológica y Enzimología, por haberme dado un lugar en el laboratorio, y por la ayuda de todos los días. En particular quiero agradecer a Karin por haberme ayudado con la expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Gracias a mis amigos de facultad, que estuvieron en los momentos lindos y no tan lindos. Haber transcurrido este camino juntos fue una experiencia increíble.

Por último, agradezco a mi familia, que siempre me apoyó para que siguiera adelante y cumpliera mis metas.

Resumen

Las glutarredoxinas (Grx) son tiol-disulfuro oxidorreductasas con dominio tiorredoxina y sitio activo de secuencia CXXC/S; están ampliamente distribuidas en todos los organismos. Estas proteínas son reducidas por el glutatión (GSH), y son capaces de reducir disulfuros proteicos mediante un mecanismo ditiólico, y disulfuros mixtos entre glutatión y proteínas mediante un mecanismo monotiólico. De esta manera cumplen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis celular. Recientemente se ha atribuido a algunas Grxs la función no-redox de coordinar centros ferro-sulfurados formando dímeros catalíticamente inactivos. El *Trypanosoma brucei* es un parásito que causa la tripanosomiasis africana tanto en humanos como en animales, cuyo metabolismo redox no está basado en el GSH sino en el tripanotión (N^1 , N^8 - bisglutathionilperimidina, $T(SH)_2$). *T. brucei* tiene 5 glutarredoxinas, de las cuales 2 son de clase I (2CGrx1 y 2) y 3 son de clase II (1CGrx1, 2 y 3). Estructuralmente, las Grxs de clase II se distinguen de las de clase I por la inserción de 5 residuos precedentes al sitio activo que forman un *loop*, un motivo WP altamente conservado que participa en la unión del GSH, y el reemplazo de la cisteína reactiva que se encuentra en el sitio activo de las Grx de clase I por una serina, en las Grx de clase II.

En esta tesina se trabajó con una glutarredoxina de clase I (2CGrx1) y una de clase II (1CGrx1) de *T. brucei*. La 2CGrx1 es una glutarredoxina activa en reacciones de deglutathionilación que además participa en el ensamblado de centros ferro-sulfurados. La 1CGrx1 es una glutarredoxina fundamental en la biogénesis de centros ferro-sulfurados pero que carece de actividad tiol-disulfuro oxidorreductasa y es esencial para la vida del parásito. A partir del estudio de la 1CGrx1, 2CGrx1 y variantes de la misma se propuso la caracterización de propiedades del sitio activo: pKa y nucleofilia, con el objetivo de encontrar relaciones entre las diferencias funcionales y los motivos estructurales (C24, *loop* y motivo WP), que diferencian las glutarredoxinas de clase I con las de clase II.

Para la determinación del pKa de la cisteína reactiva (C21) se emplearon dos metodologías. Por una parte se siguió la variación en la fluorescencia del triptofano cercano a la misma, y por otra parte se utilizó la reactividad diferencial entre la forma tiol y tiolato en una reacción de alquilación con monobromobimano. Para la obtención de valores de nucleofilia se determinaron constantes de velocidad de segundo orden independientes del pH para la misma reacción de alquilación.

Se obtuvo un pKa de entre 5,1 y 5,4 para la cisteína 21, y se confirmó que es la cisteína reactiva a pH neutro. Se comprobó que la inserción del *loop*, y el reemplazo de la C24 por una serina provocan una disminución en la nucleofilia de la C21 de entre 20 y 30 veces. Estos motivos posiblemente contribuyan a que la 1CGrx1 no posea una cisteína nucleofílica. Por otra parte se evidenció la presencia de un mínimo de reactividad inespecífica a pHs cercanos al neutro que no se observa cuando la 2CGrx1 reacciona con GSSG (sustrato), y que podría estar desfavoreciendo la reacción de la Grx con electrófilos inespecíficos dentro de la célula.

Índice

1. Introducción	9
1.1. Glutarredoxinas	11
1.1.1. Glutación.....	11
1.1.2. Estructura	11
1.1.3. Clasificación.....	13
1.1.4. Funciones del sistema GR/GSH/Grx	15
1.2. <i>Trypanosoma brucei</i>	20
1.2.1. El sistema redox de los tripanosomátidos	20
1.2.2. Glutarredoxinas en <i>T. brucei</i>	21
1.3. Reactividad de Glutarredoxinas	24
1.3.1. Metodología para el estudio de nucleofilia y pKa de cisteínas proteicas	25
1.3.2. Bromobimanos y fluorescencia	26
1.4. Antecedentes	28
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo general.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. Metodología	35
3.1. Materiales de uso general.....	37
3.1.1. Proteínas	37
3.1.2. Medios de cultivo	38
3.1.3. Amortiguadores.....	39
3.1.4. Gel de poliacrilamida 15%.....	39
3.2. Procedimientos generales.....	39
3.2.1. Reducción de tioles con DTT	39
3.2.2. Oxidación de tioles con H ₂ O ₂	39
3.2.3. Cuantificación de tioles libres con DTDPy	40

3.3. Expresión y purificación de variantes de la <i>Tb2CGrx1</i>	40
3.4. Obtención del pKa de la cisteína reactiva por fluorescencia intrínseca	43
3.5. Determinación de constante de velocidad de la reacción entre el monobromobimano y cisteínas proteicas	44
3.5.1. Preparación de muestra para su análisis por espectrometría de masa	45
3.6. Dependencia de la velocidad inicial de la reacción entre el monobromobimano y cisteínas proteicas con el pH	45
3.6.1. Obtención de constantes de velocidad independientes del pH como indicador de nucleofilia	47
4. Resultados	49
4.1. Expresión y purificación de las variantes C21S, C78S, C24S y C21S/C24S de la 2CGrx1 de <i>T. brucei</i>	51
4.2. Determinación del pKa de la cisteína 21 por fluorescencia intrínseca	52
4.3. Reducción de tioles con DTT	58
4.4. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden de la reacción entre la cisteína 21 y monobromobimano	59
4.5. Determinación de la constante independiente del pH de la reacción entre la cisteína 21 y mBBr	65
5. Consideraciones finales	81

Índice de abreviaturas

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
DTDPy	2,2'-Ditiodipiridina
DTPA	Ácido etilentriamina pentacético
DTT	Ditiotreitol
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
Gsp	Glutathionil espermidina
GSSG	Glutación disulfuro
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
mBBr	Monobromobimano
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SDS	Dodecil sulfato de sodio
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
Sp	Espermidina
T(SH)₂	Tripanotión
TEVp	<i>Tobacco Etch Virus protease</i>
TMA	Tris-Mes-Ácido acético
TR	Tripanotión reductasa

TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Trx	Tiorredoxina
TS₂	Tripanotión disulfuro
TXN	Triparredoxina
URF	Unidades relativas de fluorescencia
WP	Triptofano - prolina
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación

1. Introducción

1.1. Glutarredoxinas

Las glutarredoxinas (Grx) son proteínas pequeñas (10-16 kDa) que poseen un plegamiento tiorredoxina y sitio activo de secuencia CXXC/S [1].

Fueron halladas por primera vez en 1955 en un extracto de hígado de vaca, y descritas como “transhidrogenasas”, tiol-disulfuro oxidorreductasas dependientes del glutatión (GSH) [2]. Sin embargo no fue hasta el año 1976 que Arne Holmgren y su grupo introdujeron el término glutarredoxina y la identificaron como una proteína de *Escherichia coli* capaz de transportar equivalentes de reducción a la ribonucleótido reductasa a expensas del GSH [3].

Actualmente se sabe que están ampliamente distribuidas en todos los organismos y la función que generalmente se les asocia es la de reducir disulfuros proteicos y específicamente disulfuros mixtos entre proteínas o compuestos de bajo peso molecular y el GSH (deglutinationilación). Participan en importantes funciones celulares como el mantenimiento de la homeostasis redox, la transducción de señales y la defensa contra el estrés oxidativo, entre otras [1]. Sin embargo, esta no es la única función conocida para las Grx, ni la más importante para muchas de ellas. Otras Grx son capaces de coordinar centros ferro-sulfurados, y cumplen un rol en el metabolismo del hierro [4, 5].

1.1.1 Glutatión

Las Grx funcionan a expensas del tripéptido glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) (Figura 1). Este se sintetiza a partir de tres aminoácidos: glutamato, glicina y cisteína, en dos pasos dependientes de ATP. La reacción comienza con la formación de un enlace peptídico entre el carboxilo γ del glutamato y la cisteína, reacción catalizada por la γ -glutamilcistein sintetasa. A continuación se da la condensación entre la γ -glutamilcisteina y una glicina, catalizada por la glutatión sintetasa. El GSH está presente en concentraciones milimolares en la célula y es un importante determinante del estado redox celular [6].

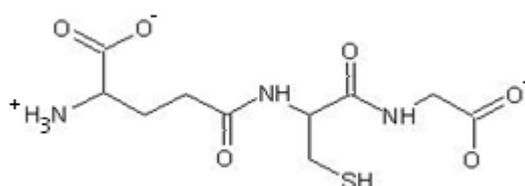


Figura 1: Molécula de glutatión

1.1.2. Estructura

Estructuralmente las Grx pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas (Trx). El plegamiento Trx está formado por una lámina central compuesta de cuatro hebras β rodeada por tres hélices α , con una topología muy conservada β 1- α 1- β 2- α 2- β 3- β 4- α 3 [7] (Figura 2).

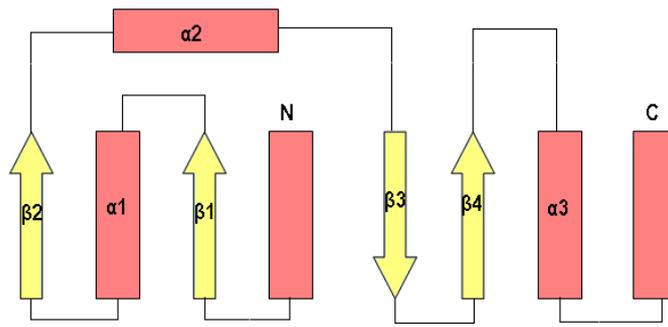


Figura 2: Esquema que muestra la estructura conservada de las Grx. Las hélices α se representan con rectángulos y las hebras β con flechas.

El sitio activo de las oxidorreductasas pertenecientes a la superfamilia Trx se localiza en el *loop* que conecta la hebra $\beta 1$ con la hélice $\alpha 1$, en el caso de las Grx el sitio activo tiene motivo consenso: CXXC/S [7].

De los tres residuos de prolina conservados en el plegamiento Trx, solo una se conserva en las Grx. La misma es una prolina en conformación *cis* ubicada en el *loop* que se conoce como "*cis-Pro loop*", y se encuentra anterior a la hebra $\beta 3$. Este residuo se encuentra cercano en el espacio al sitio activo y es importante para mantener tanto la conformación del sitio activo como el potencial redox de la proteína [7, 8].

La cisteína amino terminal del sitio activo es la cisteína reactiva y se encuentra expuesta al solvente con un pKa de 3 o más unidades por debajo del pKa de una cisteína libre. La cisteína carboxi terminal está enterrada en la molécula, incluida en la primera vuelta de la hélice $\alpha 1$ y su pKa es más alto (cisteína resolutive) [9, 10] (Figura 3).

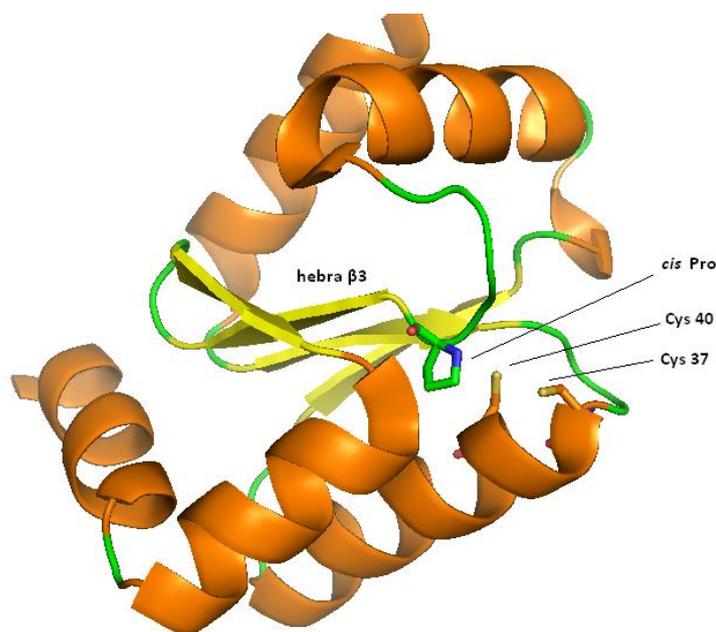


Figura 3: Estructura de la Grx2 humana. Se indica con flechas la posición de las cisteínas pertenecientes al sitio activo: Cys 37 (amino terminal) y Cys 40 (carboxi terminal), y la prolina en *cis* anterior a la hebra $\beta 3$. PDB ID: 2FLS

Lo que caracteriza y diferencia a las glutarredoxinas de otras tiol-disulfuro oxidorreductasas es su especificidad por disulfuros mixtos en los que participa el glutatión. Las glutarredoxinas poseen un surco hidrofóbico en su superficie, cercano al sitio activo, donde se encuentra el sitio de unión al glutatión. El GSH establece varias interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con residuos que se encuentran en este sitio. En particular dos de estos residuos se encuentran conservados en la mayoría de las glutarredoxinas. Estos son una lisina, cuyo grupo amino establece interacciones electrostáticas con el grupo α carboxilato de la glicina carboxi terminal del GSH, y un aspartato, cuyo grupo carboxilato establece interacciones electrostáticas con el grupo α amino del glutamato del GSH. Sumado a esto, el grupo α carboxilato del glutamato interacciona con el extremo positivo del dipolo de la hélice $\alpha 3$ de la Grx [11 - 13] (Figura 4).

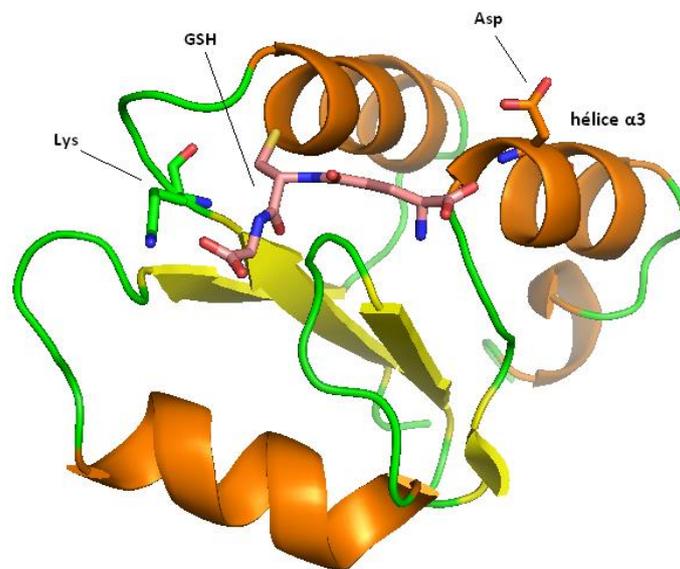


Figura 4: Estructura de la Grx3 de *E. coli* formando un complejo con el glutatión. En la figura se señalan los residuos y la hélice que se encuentran conservados en las Grx e interactúan con el GSH. PDB ID: 3GRX

1.1.3. Clasificación

La clasificación más simple para las Grx se basa en la secuencia del sitio activo y las divide en dos grupos, las Grx ditiólicas, con dos cisteínas en su sitio activo: CXXC, y las Grx monitiólicas con una cisteína en su sitio activo: CXXS.

Una segunda clasificación, más utilizada en la actualidad, se basa en relaciones filogenéticas entre las Grx y las clasifica en seis clases, de las cuales las primeras tres son las más importantes y van a ser descritas a continuación [1].

La clase I está integrada por Grx monitiólicas y ditiólicas, son monoméricas y de dominio único, con sitio activo de secuencia consenso C[G/P][F/Y][C/S]. Son activas en reacciones de deglutationilación y algunas de ellas coordinan centros ferro-sulfurados. Incluye las Grx1 y 2 humana, las Grx1 y 2 de *Saccharomyces cerevisiae* y las Grx1 a la 3 de *E. coli* entre otras [1].

Las Grx de clase II son exclusivamente monotiólicas y con sitio activo consenso C[G/P][M/F/Y][C/S], en eucariotas el 25% forman parte de proteínas multidominio. En los casos estudiados hasta el momento, las Grx de clase II no son activas en reacciones de deglutationilación pero aun así participan en procesos dependientes de GSH como la biogénesis de centros ferro-sulfurados. Incluye la Grx5 y 3 humana, la Grx4 de *E. coli*, las Grx3 y 4 de *S. cerevisiae* y las GrxS14, S15 y S17 de *Arabidopsis thaliana*.

Los miembros de estas dos clases se encuentran tanto en eucariotas como en procariontes y se localizan en varios compartimientos celulares: mitocondria, cloroplastos, núcleo, citosol. Además dos Grx de clase I están destinadas a la ruta secretoria (retículo endoplasmático y aparato de Golgi) [1].

Estructuralmente se han encontrado dos motivos que diferencian a las Grx de clase I y II. Las Grx de clase II poseen una inserción de cinco residuos que precede al sitio activo y forman un *loop* que se encuentra entre la hebra β 1 y la hélice α 2. Además tienen un motivo WP (triptofano-prolina) que se encuentra cercano al sitio activo, en el *cis*-Pro *loop* [14].

En las glutarredoxinas de clase I el motivo WP se encuentra reemplazado por un residuo cargado que participa en la unión del GSH. Esta diferencia afecta tanto la orientación como la estabilidad con la que se une el GSH a las glutarredoxinas de clase II, y podría explicar parcialmente el hecho que estas Grx sean inactivas en reacciones de deglutationilación [12] (Figura 5).

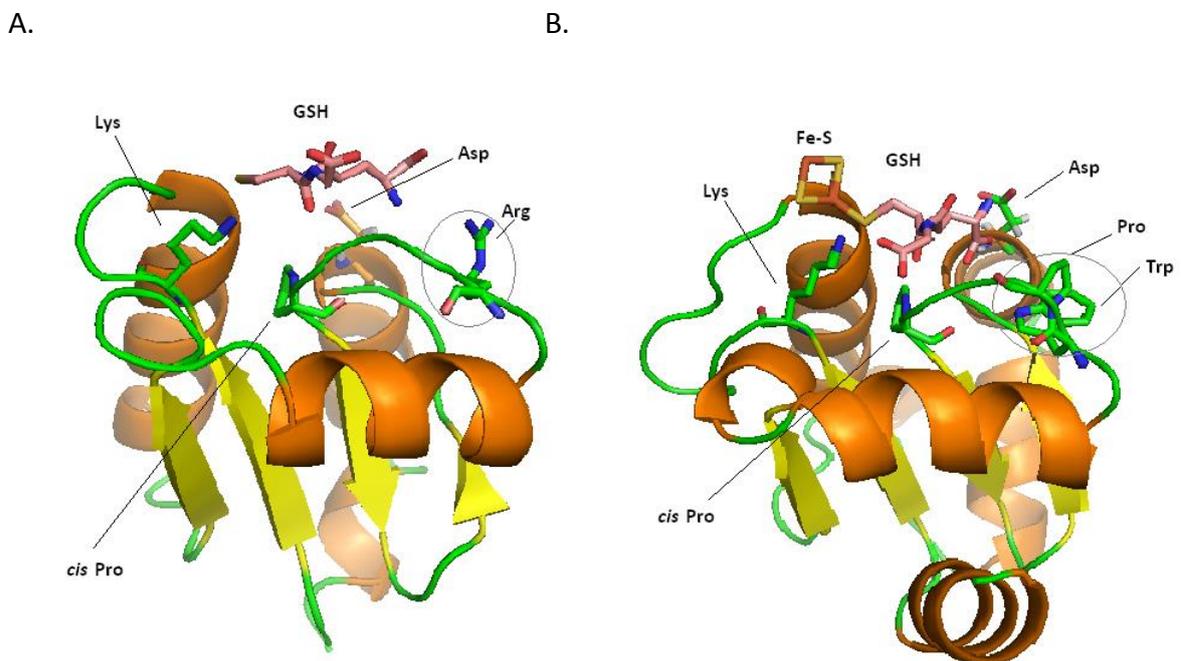


Figura 5: A. Estructura de la Grx3 de *E. coli* (Grx de clase I) formando un complejo con el GSH **B.** Estructura de la Grx5 humana (Grx de clase II) formando un complejo con el glutatión y un centro ferro-sulfurado. En la figura se señalan con flechas los residuos que participan en la unión al GSH y se encuentran conservados en ambas clases de Grx. Con círculos se indica el motivo WP que se conserva en las Grx de clase II y el residuo cargado que reemplaza a este motivo en las Grx de clase I y que interactúa con el GSH, en este caso una arginina. PDB ID: 3GRX (*EcGrx3*), 4RQR (*HsGrx5*).

Por último, las de clase III tienen en su sitio activo la secuencia consenso CC(M/L)(C/S), son exclusivas de angiospermas y sus secuencias no tienen péptidos señal ni señal de localización nuclear lo que sugiere una localización citosólica [1].

1.1.4. Funciones del sistema GR/GSH/Grx

Como se mencionó anteriormente, las glutarredoxinas, en su mayoría, son oxidorreductasas que reducen puentes disulfuro proteicos y disulfuros mixtos entre proteínas o compuestos de bajo peso molecular y GSH (reacción de deglutationilación); además en condiciones en que la relación GSH:GSSG se encuentra disminuida, también catalizan la reacción inversa (glutathionilación) [5, 15]. Algunas glutarredoxinas no tienen esta actividad oxidorreductasa y por lo tanto no cumplen con las funciones recién mencionadas. La mayoría de las glutarredoxinas que carecen de actividad oxidorreductasa, y también algunas Grx activas en reacciones de oxidorreducción, son capaces de coordinar centros ferro-sulfurados. A algunas de ellas se les ha atribuido un rol en la biogénesis de estos centros, el transporte de los mismos a apo-proteínas aceptoras o la homeostasis del hierro [16, 17].

Las Grx forman parte del sistema glutarredoxina junto con el GSH, la glutathion reductasa (GR) y el NADPH. Las Grx oxidadas por diversos blancos son regeneradas a partir de dos moléculas de GSH y el GSSG resultante es reducido por la GR a expensas de NADPH [8] (Figura 6).

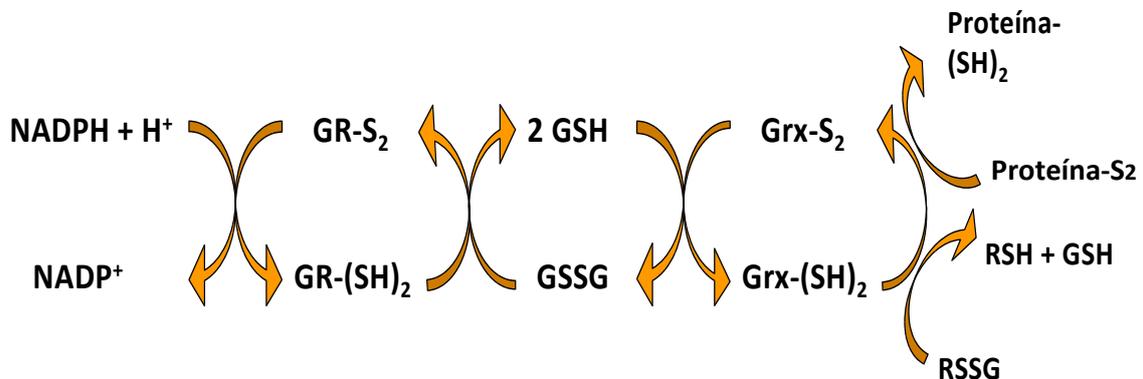


Figura 6: Ciclos de oxidación-reducción que se dan entre los diferentes componentes del sistema GR/GSH/Grx para canalizar los electrones del NADPH hacia distintos blancos celulares.

Mecanismos de acción

Para cumplir con su función las Grx catalizan una serie de reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Esta reacción es una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) (Figura 7).

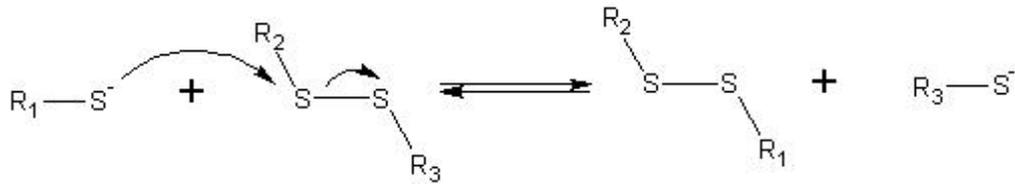


Figura 7: Reacción general de intercambio tiol-disulfuro. El grupo nucleófilo (tiolato) ataca un centro electrófilo (enlace disulfuro). La reacción se resuelve con la formación de un nuevo disulfuro y un tiolato como grupo saliente.

Las Grx siguen un mecanismo ping-pong (doble desplazamiento) en el cual la enzima reacciona con sus dos sustratos en pasos separados y sucesivos. Pueden llevar a cabo la catálisis mediante un mecanismo ditiólico o monotiólico [5].

Mecanismo ditiólico

Las glutarredoxinas reducen disulfuros proteicos mediante un mecanismo ditiólico en el cual participan las dos cisteínas del sitio activo. La cisteína amino terminal del sitio activo (cisteína nucleofílica) realiza un ataque nucleofílico sobre un azufre que forma el enlace disulfuro de la proteína, lo que provoca la ruptura del disulfuro proteico y la formación de un disulfuro mixto entre la Grx y la proteína. En el siguiente paso la segunda cisteína del sitio activo (cisteína resolutive) ataca el azufre de la Grx que forma el disulfuro mixto y se forma un enlace disulfuro intramolecular entre las dos cisteínas del sitio activo de la Grx, dejando la proteína reducida y la Grx oxidada [8, 15] (Figura 8).

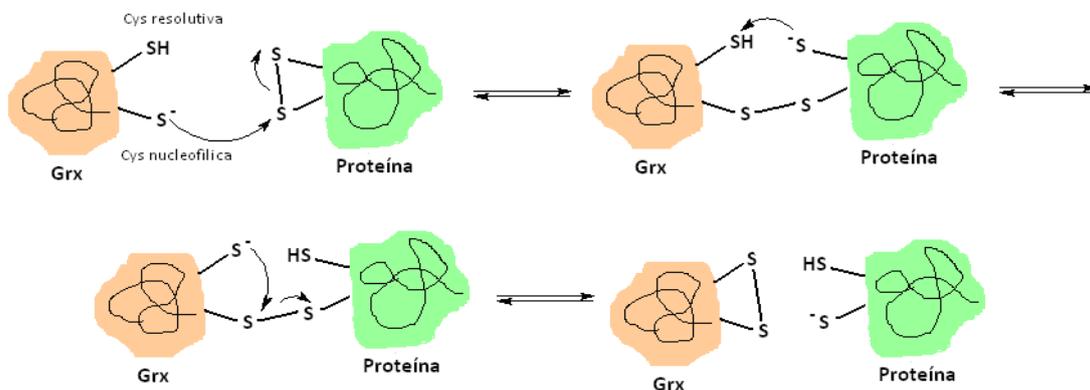


Figura 8: Mecanismo ditiólico de la reacción de intercambio tiol-disulfuro.

Mecanismo monotiólico

La reducción de disulfuros mixtos entre proteínas o compuestos de bajo peso molecular y GSH ocurre mediante un mecanismo monotiólico. En este caso la Grx solo utiliza la cisteína amino terminal del sitio activo. Esta cisteína ataca el azufre del GSH que forma el disulfuro mixto con la proteína y pasa a formar un disulfuro mixto con el GSH (Grx-SSG). De esta manera se libera la proteína reducida. Una segunda molécula de GSH ataca el azufre del GSH que forma un disulfuro con la Grx y queda la Grx reducida y el glutatión oxidado (GSSG) [8, 15] (Figura 9).

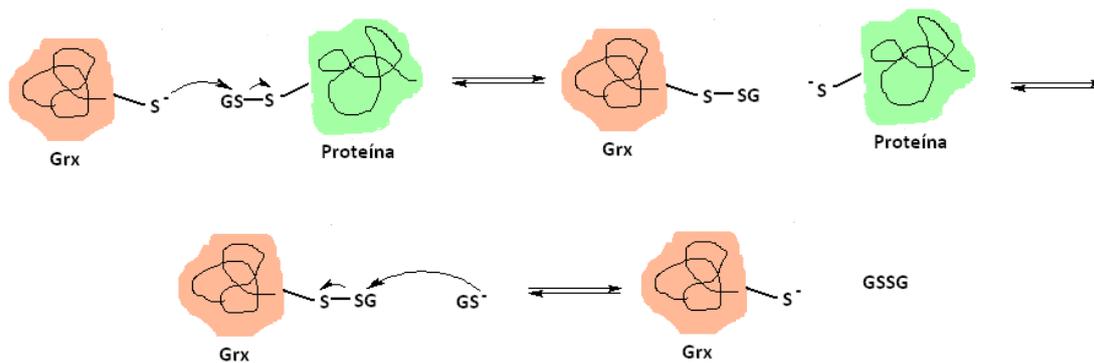


Figura 9: Mecanismo monotiólico de la reacción de intercambio tiol-disulfuro.

Roles biológicos de las Grx

Las glutarredoxinas introducen modificaciones oxidativas en proteínas cambiando su estado redox y por lo tanto regulan su función. Muchas enzimas varían su actividad dependiendo del estado redox de cisteínas reactivas que alternan entre el estado reducido (tiol) y el oxidado (disulfuro) [4].

Reducción de disulfuros proteicos

A partir de la reducción de disulfuros proteicos, la familia de las Grx participa en procesos esenciales para la vida celular. Algunos de ellos son la síntesis de precursores de ADN en *E. coli*, levaduras y mamíferos a partir de la reducción de la ribonucleótido reductasa; la asimilación de sulfato mediante la reducción de la fosfoadenosinafosulfato reductasa en plantas, hongos y bacterias; la reducción de tiorredoxina en plantas y tiorredoxina y peroxirredoxina en humanos; la regulación la transcripción de genes, como por ejemplo OxyR en *E. coli* y el desarrollo neuronal de vertebrados [4, 8, 18 – 21].

No solo la reducción de disulfuros proteicos tiene roles importantes en la célula, sino que también la glutationilación de tioles proteicos, constituye una modificación post-traduccional, covalente y reversible, que junto con la reducción-oxidación de tioles es crítica para la modulación de los sistemas de transducción de señales, regulando varios procesos celulares claves y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis redox [8].

Glutationilación y deglutationilación

La glutationilación reversible de proteínas es una modificación post-traduccional clave en la regulación redox y señalización, comparable a la fosforilación.

Las Grx catalizan tanto glutationilación como deglutationilación de proteínas, sin embargo en condiciones normales, la reducción de disulfuros mixtos entre proteínas y glutatión es la que se ve favorecida. Cuando la relación 2GSH/GSSG disminuye, en condiciones de estrés oxidativo, ocurre la formación de disulfuros mixtos. Se ha

demostrado que la glutationilación regula un número importante de proteínas y procesos en respuesta a señalización redox [4, 8].

Hasta ahora, se sabe que hay más de 200 proteínas de mamíferos que sufren esta modificación post-traducciona, entre las que se encuentran la actina, la ATPasa de Na⁺ y K⁺, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la proteína tirosina fosfatasa 1B, la creatina kinasa, c-Jun, la subunidad p50 del NFκB, la caspasa-3, la anhidrasa carbónica, Fas y la HIV proteasa. También se han identificado proteínas cuya función se ve afectada por esta modificación en plantas, bacterias y levaduras [4, 22 – 26].

En condiciones de estrés oxidativo la glutationilación protege los grupos sulfhidrilos de la oxidación irreversible. Cuando la relación oxidantes:antioxidantes se ve aumentada, se generan modificaciones oxidativas irreversibles en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando daño irreversible. La cisteína, un residuo clave que participa en el plegamiento proteico, la coordinación de metales y la catálisis enzimática, es especialmente sensible a oxidación a partir de estas especies oxidantes debido a las propiedades redox del grupo tiol [27]. Las especies reactivas del oxígeno pueden conducir a la formación de disulfuros inter o intramoleculares a través de diferentes mecanismos. El grupo tiol puede reaccionar con peróxido de hidrógeno para dar los ácidos sulfénico, sulfínico y sulfónico, o con óxido nítrico resultando en S-nitrosilación, provocando la inactivación de proteínas que requieren cisteínas redox-activas para su actividad. Por lo tanto, la glutationilación de cisteínas es considerada un mecanismo de protección ya que es un proceso reversible. Además, en estas condiciones se ha demostrado que la glutationilación de proteínas clave activa rutas de señalización que participan en la respuesta celular adaptativa al estrés oxidativo funcionando el sistema Grx como sensor redox [8, 25, 28, 29]

Biogénesis de centros ferro-sulfurados

Algunas Grx ditiólicas y la mayoría de las Grx monitiólicas son capaces de coordinar centros ferro-sulfurados. Se le han asignado diversas funciones a estas Grx, como cumplir un rol en la biogénesis de estos centros ferro-sulfurados en la mitocondria, funcionar como proteínas de andamiaje para su ensamblado o como transportadores de estos centros a apo-proteínas aceptoras en el citosol, aunque en muchos casos el rol biológico todavía se desconoce. El cofactor [2Fe2S]²⁺ es coordinado por las cisteínas amino terminales del sitio activo de dos monómeros y dos moléculas de GSH unidas no covalentemente a las Grx [30] (Figura 10).

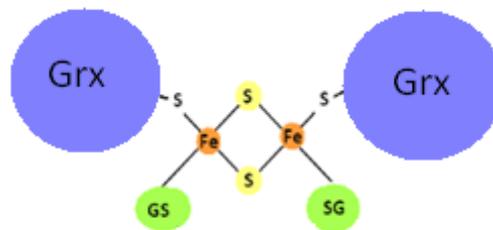


Figura 10: Centro ferro-sulfurado coordinado por las cisteínas de dos monómeros de Grx y dos moléculas de GSH.

Como la cisteína amino terminal del sitio activo es esencial para la función oxidorreductasa, los monómeros que se encuentran coordinando estos centros son catalíticamente inactivos. Se ha propuesto que estos centros podrían funcionar como sensores del estado redox de la célula: en condiciones de estrés oxidativo cuando la relación GSH:GSSG disminuye, se liberaría una mayor cantidad de Grx activa, que funcionaría para devolver el balance redox a la célula. Algunas glutarredoxinas regulan la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro a partir de la evaluación de los niveles de hierro intracelular, y otras participan en la distribución del hierro dentro de la célula, por lo que cumplen un rol importante en la homeostasis del hierro [31 - 35].

En la Figura 11 se resumen los principales procesos celulares en los que las glutarredoxinas cumplen un rol. Las Grx participan en procesos muy variados, por ende muchas de ellas esenciales para la vida de la célula en condiciones fisiológicas y otras para la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo.



Figura 11: Principales funciones celulares en las que están involucradas las glutarredoxinas.

1.2. *Trypanosoma brucei*

El *Trypanosoma brucei* es un parásito protozoo extracelular flagelado, perteneciente al orden *Kinetoplastida* y género *Trypanosoma*. Es el agente causante de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, tanto en humanos como en animales. La región endémica de esta enfermedad está determinada por la zona donde se encuentra la mosca tse-tsé (insecto vector), que incluye 36 países del África subsahariana y 70 millones de personas. Su ciclo de vida es complejo y varía entre el hospedero mamífero y el vector artrópodo [36, 37].

1.2.1. El sistema redox de los tripanosomátidos

Los organismos del género *Trypanosoma* tienen un sistema redox que no depende directamente del GSH sino del tripanotión (N1,N8-bisglutationilperimidina, T(SH)₂) (Figura 12) un producto de conjugación entre dos moléculas de GSH y la triamina espermidina (Sp), producido de forma ATP-dependiente por una enzima específica de este linaje llamada tripanotión sintetasa [38].

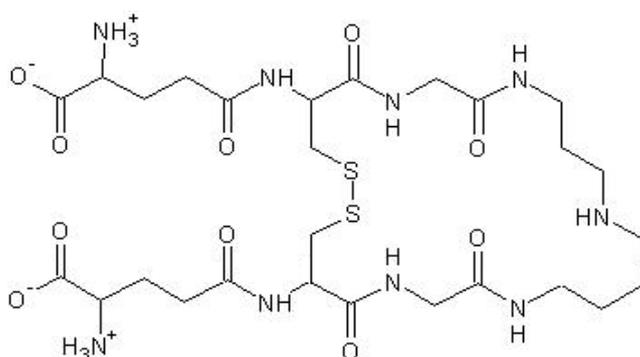


Figura 12: Molécula de tripanotión en la forma disulfuro.

Estos organismos carecen de las principales reductasas que controlan la homeostasis redox celular en la mayoría de los eucariotas y procariotas: glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa. Sin embargo poseen una flavoenzima dependiente de NADPH, la tripanotión reductasa (TR) que mantiene el tripanotión en su estado reducido, por lo que se podría decir que en estos parásitos, el sistema tripanotión/tripantión reductasa estaría sustituyendo a los sistemas glutatión/glutatión reductasa y tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. Este sistema redox que transfiere el poder reductor del NADPH hacia blancos moleculares en los tripanosomátidos está compuesto además por una enzima similar a la tiorredoxina denominada triparredoxina (TXN), una tiorredoxina auténtica de función desconocida (Trx) y enzimas de la familia de las Grx específicas para T(SH)₂, todas estas enzimas son reducidas por el T(SH)₂ y transportan equivalentes de reducción hacia sus correspondientes blancos biológicos [38, 39].

La Trx se encuentra en bajas concentraciones y su ausencia no afecta la proliferación del parásito al menos bajo condiciones de cultivo normales. La TXN transfiere equivalentes de reducción del T(SH)₂ a la ribonucleótido reductasa, la

metioninsulfóxido reductasa, 2Cys peroxirredoxinas y enzimas del tipo glutatión peroxidasa no dependiente de selenio. La Grx puede reemplazar a la TXN en su función de reducir a la ribonucleótido reductasa, aunque menos eficientemente. *In vitro*, la TXN es una más potente reductora de disulfuros proteicos que la Grx, mientras que su actividad hacia proteínas glutationiladas es muy baja, por lo que esta seguramente es una función específica de las Grx [38, 39] (Figura 13).

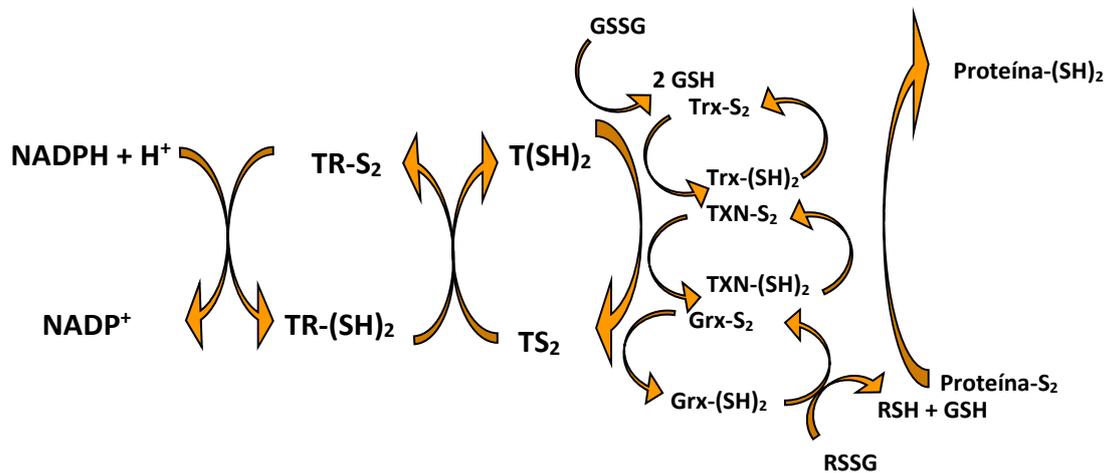


Figura 13: En este esquema se representa el pasaje de equivalentes de reducción a través del sistema tripanotión desde el NADPH hacia distintos blancos en la célula.

1.2.2. Glutarredoxinas en *T. brucei*

Se han identificado cinco glutarredoxinas en el genoma de *T. brucei*, dos de las cuales son de clase I (2CGrx1 y 2) y tres de clase II (1CGrx1-3).

Un alineamiento de las secuencias de las 2CGrx con glutarredoxinas de otros organismos reveló que los residuos que interaccionan con el GSH en la superficie de la proteína están conservados. Sin embargo la lisina precede al sitio activo que interacciona con el carboxilato de la glicina del GSH se encuentra reemplazada, lo que apoya la interacción de la proteína con el T(SH)₂ donde el carboxilato de la glicina no tiene carga negativa ya que está formando un enlace amida con la espermidina (Figura 14). Las Grx de los tripanosomátidos evolucionaron adaptándose al metabolismo redox único de estos parásitos [39].

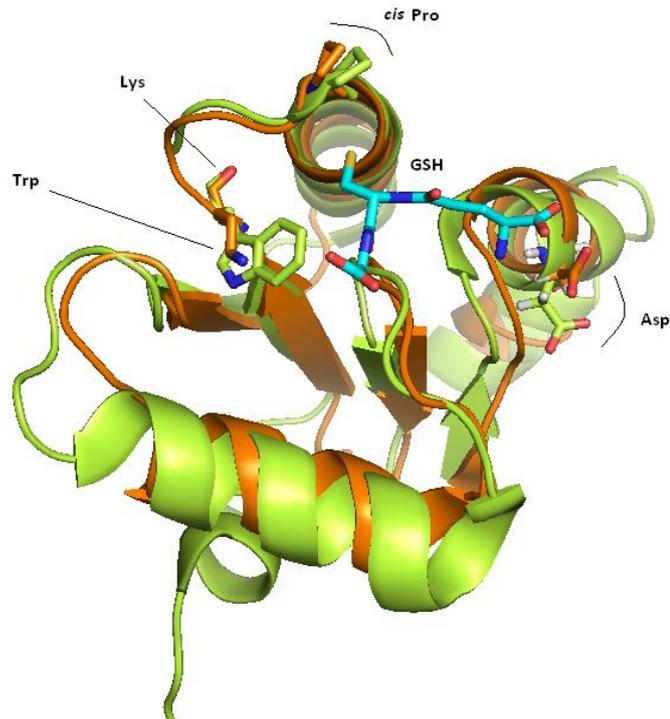


Figura 14: Estructuras superpuestas de la 2CGrx1 de *T. brucei* (verde) y la 3Grx de *E. coli* (naranja), formando un complejo con el GSH. Se observan dos residuos conservados en ambas Grx: el aspartato y la prolina en *cis*, ambos participan en la unión del GSH y la lisina que también interacciona con el GSH y se encuentra conservada en la mayoría de las Grx, en las Grx de *Trypanosoma* se encuentra reemplazada por un residuo hidrofóbico, en este caso un triptofano. PDB ID: 2MYG (*Tb2CGrx1*), 3GRX (*EcGrx3*).

Las 2CGrx tienen actividad oxidorreductasa, reducen el glutatión disulfuro (GSSG) a expensas de tripanotión y tienen actividad reductasa de disulfuros proteicos, así como disulfuros mixtos entre proteínas y glutatión. Tanto el GSH como el T(SH)₂ son capaces de reducir a las 2CGrx, y ambos se encuentran en una concentración de aproximadamente 300 μM, sin embargo el T(SH)₂ es unas 1000 veces más eficiente por lo que se piensa que es el reductor fisiológico de estas enzimas. La 2CGrx1 es citosólica, mientras que la 2CGrx2 se encuentra en el espacio intermembrana de la única mitocondria del parásito [39, 40].

En cuanto a las 1CGrx, la 1CGrx1 y 1CGrx2 son mitocondriales mientras que la 1CGrx3 es citosólica. Ninguna es activa en reacciones de oxidorreducción. Las tres 1CGrx así como la 2CGrx1 son capaces de coordinar centros ferro-sulfurados [39].

Los centros ferro-sulfurados son coordinados por las cisteínas amino terminales del sitio activo de dos monómeros, y dos ligandos no proteicos, los cuales en el caso de los tripanosomátidos pueden ser tanto el GSH como la Gsp o el T(SH)₂ [16, 41].

Glutarredoxina 1 de clase I (2CGrx1)

La 2CGrx1 es una glutaredoxina de clase I. En su nombre, el número 2 se refiere a la cantidad de cisteínas del sitio activo, mientras que el 1 es el número que la diferencia de la otra Grx de clase I de *T. brucei*, la 2CGrx2. Tiene sitio activo con secuencia CPYC, se encuentra tanto en forma dimérica como monomérica y su peso molecular es de

10576 Da. Además de las dos cisteínas pertenecientes al sitio activo: Cys 21 y Cys 24, posee una tercera cisteína en posición 78 [40].

Sumado al hecho de ser activa en reacciones de deglutationilación, la 2CGrx1 cataliza la reducción del GSSG a partir del T(SH)₂ con una eficiencia 50 veces mayor que la 2CGrx2, por lo que se puede decir que la 2CGrx1 sustituye a la GR en la función de mantener el GSH en estado reducido, principalmente en condiciones de estrés oxidativo [40].

In vitro, la 2CGrx1 coordina centros ferro-sulfurados pero el rol de esta actividad *in vivo* se desconoce. Se ha sugerido que la formación del complejo, el cual deja a la enzima catalíticamente inactiva, puede ser una forma de regulación. Alternativamente, la 2CGrx1 puede cumplir un rol en la maduración de proteínas con centros ferro-sulfurados en el citosol [40].

Glutarredoxina 1 de clase II (1CGrx1)

La 1CGrx1 es una glutarredoxina de clase II en cuyo nombre el primer número se refiere a la cantidad de cisteínas del sitio activo y el último se le asignó para diferenciarla de las otras dos glutarredoxinas de clase II de *T. brucei*, la 1CGrx2 y la 1CGrx3. Es una proteína abundante que se encuentra en forma de monómero. Tiene sitio activo de secuencia CAYS y su peso molecular es de 15931 Da. Esta Grx coordina centros ferro-sulfurados a partir de su cisteína del sitio activo (Cys 104) y GSH, T(SH)₂ o Gsp y participa en la biogénesis de centros ferro-sulfurados en la mitocondria. Es la única Grx esencial tanto en el estadio sanguíneo como en el procíclico [41, 42].

Además de la cisteína 104 la 1CGrx1 tiene una cisteína adicional, la Cys 181. Esta cisteína forma un disulfuro mixto con el GSH o la Gsp que puede promover la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre la Cys 104 y la Cys 181. Esto podría tener un rol de protección de la cisteína 104 en condiciones de estrés oxidativo. Ambos estados oxidados pueden ser reducidos por la TXN o el sistema T(SH)₂/TR [43].

Como se mencionó anteriormente, dos motivos estructurales son los que diferencian a las Grx de clase I con las de clase II. Estos son la inserción de cinco residuos que forman un *loop* que precede al sitio activo, y un motivo WP altamente conservado que se encuentra en el *cis-Pro loop* y que forma parte del sitio de unión para el GSH (Figura 15). Estos motivos son característicos de las Grx de clase II, y se ha sugerido que pueden ser relevantes en la falta de actividad redox de las 1CGrx que contienen estos elementos estructurales. 1CGrxs que carecen de estos elementos conservan la capacidad de reducir disulfuros mixtos entre el GSH y β -mercaptoetanol [14].

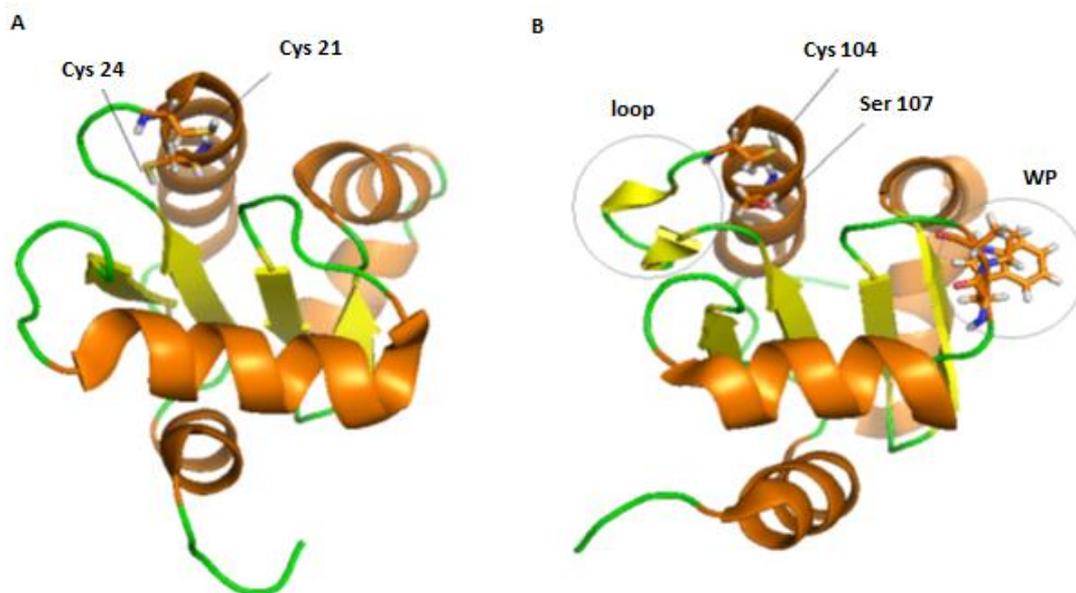


Figura 15: En esta figura se observan las estructuras de la 2CGrx1 (derecha) y la 1CGrx1 (izquierda). Con las flechas se señalan las cisteínas y la serina de los sitios activos, y con los círculos grises se indican los motivos estructurales pertenecientes a la 1CGrx1 característicos de las Grx de clase II: el *loop* precedente al sitio activo y el motivo WP. PDB ID: 2MYG (2CGrx1) y 2LTK (1CGrx1).

1.3. Reactividad de Glutarredoxinas

La reacción de intercambio tiol-disulfuro es una sustitución nucleofílica de tipo S_N2 . Consta de un ataque nucleofílico del tiolato nucleófilo sobre el azufre de un enlace disulfuro (centro electrofílico). La velocidad de la reacción de intercambio tiol-disulfuro depende de la nucleofilia del agente atacante y de la estabilidad del grupo saliente, por lo que la nucleofilia de la cisteína reactiva de las Grx es una propiedad fundamental si se quiere estudiar y comparar la reactividad de estas proteínas [4].

Los tiolatos son sustancialmente mejores nucleófilos que los tioles, por lo que los primeros son los únicos reactivos en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro. La determinación de la basicidad o acidez de las cisteínas reactivas es otra propiedad de gran relevancia ya que informa sobre qué proporción del tiol se encuentra en su forma ionizada, disponible para reaccionar a un pH determinado. La cisteína libre tiene un pKa de aproximadamente 8.3, sin embargo las cisteínas que se encuentran formando parte de proteínas pueden adoptar un amplio rango de valores ya que factores determinados por el entorno de la proteína como el grado de solvatación, la presencia de grupos cargados vecinos así como la formación de enlaces de hidrógeno son factores que influyen la tendencia a ionizarse del tiol. Generalmente, las cisteínas catalíticas tienen pKas más bajos, lo que les permite tener una mayor proporción del tiolato reactivo disponible para la catálisis a pH fisiológico. En el caso de las Grx activas en reacciones de oxidorreducción, se han reportado valores de pKa para cisteínas reactivas de entre 2,5 y 5,5 unidades, alguno de los cuales se detallan en la tabla I [44, 45].

Tabla I: pKas de cisteínas de glutarredoxinas pertenecientes a distintos organismos

Organismo	Grx	Cys	pKa	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Grx1	11	4,9	Peltoniemi <i>et al.</i> , 2006
	Grx3	11	<5,5	Nordstrand <i>et al.</i> , 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Grx1	27	3,2 - 4,0	Discola <i>et al.</i> , 2009
			4,5	Iversen <i>et al.</i> , 2010
	Grx2	61	3,1 – 3,5	Discola <i>et al.</i> , 2009
	Grx5	60	5,0	Tamarit <i>et al.</i> , 2003
<i>Homo sapiens</i>	Grx1	22	3,5	Mieyal, Starke <i>et al.</i> 1991
	Grx2	22	4,6	Gallogly <i>et al.</i> , 2008
<i>Sus scrofa</i>	Grx1	22	2,5	Gan and Wells, 1987
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Grx1	47	3,9	Gao <i>et al.</i> , 2010
	Grx2	47	4,8	
<i>Populus tremula</i>	GrxS12	29	2,8	Couturier <i>et al.</i> , 2009
			3,8	Zaffagnini <i>et al.</i> , 2012
	GrxC1	31	4,7	Feng <i>et al.</i> , 2006
<i>Plasmodium falciparum</i>	Glp1	99	5,5	Deponte <i>et al.</i> , 2005
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	1CGrx1	104	3,7/5,6	Sardi <i>et al.</i> , 2013
	1CGrx3 (Grx dom)	150	5,4	Bellanda <i>et al.</i> , no publicado
	2CGrx1	21	5,1/5,4	Este trabajo
<i>Trypanosoma cruzi</i>	1-C-Grx1	105	4,5/5,0	Fleitas, Manta <i>et al.</i> , no publicado

La nucleofilia se refiere a fenómenos cinéticos, y es la velocidad relativa de la reacción de un donador de electrones con un electrófilo dado. La basicidad en cambio es un término termodinámico que se refiere a la afinidad relativa por un protón en un equilibrio ácido-base [45].

De todas maneras, la nucleofilia no es un término absoluto y por lo tanto debe determinarse en el contexto de reacciones que se dan entre nucleófilos de la misma especie, por ejemplo tioles, y un mismo electrófilo. De esta manera se logran obtener valores que sean comparables entre sí [45].

En el caso de tioles de bajo peso molecular, en general se cumple la ecuación de Brønsted, que relaciona de manera lineal energías libres asociando la nucleofilia (k_{RS^-}) con la basicidad (pKa). Sin embargo no ocurre lo mismo para tioles proteicos, donde existen factores adicionales determinados por el entorno de la proteína que influyen en la nucleofilia, y se deja de observar una dependencia de la nucleofilia con la basicidad del tiol [45, 46].

1.3.1. Metodología para el estudio de nucleofilia y pKa de cisteínas proteicas

Para tioles proteicos o tioles de bajo peso molecular, la nucleofilia puede determinarse como la constante de velocidad independiente del pH de una reacción de tipo S_N2 entre el tiolato nucleófilo y un electrófilo. En el caso de cisteínas proteicas, existe una

nucleofilia específica (si la reacción se da con el sustrato de la enzima) y una nucleofilia inespecífica (en caso que el reactivo no sea específico para la enzima). La ventaja de determinar nucleofilia inespecífica es que permite la comparación de la reactividad de distintas cisteínas de la proteína o incluso comparar la reactividad de cisteínas que se encuentren en diferentes proteínas. Esto es válido siempre y cuando se use el mismo agente electrófilo, y el electrófilo sea tal que no exista impedimento estérico ni electrostático que pueda influir en la velocidad de la reacción, y tampoco existan similitudes entre este y el sustrato de la enzima [4, 45-47].

El pKa de distintas cisteínas se puede determinar de forma química aprovechando la diferencia de reactividad entre la forma tiol y tiolato o de forma espectroscópica mediante el seguimiento del cambio en la fluorescencia de un triptofano cercano, ya que un cambio en el entorno local del Trp suele afectar tanto su rendimiento cuántico como su máximo de emisión [48, 49].

1.3.2. Bromobimanos y fluorescencia

Los bromobimanos son bromoalcanos que fueron introducidos como sondas fluorescentes en 1979 para marcar hemoglobina, proteínas de membrana y glutatión de eritrocitos humanos en condiciones fisiológicas. Han sido usados desde entonces para detectar y cuantificar tioles tanto de bajo peso molecular como proteicos. Los bromobimanos no son fluorescentes pero reaccionan con tioles reactivos mediante una sustitución nucleofílica del tipo S_N2 dando un tioéter fluorescente el cual absorbe a 396 nm con un coeficiente de absorptividad de $5300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y tiene un máximo de emisión entre 470 y 490 nm (Figura 16). Estos productos tienen un alto rendimiento cuántico (sencilla detección), son estables al aire y a irradiación prolongada [50, 51].

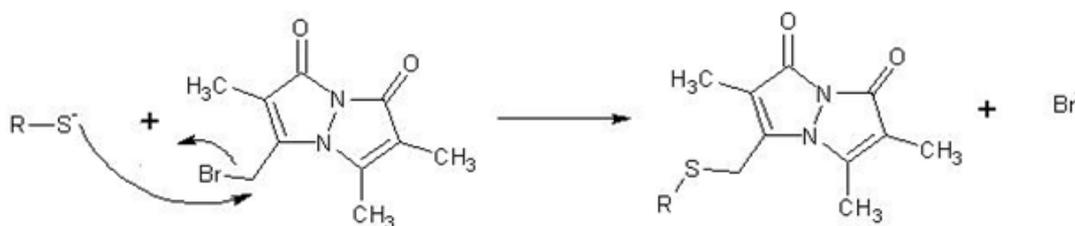


Figura 16: Reacción de alquilación de un tiolato con monobromobimano (mBBr). El tiolato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono adyacente al bromo. Se forma un enlace tioéter entre el azufre y el carbono dejando al bromuro como grupo saliente.

Además cuentan con la ventaja de ser moléculas pequeñas (dos anillos fusionados de cinco miembros) y sin carga, por lo que no existe impedimento estérico ni repulsión electrostática con grupos cercanos al tiol, lo que es importante principalmente en el caso que se trabaje con proteínas. Tienen la ventaja de ser sensibles, no solo se pueden detectar concentraciones nanomolares de producto sino que se puede seguir su formación en el tiempo. Al ser moléculas neutras su espectro de emisión y su rendimiento cuántico son independientes del pH, lo que es crucial para determinaciones de pKa. Otra ventaja es su falta de parecido con los sustratos de la enzima, que evita que ocurran interacciones específicas [50, 51].

Los bromobimanos reaccionan además de con tioles, con grupos amino e hidroxilo, los cuales se pueden encontrar en altas concentraciones debido a componentes del amortiguador y al empleo de bases cuando se desea variar el pH de la muestra. Sin embargo aún en estas condiciones estas reacciones ocurren muy lentamente por lo que no interfieren con la alquilación de tioles. Las reacciones de los bromobimanos con tioles son de segundo orden y dependen del pH ya que el nucleófilo activo es el anión tiolato, lo que permite determinar pKas de las cisteínas a partir de la dependencia con el pH de la velocidad de la reacción. Por otra parte la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH puede utilizarse como un indicador de la nucleofilia del tiolato, por lo que esta metodología permite comparar los valores de nucleofilia obtenidos para las diferentes especies [46, 47].

En general estas reacciones se siguen excitando a la longitud de onda que absorbe el bimano (396 nm) y observando el aumento en la emisión (470 - 490 nm) a medida que se forma el producto. Por otra parte, el espectro de excitación del producto tioéter se superpone con el de emisión del triptofano (Trp) (Figura 17), lo que permite usar FRET para detectar alquilación de tioles proteicos. Para la obtención de los espectros que se muestran a continuación se utilizó una concentración de 2 μ M de *Tb2CGrx1*. Para el registro de los espectros del producto tioéter de la reacción entre la 2CGrx1 y el mBBr, la 2CGrx1 fue alquilada con exceso de mBBr y luego pasada por una columna PD-10 para remover el agente alquilante remanente.

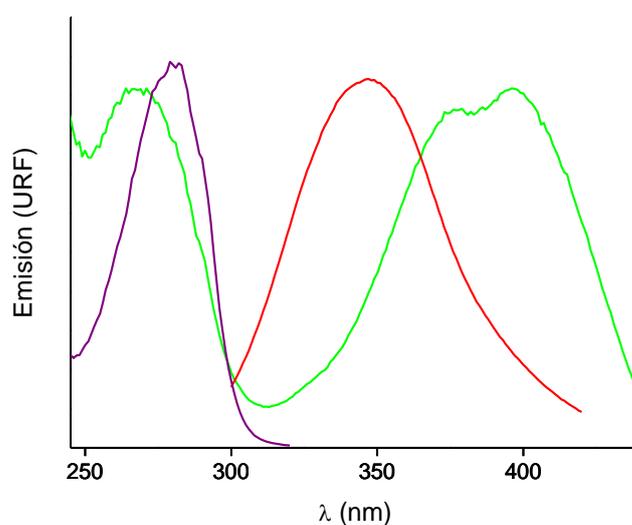


Figura 17: Espectro de excitación de la *Tb2CGrx1* (violeta). Espectro de emisión de la *Tb2CGrx1* (rojo). Espectro de excitación del producto de alquilación de la *Tb2CGrx1* con mBBr (verde). Como se puede apreciar en la figura el espectro de emisión de la proteína se solapa con el espectro de excitación del producto de alquilación.

El FRET puede medirse a partir de un cambio en la fluorescencia del donador (Trp) como del aceptor (tioéter). En el caso de ver al aceptor, se irradia a la longitud de onda de excitación del Trp (280 nm) y se detecta el aumento en la intensidad la fluorescencia del producto tioéter (470 – 490 nm). En caso de ver al donador también de excita a 280 nm, pero se observa la emisión del mismo Trp a 340 nm, que va a descender a medida que es transferida hacia el producto de la reacción [52, 53]. En la figura 18 se observa

el espectro de emisión de la *Tb2CGrx1* luego de reaccionar con mBBr. Para esto se excitó la muestra a 280 nm y se siguió la emisión de fluorescencia en un rango de 300 a 550 nm. En esta figura se puede apreciar el FRET entre el Trp de la proteína y el producto tioéter, ya que se observa un máximo en la intensidad a 470 nm (emisión del producto) y un descenso en la intensidad a 340 nm (emisión del Trp).

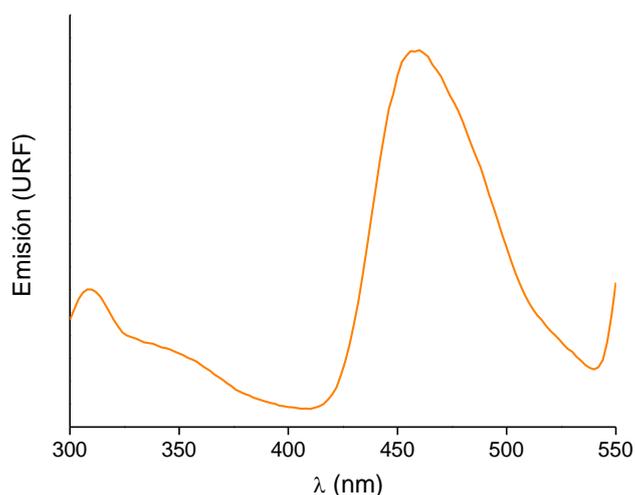


Figura 18: Espectro de emisión del producto de alquilación de la *Tb2CGrx1* con mBBr. La muestra se excitó a 280 nm y se siguió la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la longitud de onda.

1.4. Antecedentes

Uno de los primeros trabajos en los que se siguió la cinética de la reacción de alquilación de tioles con bimanos fue en el trabajo de Radkowsky y col, en 1986 [54]. En este trabajo se calcularon constantes de velocidad de segundo orden entre diferentes bimanos y el GSH.

Recientemente, en el año 2013, nuestro grupo de investigación publicó un trabajo en el que se seguía la reacción entre el monobromobimano (mBBr) y tioles de bajo peso molecular y de cisteínas proteicas [47]. En este trabajo se utilizaron dos proteínas, la peroxirredoxina 5 humana y la 1CGrx1 de *T. brucei*. El objetivo era determinar las propiedades de nucleofilia y acidez de los tioles. Para la 1CGrx1 se obtuvieron 3 constantes de ionización. Para la cisteína 181 el valor de pKa obtenido fue entre 7,5 y 9,1 unidades, para la cisteína 104, perteneciente al sitio activo, los valores obtenidos fueron entre 5 y 5,8. El tercer pKa se encontraba entre 3,4 y 4,7 y se propuso que el mismo pertenecía a un residuo cuyo estado de ionización afectaba la reactividad de la cisteína 104. De todas formas mencionan la posibilidad de que estos últimos pKas se encuentren intercambiados.

Esta tesina es una continuación del trabajo recién mencionado, y se llevó a cabo en el marco de un proyecto titulado “Determinantes estructurales y de reactividad en el uso de glutatión como sustrato redox y no redox en glutarredoxinas”.

Este proyecto propone el estudio de cuatro glutarredoxinas, dos de las cuales son de clase I (*HsGrx2* y *Tb2CGrx1*) y dos son de clase II (*HsGrx5* y *Tb1CGrx1*). El objetivo es explorar propiedades que relacionen ciertas características estructurales específicas (*loop* β 1- α 2, motivo WP, posición de K conservada) con la forma de unión al sustrato (GSH o T(SH)₂), las bases estructurales de la discriminación entre uno y otro sustrato, y las características de reactividad de la cisteína nucleofílica y su involucramiento en procesos redox.

Para responder algunas de las preguntas que se presentan en este proyecto, en esta tesis se estudiaron propiedades de pKa y nucleofilia inespecífica del sitio activo de la *Tb1CGrx1*, la *Tb2CGrx1* y variantes de la misma. En cuanto a las variantes de la 2CGrx1, a una de ellas se le insertó el *loop* característico de las Grx de clase II y a la otra se le insertó además del *loop*, el motivo WP en el *cis* Pro *loop* con el objetivo de intercambiar propiedades estructurales entre la 2CGrx1 y la 1CGrx1. Por otro lado se utilizaron variantes en las cuales distintas cisteínas fueron reemplazadas por serinas. A partir del estudio de estas glutarredoxinas se propuso explorar el efecto del *loop*, el motivo WP, y la cisteína resolutive del sitio activo (C24) en las propiedades de reactividad de la cisteína nucleofílica (C21).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Determinar las propiedades ácido base y nucleofílicas de la cisteína N-terminal (C21) de la 2CGrx1 y diferentes variantes de manera de obtener información que aporte a la comprensión de los determinantes estructurales de la función redox en Grx de clase I y II.

2.2. Objetivos específicos

- Expresar y purificar las proteínas recombinantes 2CGrx1 C21S, C78S, C24S y C21S/C24S.
- Obtener un valor de pKa para la cisteína 21 de la 2CGrx1 WT y las variantes mediante un método espectroscópico (fluorescencia intrínseca) y método químico (reactividad diferencial entre la forma tiol y tiolato frente a un agente alquilante, el monobromobimano).
- Obtener una constante de velocidad de segundo orden independiente del pH para la reacción de la 2CGrx1 y variantes con un electrófilo inespecífico, el mBBr, como valor de nucleofilia inespecífica de la cisteína 21.
- A partir de los valores de pKa y nucleofilia del sitio activo encontrar relaciones entre los motivos estructurales que diferencian a la 2CGrx1 y la 1CGrx1 y sus diferentes funciones, particularmente la actividad redox.

3. Metodología

3.1. Materiales de uso general

3.1.1. Proteínas

En esta tesina se trabajó con la *Tb1CGrx1*, *Tb2CGrx1* y variantes de la última. Las variantes de la 2CGrx1 se pueden separar en dos grupos. Aquellas en las que alguna de las cisteínas se encuentran reemplazadas por serina: C21S, C24S, C21S/C24S y C78S, y aquellas que contienen insertos de motivos estructurales de la 1CGrx1 que son característicos de glutarredoxinas de clase II. Estos motivos son 5 residuos de secuencia GLPEA que forman un *loop* que se encuentra en la conexión β 1- α 2 precedente al sitio activo y un motivo WP que está lejano en la secuencia del sitio activo, pero cercano al mismo en la estructura de la proteína. Además se reemplazó la secuencia VT que precede al sitio activo de la 2CGrx1 por la secuencia PM de la 1CGrx1. Estas variantes serán llamadas 2CGrx1 + *loop* y 2CGrx1 + *loop* + WP. Las secuencias de las proteínas recién mencionadas con las mutaciones correspondientes se encuentran detalladas en la figura 19.

1CGrx1	1	MGQSTSGIGGDVRDIEETHPDFQPRLVSADLAEDEIAM	38
1CGrx1	39	VKKDIDDTIKSEDVVTFIKGLPEAPMCAYSKRMIDV--L-EALGLEYSFDVLAHPVRSYV	98
2CGrx1 WT	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSW-----VTCPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	56
loop	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSWGLPEAPMCPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	62
loop + WP	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSWGLPEAPMCPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	62
C24S	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSW-----VTCPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	56
C21S/C24S	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSW-----VTSPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	56
C21S	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSW-----VTSPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	56
C78S	1	MEPSIASMIKGNKVVVFSW-----VTCPCVRAEKLLHARTKDITVHYVDMSEGEQLRGEI	56
1CGrx1	99	KEVSEWPTIPQLFIKAEFVGGLDIVTKMLESGLKMLRDKGITCRDL	147
2CGrx1 WT	57	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	95
loop	63	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	101
loop + WP	63	YQAYKWP TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	101
C24S	57	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	95
C21S/C24S	57	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	95
C21S	57	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	95
C78S	57	YQAYKHE TVPAIFINGNFIGGCS DLEALDKEGKLDGLS-----	95

Figura 19: Alineamiento de secuencias de las proteínas que se estudiaron en esta tesina. En verde y amarillo se señalan las inserciones y sustituciones que dieron lugar a las variantes *loop* y *loop + WP*. Se señala en verde los residuos que forman el *loop* de la 1CGrx1 que fue insertado en la 2CGrx1. Se señalan en amarillo los motivos HE y VT de la 2CGrx1 que fueron reemplazados por los motivos WP y PM de la 1CGrx1 respectivamente. En fucsia se señalan las cisteínas de la 2CGrx1. En celeste se señalan las serinas que se encuentran reemplazando a las cisteínas en las variantes C21S, C24S, C78S y C21S/C24S de la 2CGrx1.

3.1.2 Medios de cultivo

- Medio LB (Luria-Bertani): 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona.
- Medio 2XYT: 16 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl y 10 g/L de triptona (ajustado a pH 7,4 con NaOH).

3.1.3. Amortiguadores

- Amortiguador A: Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH= 7,8.
- Amortiguador de lisis: amortiguador A suplementado con 1 mg/mL lisozima, 40 nM cistatina, 50 mg/mL leupeptina, 10 µg/mL aprotinina y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF)
- Amortiguador B: Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH= 7,8.
- Amortiguador SEC: Na₂HPO₄ 100 mM, NaCl 150 mM, pH= 7.
- Amortiguador TMA: 30 mM TRIS, 15 mM ácido acético, 15 mM MES, 120 mM NaCl, 0,1 mM DTPA, pH 7 (mantiene la fuerza iónica constante en 0.15 M a lo largo del intervalo de pH de 3,6 a 9,1) [55].

3.1.4. Gel de poliacrilamida 15%

- Gel separador al 15%: 1,1 mL de agua destilada, 2,5 mL de acrilamida 30%, 1,3 mL de amortiguador de separación (TRIS-HCl 1.5 M pH 8,8), 50 µL de detergente SDS 10%, 50 µL de persulfato de amonio (APS) 10%, 2 µL de tetrametilenetilendiamida (TEMED).
- Gel concentrador al 5%: 1,4 mL de agua destilada, 330 µL de acrilamida 30%, 250 µL de amortiguador de concentración (TRIS-HCl 0,5 mM pH 6.8), 20 µL de SDS, 20 µL de APS, 2 µL de TEMED.

3.2. Procedimientos generales

3.2.1. Reducción de tioles con DTT

Para los ensayos cinéticos era necesario que los tioles se encontraran en estado reducido para que fueran capaces de reaccionar con el mBBr. Para esto las proteínas fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT) (Figura 20).

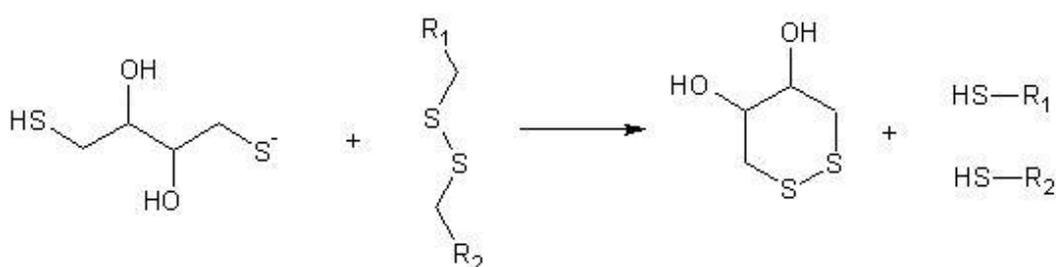


Figura 20: Reacción general de reducción de un puente disulfuro con DTT.

Se incubaron aproximadamente 200 µL de proteína a una concentración de entre 50 y 220 µM con 5 mM de DTT por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se quitó el exceso de reductor utilizando una columna PD10 de 5 mL equilibrada previamente con amortiguador TMA.

3.2.2. Oxidación de tioles con H₂O₂

La constante de velocidad de segundo orden aparente de la reacción entre la 2CGrx1 WT y el mBBr fue determinada para la 2CGrx1 en su estado reducido y oxidado. Para el

ensayo con la proteína oxidada la misma fue incubada con H_2O_2 5 veces más concentrado que la proteína, por 30 minutos a temperatura ambiente (Figura 21).

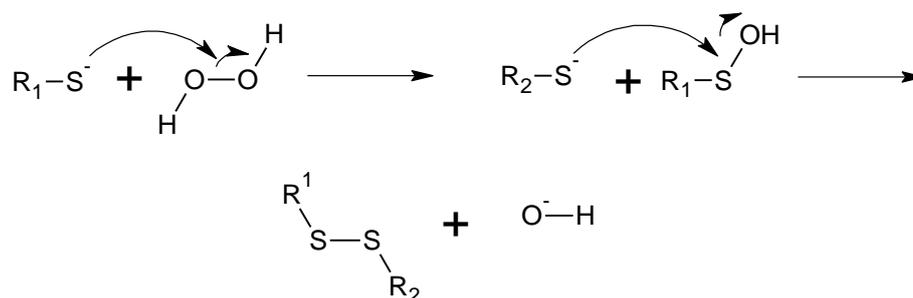


Figura 21: Reacción general de oxidación de tioles con H_2O_2 .

Posteriormente se removió el exceso de oxidante empleando una columna PD10.

3.2.3. Cuantificación de tioles libres con DTDPy

Para la cuantificación de los tioles libres de las proteínas luego de la reducción con DTT, se utilizó la reacción de los tioles con el reactivo 4,4'-ditiodipiridina, que reacciona con los grupos tioles dando como producto 4-tiopiridona, el cual puede detectarse espectrofotométricamente a 324 nm (Figura 22).

Se colocaron en un tubo de 0,5 mL iguales volúmenes de Grx y de DTDPy. Se esperaron 10 minutos y se realizaron espectros de absorción, determinando el valor de absorbancia a 324 nm, correspondiente al máximo del espectro. A partir de este valor se determinó la concentración de 4-tiopiridona ($\epsilon=21400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A partir de la relación entre la concentración de producto y la concentración de proteína se determinó la cantidad de tioles por proteína.

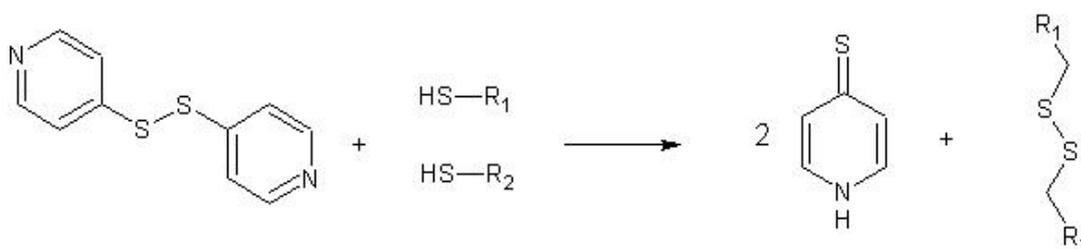


Figura 22: Reacción general de tioles con DTDPy

3.3. Expresión y purificación de las variantes de la *Tb2CGrx1*

Se expresaron y purificaron las variantes C21S, C24S, C21S/C24S y C78S. La 1CGrx1, 2CGrx1 WT y las mutantes *loop* y *loop* + WP habían sido expresadas anteriormente por Karin Grunberg y Bruno Manta, integrantes del grupo de investigación.

Los procedimientos que se van a detallar a continuación fueron llevados a cabo de la misma manera para las cuatro variantes.

Para la expresión de las proteínas recombinantes se partió de crioinóculos almacenados a -80 °C que contenían células de *E. coli* pertenecientes a la cepa BL21(DE3) en medio de cultivo con 15% glicerol. Estas células habían sido previamente transformadas con el plásmido PET-Trx-1b, en el cual se había clonado el gen de las distintas variantes de la 2CGrx1 generando el vector de expresión (Figura 20). Dicho vector posee una cola de histidinas unida a la Trx de *E. coli*, que se continúa con la 2CGrx1 o la variante correspondiente. Entre la Trx y la proteína que se desea expresar se encuentra el sitio de corte para la proteasa TEV. La expresión de esta fusión de proteínas se encuentra regulada bajo el promotor T7. Este vector le confiere a la cepa la resistencia al antibiótico kanamicina.

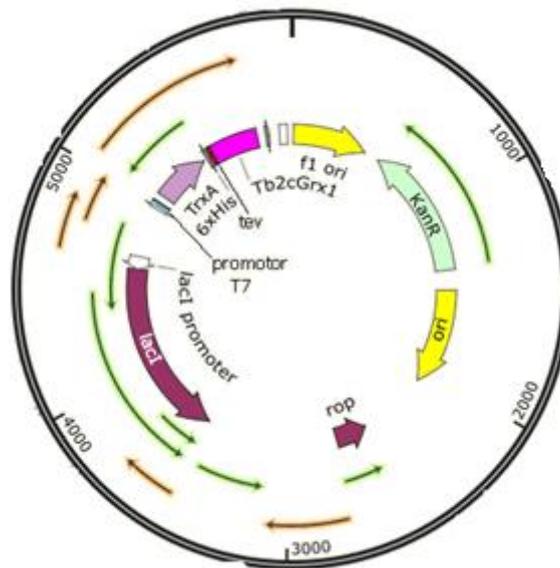


Figura 23: Mapa del vector de expresión PET-Trx-1b con la secuencia de la *Tb2CGrx1* acoplada a la *EcTrx* y a una cola de histidina.

La cepa BL21(DE3) posee el gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *LacUV5*. En presencia de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) se induce la expresión de esta ARN polimerasa, la cual va a llevar a cabo la expresión de los genes que se encuentren bajo control del promotor T7, en este caso el gen de la proteína de interés.

Para comenzar con la expresión de la proteína se realizó un pre-cultivo de la cepa transformante a partir de un inóculo del crioinóculo de bacterias BL21(DE3) transformadas, en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) kanamicina (50 μ g/mL de medio) contenido en tubos de centrifuga de 15 mL, y se incubó a 37 °C, 220 rpm toda la noche.

Luego se inocularon los 5 mL de pre-cultivo en matraces Erlenmeyer de 2 L con 500 mL de medio 2XYT suplementado con kanamicina (50 μ g/mL de medio) y se incubó a 37 °C 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 0.6 - 0.8 U.A.

Cuando se llegó a la DO_{600nm} esperada se indujo la expresión de la proteína con 0.2 mM de IPTG y se incubó a 20 °C, 180 rpm toda la noche.

A continuación se cosecharon las bacterias mediante dos centrifugaciones sucesivas. La primera se realizó a 4000 rpm 15 minutos a 4 °C en un frasco de 1 L que contenía los 500 mL de cultivo. El pellet obtenido se resuspendió en 15 mL de sobrenadante y se pasó a un tubo de centrífuga de 50 mL. Se realizó una segunda centrifugación de 5 minutos a 7000 x g. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en amortiguador de lisis en una relación de 5 mL/g de pellet, para iniciar la lisis bacteriana e inactivar las proteasas. Se continuó con la disrupción de la suspensión celular mediante 3 ciclos de sonicado en baño de hielo con tandas de 1 segundo *on*/1 segundo *off* hasta completar 2 minutos en modo *on*. Luego se agregó 0,01 U/mL de ADNasa y 10 mM MgCl₂ y se centrifugó por 1 hora a 20000 x g para remover los remanentes sólidos de las células. La fracción soluble (lisado) se filtró con filtros de 0,45 µm.

La purificación de las proteínas se realizó por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando columnas HisTrap GE Healthcare de 1 y 5 mL. El lisado se cargó en la columna de IMAC previamente equilibrada con 5 volúmenes de amortiguador A, a un flujo de 1 mL/minuto. Luego se pasaron por la columna 5 volúmenes de amortiguador A, colectándose la fracción que no se unió a la columna (fracción FNU1). A continuación se lavó la columna con 5 volúmenes de amortiguador A al cual se le agregó 20 mM imidazol y se colectó esta fracción (fracción LAV1). Luego se conectó la columna a un equipo ÄKTA FPLC y se eluyó la proteína con un gradiente de amortiguador B hasta llegar a un 30% amortiguador B, 70% amortiguador A, colectándose fracciones de 1 mL a medida que se iba siguiendo la absorbancia a 280 nm en un cromatograma. Se juntaron las muestras que contenían proteína (fracción ELU1). A esta fracción se le agregó la proteasa TEVp (1 mg/ 10 mL de proteína) para separar nuestra proteína de interés de la *EcTrx* y la cola de histidinas, y 5 mM de DTT. El corte se realizó en simultáneo a una diálisis para remover el imidazol, en membrana con tamaño de poro de exclusión de 10 kDa frente a 2 L de amortiguador A a 4 °C toda la noche.

Para finalizar la purificación se realizó una segunda IMAC. La muestra dializada (ELU1 proteolizado) fue filtrada con filtros de 0.45 µm y fue sembrada en una IMAC previamente equilibrada con amortiguador A. El procedimiento fue el mismo que para la primera IMAC, pero en este caso la proteína recombinante se encontró en la fracción no unida a la columna (fracción FNU2), ya que luego del corte con la TEVp perdió la cola de histidina. La *EcTrx* y la TEVp las cuales tenían cola de histidina se eluyeron con un gradiente de 30% amortiguador B (fracción ELU2).

A la fracción no unida de esta segunda IMAC se la trató con 5 mM de EDTA y 5 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente para luego concentrarla por ultrafiltración hasta obtener la proteína de interés en un volumen de aproximadamente 5 mL. Finalmente se realizó una última purificación junto con un cambio de amortiguador mediante una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna PD-10 GE Healthcare, previamente equilibrada con amortiguador SEC y se colectó la proteína mediante la elución con el mismo amortiguador. La proteína pura se separó en alícuotas que fueron almacenadas en tubos de 2 mL a -80 °C.

Para ir siguiendo la purificación y determinar tanto el rendimiento como el grado de pureza de las fracciones obtenidas, estas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE al 15%. Además el

contenido proteico de las fracciones se determinó mediante espectrofotometría a 280 nm, teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar de las proteínas expresadas es de $11460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una vez finalizada la purificación, la identidad de las proteínas fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

3.4. Obtención del pKa de la cisteína reactiva por fluorescencia intrínseca

Para obtener las constantes de ionización de la cisteína 21 para las diferentes proteínas se procedió a obtener espectros de emisión de fluorescencia de las mismas a distintos pHs. Para emplear esta metodología se tuvo en cuenta que todas las proteínas tienen uno o dos residuos de triptofano. La 2CGrx1, las variantes de las cisteínas, y la 2CGrx1 + *loop*, contienen un triptofano (Trp 18) cercano a la cisteína 21. La 2CGrx1 + *loop* + WP, además del Trp 18 contiene el Trp del motivo WP, el cual también se encuentra cercano al sitio activo. La 1CGrx1 solamente posee el Trp perteneciente al motivo WP. Debido a la cercanía del Trp 18 a la cisteína 21, se supone que su emisión va a estar afectada por la ionización de esta cisteína. Para la 1CGrx1 la fluorescencia del Trp del motivo WP probablemente esté determinada por la ionización de la única cisteína del sitio activo, que es la cisteína 104.

Para este ensayo se preparó 1 mL de proteína $2 \mu\text{M}$ en amortiguador TMA, y se agregó $100 \mu\text{M}$ DTT para reducirla. Se esperaron 30 minutos antes de comenzar con las medidas para que la reducción de la proteína fuera completa.

Luego se prosiguió a tomar espectros de emisión de la proteína, excitando a 280 nm y registrando la emisión del triptófano en un rango de 290 nm a 430 nm empleando un fluorómetro CHRONOS FD. El procedimiento fue el siguiente; se agregaron a la muestra que contenía la proteína $5 \mu\text{L}$ de una solución stock de HCl 90 mM, se registró el espectro de emisión, y luego se midió el pH de la muestra. Esto se continuó hasta que el pH de la muestra fue de aproximadamente 4 unidades.

Finalmente se graficó la dependencia de la intensidad del máximo de emisión y del centro de masa del espectro en función del pH.

El centro de masas se determinó según la ecuación 1:

$$\frac{\sum_i IF_i \lambda_i}{\sum_i IF_i} \quad (1)$$

Donde IF_i es la intensidad de fluorescencia a cada longitud de onda, λ_i .

La dependencia con el pH de la intensidad de fluorescencia y del centro de masa se ajustó a una sigmoide (ecuación 2), obteniéndose de este ajuste el pKa de la cisteína.

$$y = \frac{A}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]}} + \frac{B}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}} \quad (2)$$

Donde A corresponde al valor que alcanza la intensidad de fluorescencia o el centro de masa cuando la cisteína se encuentra en su forma tiol y B corresponde a estos valores para la cisteína en su forma tiolato. K_{a1} es la constante de acidez.

3.5. Determinación de constante de velocidad de la reacción entre el monobromobimano y cisteínas proteicas

Con el objetivo de determinar la constante de velocidad de segundo orden entre el mBBr y las cisteínas de las glutarredoxinas se llevó a cabo la reacción en condiciones de pseudo-primer orden con mBBr en exceso. La reacción se siguió a partir del cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína, excitando la muestra a 280 nm y siguiendo la emisión en el tiempo a 340 nm, utilizando un fluorómetro CHRONOS FD. A medida que la proteína reacciona con el mBBr se produce un descenso de la fluorescencia del Trp. Esto se debe a dos factores. Por un lado, el tioéter formado apaga la fluorescencia del Trp de la proteína; por otro, debido a que el espectro de emisión del Trp se solapa con el de excitación del tioéter, se produce FRET: el Trp transfiere parte de su energía al producto de la reacción y su emisión disminuye.

Para realizar este ensayo, 200 μ L de proteína fueron reducidos con DTT según se detalló en la sección 3.2.1. Para remover el exceso de reductor y realizar el cambio de amortiguador la proteína se cargó en una columna PD-10 y se eluyó con amortiguador TMA.

Para la 2CGrx1 WT también se llevó a cabo el experimento con su sitio activo oxidado, es decir, con su cisteína 21 y 24 formando un enlace disulfuro, y la cisteína 78 disponible para ser alquilada. Para esto se oxidó la proteína con una concentración 5 veces mayor de H_2O_2 y luego de 30 minutos se pasó por una PD-10.

Se prepararon muestras de 3 mL que contenían la proteína en una concentración de 1 μ M y diferentes concentraciones de mBBr en exceso, cuyo rango variaba para cada proteína, ya que para poder seguir las reacciones lentas se tuvo que usar una mayor concentración de mBBr que en el caso de las proteínas que tenían una cinética más rápida.

Para las proteínas que reaccionaban lentamente, las concentraciones de mBBr empleadas fueron de entre 160 μ M y 1.5 mM aproximadamente, mientras que para las proteínas que reaccionaban más rápido el rango de concentraciones fue de 16 μ M a 50 μ M.

Al finalizar cada ensayo se midió el pH de la muestra.

Para cada concentración se realizaron cuatro corridas. Los gráficos de intensidad de fluorescencia en función del tiempo se ajustaron a una función de primer orden o exponencial simple (ecuación 3),

$$F = amp * \exp(-k_{obs} * t) + A_{inf} \quad (3)$$

donde amp es la fluorescencia final menos la inicial, k_{obs} es la constante de velocidad de pseudo-primer orden, t es el tiempo y A_{inf} es la fluorescencia una vez completada la reacción.

Una vez graficadas las k_{obs} en función de las concentraciones de mBBr, se ajusta a una recta (ecuación 4),

$$k_{obs} = k_{app}[mBBr] + C \quad (4)$$

que permite obtener de la pendiente de la recta, la constante de velocidad de segundo orden aparente (k_{app}) ya que depende del pH de la reacción.

3.5.1. Preparación de la muestra para su análisis por espectrometría de masa

Luego del ensayo de alquilación con mBBr de la 2CGrx1 oxidada se procedió a analizar la muestra por espectrometría de masa para corroborar la identidad de la cisteína alquilada.

Para esto se oxidó la proteína con H_2O_2 como se describe en la sección 3.2.2 y se cuantificaron tioles, verificando que el sitio activo haya sido completamente oxidado. A continuación se agregó a la muestra mBBr en una relación de 1:1 mBBr:proteína y se esperó el tiempo necesario para que la reacción se completara. Este tiempo fue determinado a partir de la constante aparente determinada para la 2CGrx1 oxidada y las concentraciones a emplear utilizando el programa de simulaciones Gepasi. Luego de transcurrido el tiempo de espera se detuvo la reacción con el agregado de iodoacetamida 10 veces en exceso con respecto a la concentración de proteína. La muestra fue analizada por espectrometría de masa MALDI-TOF.

3.6. Dependencia de la velocidad inicial de la reacción entre el monobromobimano y cisteínas proteicas con el pH

Este ensayo fue necesario para cumplir con el objetivo principal de esta tesina, que era la obtención de las constantes independientes del pH que nos permitieran comparar nucleofilia inespecífica de la cisteína 21 entre las distintas proteínas estudiadas.

Por otra parte, la reacción de alquilación se da entre el mBBr y la forma desprotonada del tiol (tiolato), por lo que la velocidad de esta reacción posee una marcada dependencia con el pH, permitiendo que se puedan determinar los pKas de las cisteínas a partir de la reactividad diferencial de la forma tiol y la forma tiolato. En la sección 3.4 se describió una metodología para determinar el pKa de la cisteína 21 a partir de un cambio en el espectro de fluorescencia del Trp vecino a la misma. Sin embargo, existen otros residuos en el entorno del Trp que pueden estar afectando su fluorescencia, por lo que este método aunque es sensible, no es específico. Por lo tanto se debió utilizar un método complementario para determinar el pka de la cisteína 21. Como se mencionó anteriormente en las condiciones de trabajo este método es específico para cisteínas.

Al igual que en el ensayo detallado en la sección anterior, para seguir esta reacción se empleó el FRET entre el Trp de la proteína y el producto de la reacción de alquilación. Sin embargo, en este caso se siguió el aumento de la fluorescencia del tioéter a 482 nm a partir de la excitación del Trp a 280 nm. A medida que ocurre la reacción el Trp transfiere parte de su energía al tioéter y el mismo se excita observándose un aumento en la emisión de fluorescencia del producto.

El procedimiento comenzó con la reducción de la proteína con exceso de DTT y la remoción del mismo con una cromatografía en PD-10.

Las medidas se realizaron en placas de 384 pocillos para fluorescencia en un equipo Varioskan.

Las reacciones se llevaron a cabo a concentración constante de proteína (1–2 μM) y de mBBr (1 μM), variando el pH de la solución. Para esto se prepararon soluciones de HCl y NaOH 70 mM y se sembraron en los pocillos según lo especifica la tabla II.

Tabla II. Patrón de sembrado de HCl y NaOH en la placa de 384 pocillos

Pocillo	HCl (μL)	NaOH (μL)
A (1-4)	40	-
A (5-8)	36	-
B (1-4)	33	-
B (5-8)	30	-
C (1-4)	27	-
C (5-8)	24	-
D (1-4)	20	-
E (1-4)	15	-
F (1-4)	10	-
G (1-4)	5	-
H (1-4)	-	-
I (1-4)	-	5
J (1-4)	-	10
K (1-4)	-	15
L (1-4)	-	20
M (1-4)	-	25
N (1-4)	-	30
O (1-4)	-	35
P (1-4)	-	40

En cada pocillo se sembró 25 μL de proteína y 25 μL de amortiguador TMA 2X. El pocillo se completó con el volumen de agua destilada necesaria para alcanzar los 100 μL . La reacción se disparó con el agregado de 10 μL de mBBr 10 μM , usando el sistema de inyección automático del Varioskan. Los cambios de fluorescencia para cada condición de pH se registraron por cuadruplicado.

El valor de pH en cada condición fue determinado con un microelectrodo luego de cada experimento.

De las curvas obtenidas se tomaron los primeros puntos y se ajustaron a una recta, cuya pendiente es directamente proporcional a la velocidad inicial de la reacción que se asume que depende linealmente con la disponibilidad de tiolato a cada pH. Las curvas de velocidad inicial en función del pH se ajustaron a curvas de ionización de 1, 2 o 3 componentes.

3.6.1. Obtención de constantes las de velocidad independientes del pH como indicador de nucleofilia

Una vez obtenido el perfil de pH de las velocidades iniciales de la reacción, y la constante aparente a cierto pH, se determinó la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH de la siguiente manera:

Primero se obtuvo un factor de proporcionalidad entre la velocidad inicial y la k_{app} a un pH determinado (el pH al cual se obtuvo la k_{app}) (ecuación 5):

$$FP = \frac{k_{app}(pH=x)}{v_i(pH=x)} \quad (5)$$

Luego utilizando los valores de las velocidades iniciales en función del pH y este factor de proporcionalidad fue posible extrapolar k_{app} en todo el intervalo de pH (ecuación 6):

$$k_{app}(pH = x_1) = FP * v_i(pH = x_1) \quad (6)$$

El gráfico de k_{app} en función del pH se ajustó a una función con uno, dos o tres equilibrios de ionización. De este ajuste se obtuvo la constante de velocidad independiente del pH (k_{RS^-}), que se relaciona directamente con la nucleofilia del tiol.

4. Resultados

4.1. Expresión y purificación de las variantes C21S, C78S, C24S y C21S/C24S de la 2CGrx1 de *T. brucei*.

La expresión y purificación de las variantes de la 2CGrx1 en las cuales se reemplazaron cisteínas por serinas fue llevada a cabo de acuerdo a lo descrito en el apartado de materiales y métodos en la sección 3.1.

El contenido de las fracciones obtenidas durante la purificación de las proteínas recombinantes se evaluó mediante SDS-PAGE al 15%.

En la figura 24 se observan los geles que corresponden a las fracciones obtenidas durante la purificación de las distintas variantes.

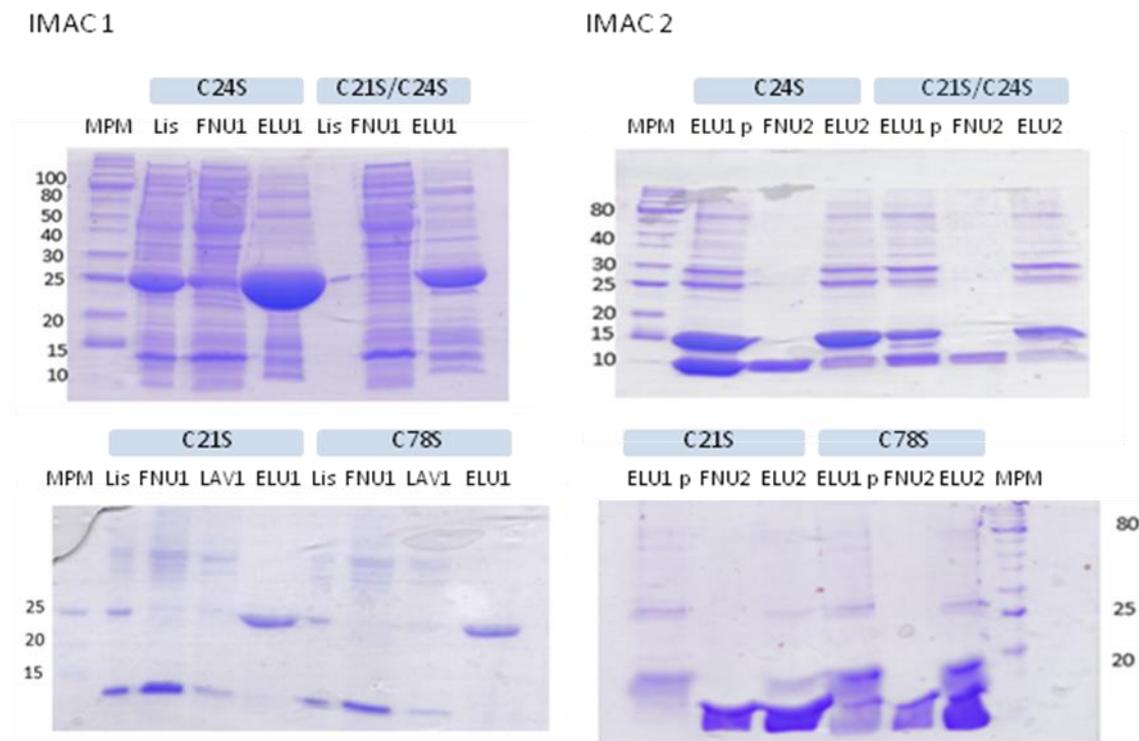


Figura 24: SDS-PAGE 15% correspondientes a la purificación de la C24S, C21S/C24S, C21S y C78S. En los geles que se muestran a la izquierda se corrieron las muestras que se obtuvieron luego de la primer IMAC, en los de la derecha se corrieron las muestras de la segunda IMAC. Lis: lisado, FNU: fracción no unida, LAV: lavado, ELU: eluido, ELUp: eluido proteolizado, MPM: marcador de peso molecular P77035 (10 – 250 kDa) New England BioLabs.

Como se esperaba, durante la primera IMAC nuestra proteína de interés se encontró en el eluido 1 (fracción ELU1), ya que la misma se expresó junto con una cola de histidinas cuyo grupo imidazol tiene afinidad por el níquel de la columna. Esto se observa en los geles de la primera IMAC donde en el eluido 1 predomina una banda de 25 kDa que corresponde al peso de la Grx de *T. brucei* fusionada a la Trx de *E. coli* y una cola de 6 histidinas. Esta fracción se tomó para ser digerida por la proteasa TEV y posteriormente sembrarla en una segunda columna de IMAC para finalmente obtener la Grx pura.

Al ser digerida por la proteasa TEV, la Grx se separa de la Trx y la cola de histidinas, dejando de ser afín a la matriz de la columna. Al ser el único componente de la fracción ELU 1 que perdió su afinidad por la columna, se esperaba obtener la Grx pura durante la segunda IMAC en la fracción no unida a la columna. A su vez, tanto la Trx de *E. coli* como la proteasa TEV se encuentran unidas a colas de histidinas, por lo que no van a contaminar la muestra en la que se encuentre la Grx.

En los genes correspondientes a la segunda IMAC se observan en el carril del eluido 1 proteolizado (ELU1p) dos bandas predominantes de 14 y 10,5 kDa que concuerdan con los pesos moleculares de la Trx y la Grx, respectivamente. La banda de 25 kDa que se observa en este carril posiblemente corresponda a la proteasa TEV, ya que concuerda con su peso molecular, aunque también podría corresponder a la fusión His-Trx-Grx, en caso que el corte con la proteasa no haya sido del todo eficiente. La Grx eluyó pura en la fracción no unida 2 (FNU2), en la cual se observa una banda de aproximadamente 10,5 kDa. En la fracción eluida 2 (ELU2) se observan las mismas bandas que las obtenidas en el eluido 1 proteolizado. Aunque se esperaba que la proteasa TEV y la Trx eluyeran en esta fracción ya que ambas poseen una cola de histidinas, no se esperaba encontrar en esta fracción a la Grx. Esto se puede deber a que la Grx interactúa con alguno de los componentes de la muestra sembrada a la columna y hasta que eluyen en la fracción ELU2. Estos patrones de banda se observan en ambos geles, sin embargo en el gel correspondiente a la purificación de C21S y C78S, la banda de 10,5 kDa que se obtuvo en la fracción eluida 2 es de igual o mayor densidad que la misma banda en la fracción no unida 2, lo que indica que durante la segunda IMAC se perdió una cantidad importante de Grx.

La fracción utilizada para realizar los ensayos fue la fracción no unida 2, ya que fue la fracción de mayor pureza.

La identificación de las proteínas se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF y la concentración proteica se determinó mediante absorbancia. Se obtuvieron aproximadamente 6 mL de proteína con concentraciones de 102 μ M para la C21S y la C78S, 50 μ M para la C21S/C24S y 220 μ M para la C24S.

[4.2. Determinación del pKa de la cisteína 21 por fluorescencia intrínseca](#)

Como se mencionó en la sección 3.4 de materiales y métodos, el pKa de la cisteína 21 se determinó en primera instancia a partir del cambio con el pH en la intensidad de fluorescencia y en el centro de masa del espectro de emisión de la Grx.

Para cumplir con este objetivo se registraron espectros de emisión del Trp excitando a 280 nm y siguiendo la emisión de fluorescencia. Para tomar los espectros se utilizaron muestras a las cuales se les varió el pH en un rango de 3 a 8 aproximadamente. A partir de estos espectros se graficó la dependencia con el pH tanto de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda fija como del centro de masa del espectro.

En la figura 25 se muestran los espectros obtenidos para la 2CGrx1 WT. Cada espectro se registró a un pH distinto. Los espectros que alcanzan las intensidades más altas corresponden a pH más básicos.

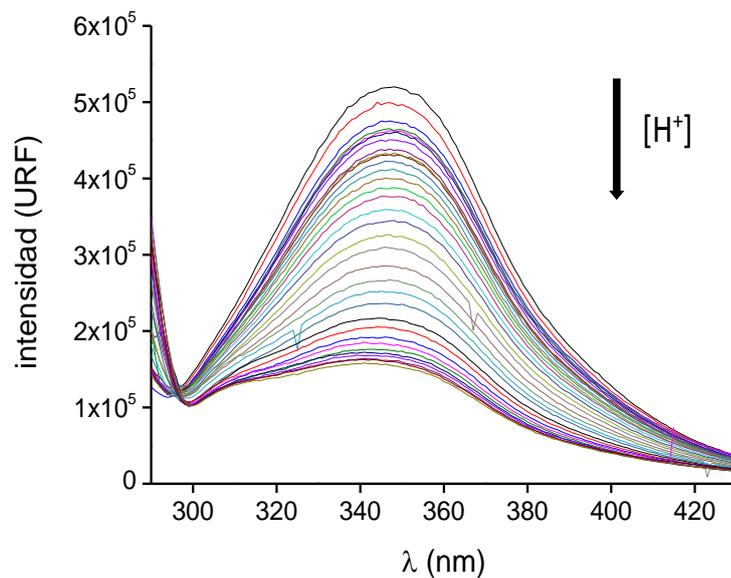
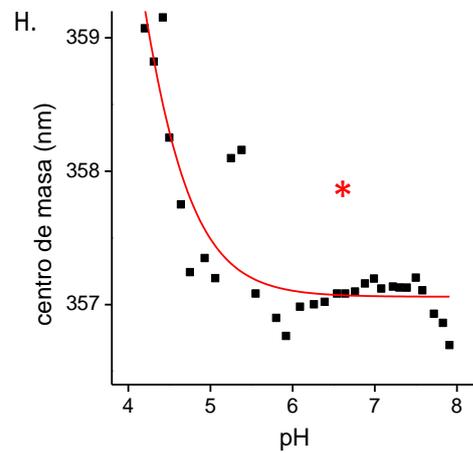
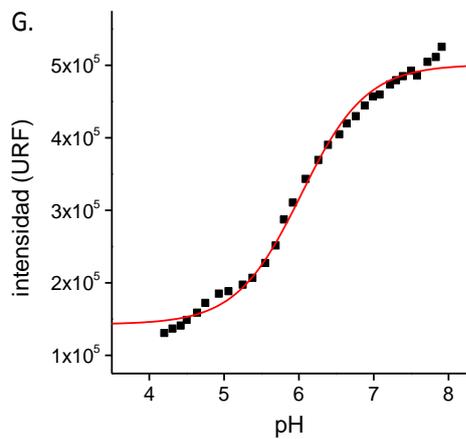
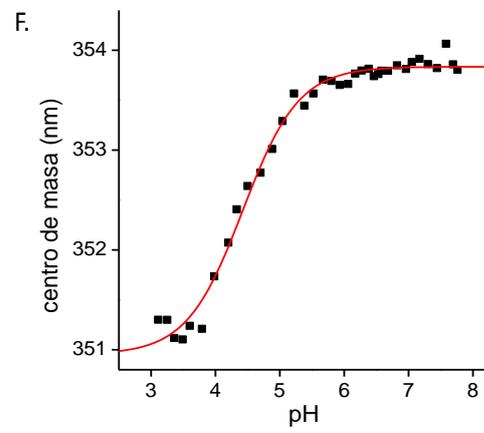
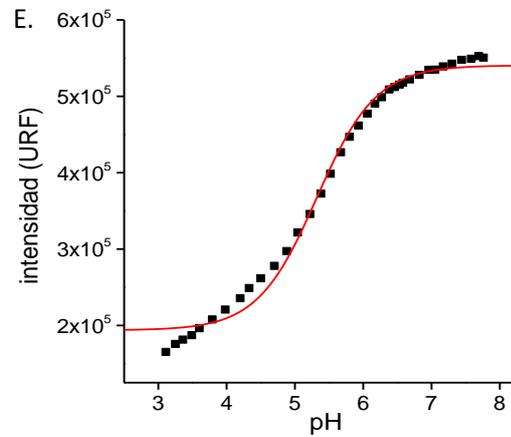
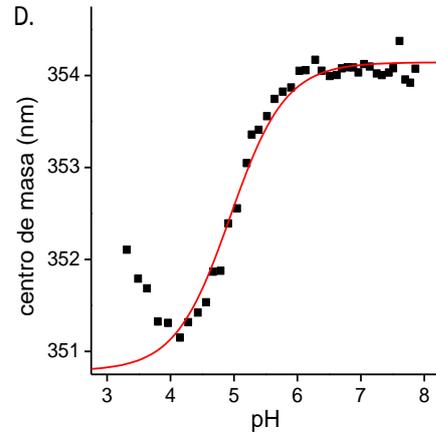
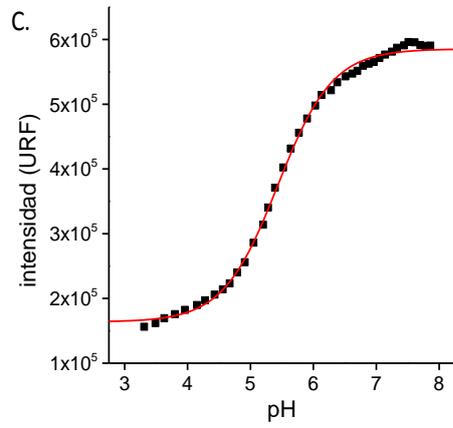
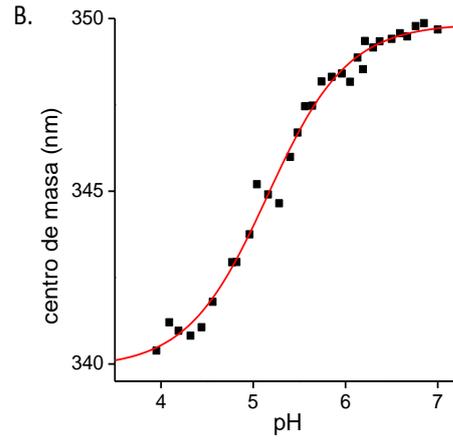
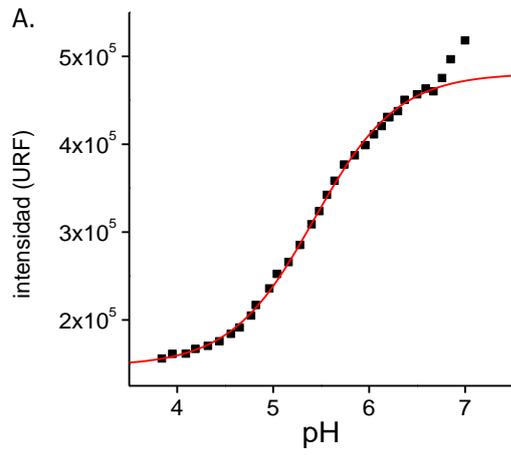


Figura 25: Espectros de emisión de la 2CGrx1 WT tomados en un rango de pH de 3 a 8.

Para todas las proteínas se observó un máximo alrededor de los 345 nm, por lo que para realizar los gráficos de intensidad vs pH se eligió la intensidad de fluorescencia correspondiente a esta longitud de onda. H^+

En la figura 26 se muestran las curvas de fluorescencia en función del pH obtenidas para las diferentes glutarredoxinas estudiadas. A la izquierda se encuentran los gráficos de intensidad de fluorescencia en función del pH, a la derecha se observan los gráficos del centro de masa en función del pH.



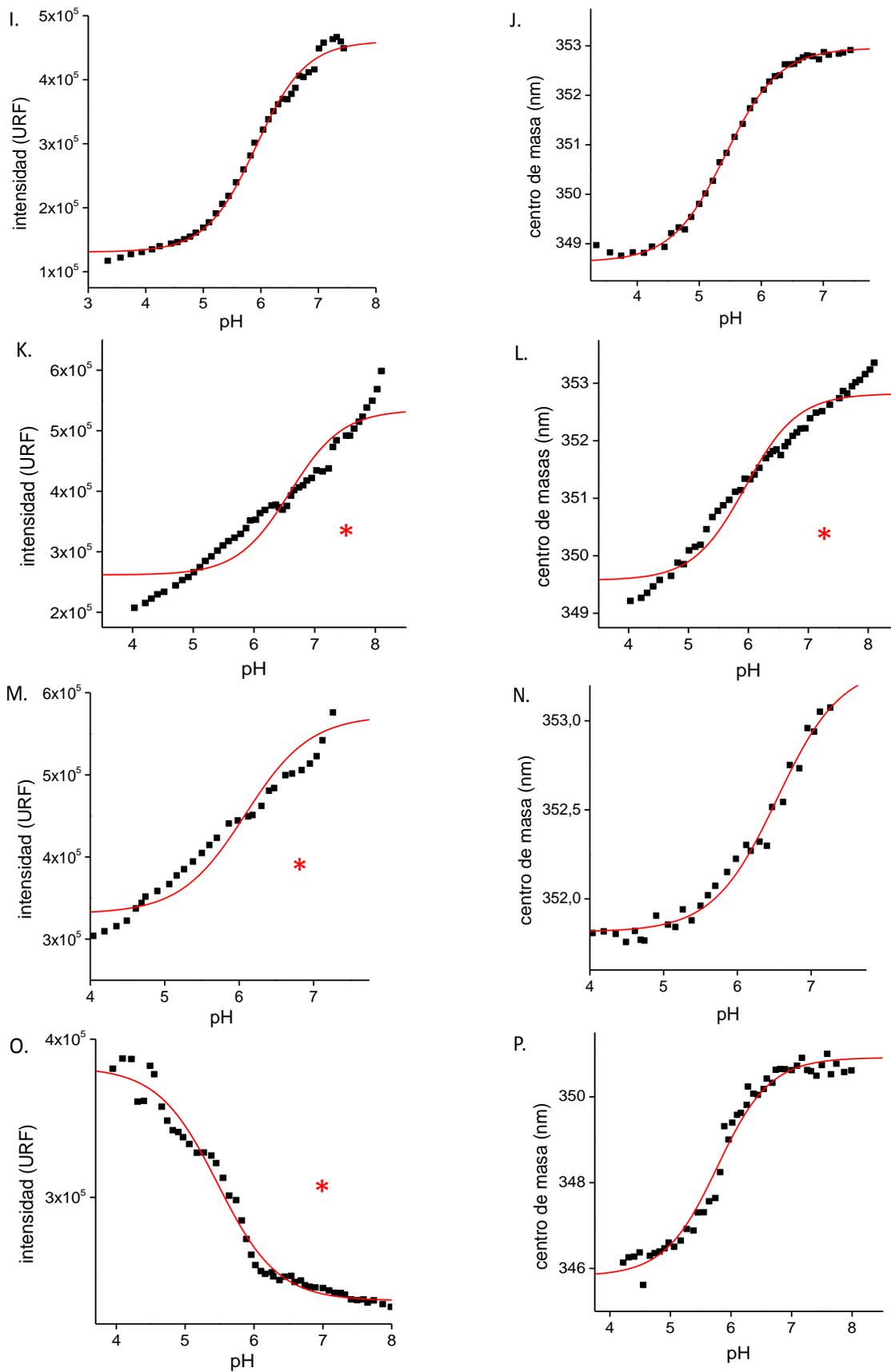


Figura 26: Dependencia de la intensidad de fluorescencia y del centro de masas con el pH de la muestra. **A, B.** 2CGrx1 WT; **C, D.** 2CGrx1 C78S; **E, F.** 2CGrx1 C21S; **G, H.** 2CGrx1 C21S/C24S; **I, J.** 2CGrx1 C24S; **K, L.** 2CGrx1 + loop; **M, N.** 2CGrx1 + loop + WP; **O, P.** 1CGrx1 WT. Las curvas marcadas con asteriscos no presentaron un buen ajuste por lo que los pKas obtenidos no fueron considerados en la discusión de resultados.

Para las proteínas que presentaron tendencia sigmoide las curvas se ajustaron a una ecuación de 1 pKa (ecuación 2).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.

Tabla III. pKa por intensidad de fluorescencia y por centro de masa de la 1CGrx1, la 2CGrx1 y las variantes.

Glutarredoxina	pKa por intensidad	pKa por centro de masas
2CGrx1 WT	5,42 ± 0,01	5,15 ± 0,04
C78S	4,94 ± 0,05	5,43 ± 0,01
C21S	4,42 ± 0,04	5,32 ± 0,03
C21S/C24S	6,03 ± 0,03	-----
C24S	5,91 ± 0,03	5,42 ± 0,01
<i>loop</i>	-----	-----
<i>loop</i> + WP	-----	6,08 ± 0,13
1CGrx1	-----	5,77 ± 0,04

A partir de los gráficos correspondientes a la 2CGrx1 WT (figuras A y B) se obtuvieron pKas de 5,42 y 5,15 por intensidad y por centro de masas respectivamente. En un principio se podría suponer que el residuo responsable del cambio de fluorescencia observado en la proteína es la cisteína 21. Esta suposición se basa por una parte, en que la cisteína 21 es la cisteína más cercana en el espacio al triptofano de la proteína. Por otra parte, la cisteína 21 es la cisteína amino-terminal de una glutarredoxina, y por la evidencia previa, como se mencionó en la introducción, esperamos que sea una cisteína ácida. Sumado a esto, nuestro grupo de investigación había determinado previamente el pKa de esta cisteína mediante la dependencia con el pH de la constante de velocidad de segundo orden de la reacción de reducción del GSSG (Manta *et al*, en preparación). Este método es específico para la cisteína 21 ya que esta es la cisteína que realiza el ataque nucleofílico sobre el GSSG siendo este el único paso de orden 2 en la reacción entre la Grx y el GSSG. El pKa obtenido por esta metodología fue de 5,15 ± 0,05, valor que coincide con el pKa determinado en este experimento por centro de masa vs pH y se encuentra cercano al determinado por intensidad vs pH. De todas formas, para confirmar nuestra hipótesis es necesario el análisis de los resultados que se muestran a continuación.

En las figuras C y D se observan las curvas de pKa de la 2CGrx1 C78S. Para la misma se obtuvieron pKas de 4,94 y 5,43. El valor de 5,43 puede considerarse igual al obtenido por intensidad de fluorescencia para la 2CGrx1 WT si se toman en cuenta los errores de ambos valores. En todo caso, los cuatro valores de pKa obtenidos para estas proteínas son muy similares entre sí.

En este ensayo la 2CGrx1 C21S (figuras E y F) y la C21S/C24S (Figuras G y H) pueden considerarse controles negativos ya que ambas tienen reemplazada la cisteína de

interés por una serina. Para la curva de centro de masa vs pH de la variante C21S se obtuvo un buen ajuste a una sigmoide con un valor de pKa de 5,32. Para las curvas de intensidad vs pH de ambas variantes el ajuste no fue bueno, pero de todas formas se observó una leve tendencia sigmoide, por lo que fueron ajustadas a curvas de 1 pKa obteniéndose como resultado para la C21S un pKa de 4,42 y para la C21S/C24S un pKa de 6,03. La curva de centro de masa vs pH de la C21S/C24S no presentó una forma sigmoide por lo que el valor de pKa obtenido a partir del ajuste no fue tomado en cuenta. Es claro, a partir de estos resultados, que existe un cambio en la fluorescencia del triptofano con el pH aun en ausencia de la cisteína 21. Debido al valor de pKa obtenido a partir de la curva de centro de masa vs pH de la variante C21S de 5,32 que es similar a los valores obtenidos para la 2CGrx1 WT y C78S se puso en duda que el residuo cuya ionización es responsable de la variación de la fluorescencia observada en la 2CGrx1 WT y C78S sea la cisteína 21.

Para la 2CGrx1 C24S (figuras I y J) se obtuvieron pKas de 5,91 y 5,42. El pKa obtenido a partir de la curva de centro de masa vs pH coincide exactamente el pKa determinado por intensidad vs pH para la WT. Sin embargo en general los valores de pKa determinados para la C24S resultaron entre 0,3 y 0,4 unidades más altos que los valores obtenidos para la 2CGrx1 WT. En caso que este pKa correspondiera a la cisteína 21 este resultado indicaría que la ausencia de la cisteína 24 provoca un leve aumento en el pKa de la cisteína 21. Esto significaría que la cisteína 24 es importante para que haya una mayor proporción de la forma tiolato de la cisteína 21 a pH fisiológico.

Tres de las cuatro curvas de pKa de la 2CGrx1 + *loop* y 2CGrx1 + *loop* + WP (figuras K, L y M) no mostraron tendencias sigmoideas, por lo que no se lograron obtener valores de pKa. A excepción del gráfico N, correspondiente a la dependencia del centro de masa con el pH de la variante *loop* + WP, en la cual el ajuste fue mejor que en los otros casos y se obtuvo un pKa de 6,08.

La dificultad para obtener curvas de pKa para la variante *loop* + WP puede explicarse porque esta proteína posee dos residuos de Trp (Trp 18 y Trp del motivo WP) y ambos se encuentran cercanos a la cisteína de interés. Por lo que no se está observando el cambio en el espectro de un solo Trp sino que se observa el de dos residuos cuyas propiedades espectrales pueden comportarse de manera distinta debido a que su entorno proteico no es el mismo.

Finalmente para la 1CGrx1 (figura O y P) se logró obtener un valor de pKa a partir de la dependencia del centro de masa con el pH, pero no del gráfico de intensidad vs pH. El pKa obtenido para la misma fue de 5,77, y se supone que este valor corresponde a la cisteína 104, que es la cisteína del sitio activo y se encuentra cercana al residuo de Trp del motivo WP. Este valor se encuentra dentro de uno de los valores de pKa determinado para la cisteína 104 de esta proteína a partir de la reactividad diferencial entre el grupo tiol y tiolato con mBBR por el grupo de Sardi y col, que fue de $5,6 \pm 0,2$ [47].

A partir de los gráficos de centro de masa en función del pH se puede observar que para la 2CGrx1 WT el valor del centro de masa a pH neutro es de 350 nm, mientras que para las variantes este valor se encuentra entre 353 y 357. Esto indica que en la 2CGrx1

WT el Trp responsable de la fluorescencia de la proteína se encuentra menos expuesto que en las variantes, lo que sugiere que la estructura en los entornos del sitio activo de la 2CGrx1 se encuentra más compacta que en las variantes. En las variantes se da cierto despliegue de la estructura ocasionando que el Trp 18 se encuentre más expuesto al solvente. En la 1CGrx1 el centro de masa a pH 7 es también de 350 nm. Por otra parte el cambio en el centro de masa de la 2CGrx1 al pasar de pH 4 a pH 7 es de 10 nm mientras que para las variantes este delta es de entre 2 y 4 nm lo que indica que el Trp en la 2CGrx1 WT es más sensible al cambio que ocasiona el pH en su entorno y posiblemente más sensible al cambio en el estado de ionización de la cisteína 21.

La discusión de estos resultados será retomada más adelante luego de haber analizado los valores de pKa obtenidos mediante alquilación de las cisteínas con mBBR.

4.3. Reducción de tioles con DTT

Antes de comenzar con los ensayos cinéticos se pusieron a punto las condiciones en que serían reducidos los tioles de las proteínas.

La reducción se llevó a cabo de acuerdo con lo especificado en la sección 3.2.1 de materiales y métodos.

Para verificar que en estas condiciones se reducían todos los tioles de las glutarredoxinas, se midió la concentración de tioles a partir de su reacción con DTDPy.

Los resultados obtenidos a partir de este ensayo se muestran con un gráfico de barras en la figura 27.

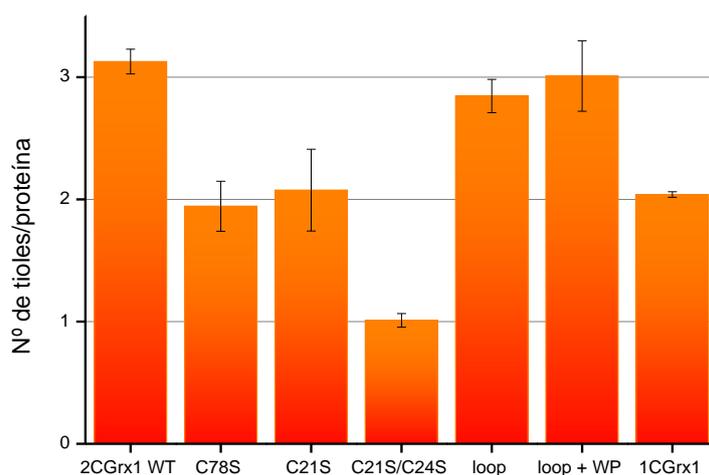


Figura 27: Gráfico de barras que muestra la cantidad de tioles obtenidos por proteína luego de su reducción con DTT y cuantificación con DTDPy.

De esta figura se concluye que la reducción de las cisteínas fue completa y por lo tanto en los siguientes ensayos se utilizó la misma concentración de DTT y la reducción se llevó a cabo durante 30 minutos. De todos modos antes de comenzar cada ensayo se cuantificaron los tioles de las proteínas.

4.4. Determinación de la constante de velocidad de segundo orden de la reacción entre la cisteína 21 y monobromobimano

Luego de determinar el pKa de la cisteína reactiva, el siguiente objetivo era la obtención de la constante de velocidad de la reacción entre la misma y mBBr (reacción de alquilación) a un pH fijo. Esta reacción es de segundo orden y la constante de la reacción es una constante aparente ya que depende del pH al cual se encuentra la muestra.

Para cumplir con este objetivo se siguió el descenso en la intensidad de fluorescencia de la proteína a 340 nm debido al FRET entre el triptofano de la glutarredoxina y el producto de alquilación de las cisteínas con mBBr.

Se trabajó en condiciones de pseudo primer orden. Para cada ensayo se utilizó una concentración fija de proteína y concentraciones variables de mBBr en exceso.

El ajuste de los datos a exponenciales simples permitió obtener valores de constantes de pseudo primer orden (k) para cada una de las concentraciones de mBBr ensayadas.

Este ensayo además de ser realizado con las proteínas reducidas, también fue llevado a cabo con la 2CGrx1 WT con su sitio activo oxidado, tal como se especificó en la sección 3.2.2 de metodología. Luego de oxidar la proteína se cuantificaron tioles con DTDPy. Se obtuvo un valor de 1 tiol por proteína, lo que indicó que la oxidación del sitio activo había sido completa. Este ensayo se realizó con el objetivo de ser empleado como un control de la variante C21S/C24S ya que al igual que en esta variante, la única cisteína capaz de ser alquilada por el mBBr es la cisteína 78.

En la figura 28 se muestran las curvas exponenciales obtenidas para la reacción de la 2CGrx1 WT con diferentes concentraciones de mBBr. Cada exponencial es un promedio de cuatro curvas registradas a la misma concentración de mBBr. Como control negativo se utilizó una muestra sin mBBr.

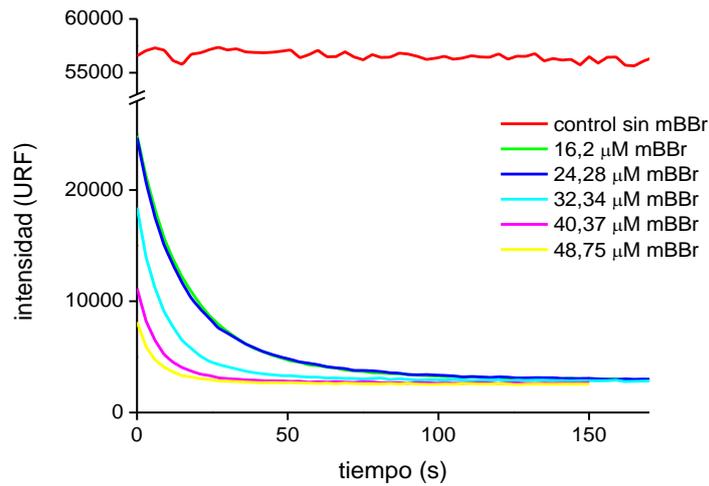
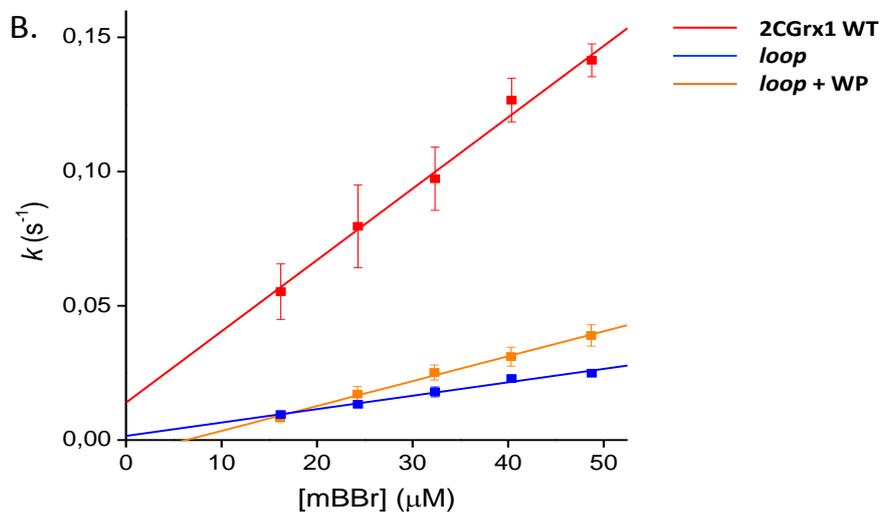
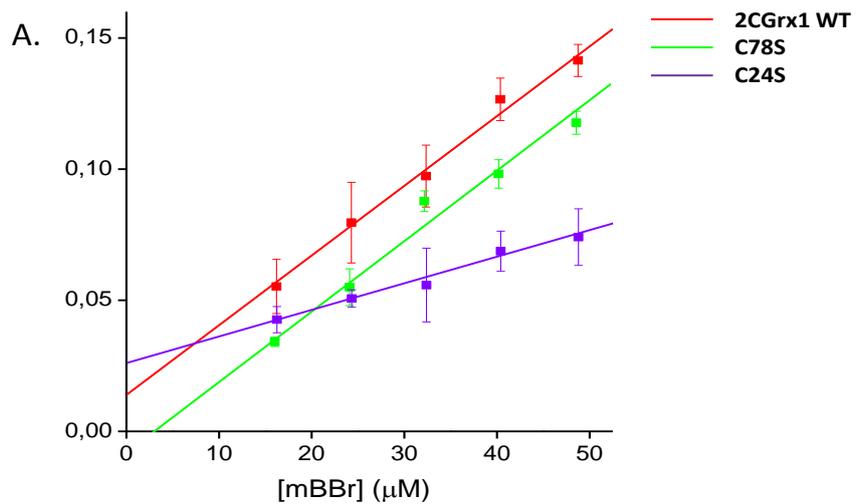


Figura 28: Cursos temporales de la reacción entre la 2CGrx1 WT y mBBR. λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 340 nm.

Las constantes de pseudo primer orden se graficaron en función de la concentración de mBBR (Figura 29). Las curvas se ajustaron a rectas y de los valores de las pendientes se obtuvieron las constantes de segundo orden (k_{app}).



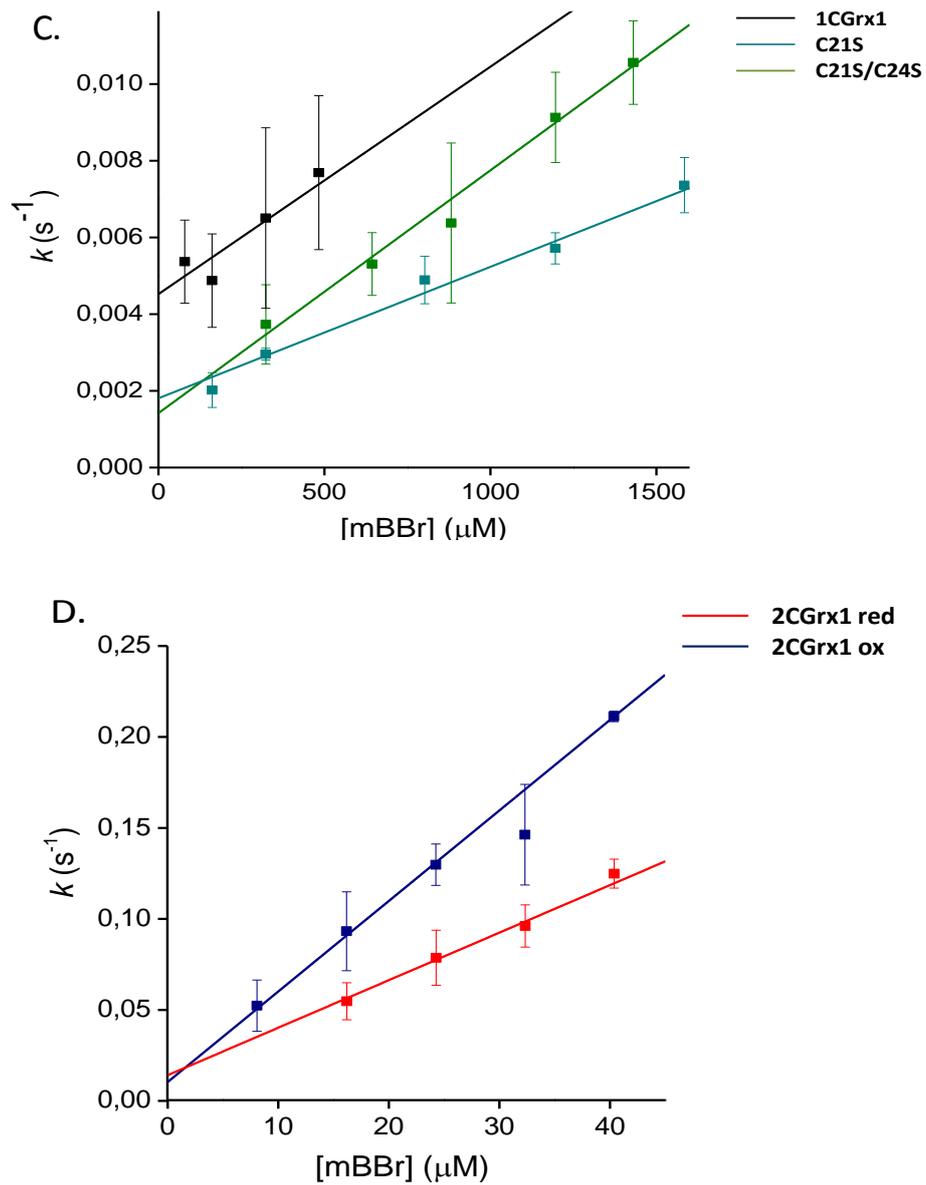


Figura 29: Gráficos de la dependencia de las constantes de pseudo primer orden de la reacción entre las Grx y mBBr con la concentración de mBBr. **A.** 2CGrx1 WT, C78S, C24S; **B.** 2CGrx1 WT, *loop*, *loop* + WP; **C.** 1CGrx1, C21S, C21S/C24S; **D.** 2CGrx1 reducida, 2CGrx1 con su sitio activo oxidado.

Las constantes de segundo orden obtenidas a partir del mejor ajuste se resumen en la tabla IV.

Tabla IV. Constantes de velocidad de segundo orden (en unidades de $M^{-1} s^{-1}$) y pH al cual fueron determinadas, para las distintas proteínas en estudio.

Glutarredoxina	k_{app} ($M^{-1}s^{-1}$)	pH
2CGrx1 WT	2567	7,22
2CGrx1 ox	4975	7,20
C78S	2687	7,19
C21S	3,43	7,19
C21S/C24S	6,33	7,17
C24S	1014	7,20
<i>loop</i>	499	7,15
<i>loop</i> + WP	927	7,22
1CGrx1	6,59	7,21

Si se comparan los valores de k_{app} de la 2CGrx1 WT y las variantes en las que se reemplazaron cisteínas por serinas, para las Grx que tienen la cisteína 21 (2CGrx1 WT, C78S y C24S), se obtuvieron constantes aparentes del orden de 10^3 , mientras que para las que tenían su cisteína 21 reemplazada (C21S y C21S/C24S), las constantes aparentes obtenidas fueron menores que 10. Esto indica que la reacción que estamos observando en el caso de la 2CGrx1 WT, C78S y C24S, corresponde a la alquilación de la cisteína 21. La reacción observada para las variantes C21S y C21S/C24S corresponde en cambio a la alquilación de las cisteínas 78 y/o 24. Se concluye que al pH trabajado (7,2), la cisteína 21 reacciona al menos mil veces más rápido con el mBBr que la cisteína 24 y la 78.

Para la 2CGrx1 WT se obtuvo una constante de $2567 \pm 157 M^{-1} s^{-1}$, que debido a la similaridad de este valor con el obtenido para la variante C78S de $2687 \pm 193 M^{-1} s^{-1}$ se puede decir que en ambas proteínas se observa la misma reacción, que es la alquilación de la cisteína 21. Este resultado indica que el reemplazo de la cisteína 78 por una serina no afecta la reactividad de la cisteína 21 posiblemente porque la mutación no ocasiona re arreglos conformacionales en el sitio activo de la proteína, aún que la distancia entre los azufres de la cisteína 21 y la 78 es de solamente 10,6 Å.

Para la C21S y la C21S/C24S se obtuvieron constantes de $3,43 \pm 0,23 M^{-1} s^{-1}$ y $6,33 \pm 0,33 M^{-1} s^{-1}$, respectivamente. La constante obtenida para la C21S/C24S corresponde a la alquilación de la cisteína 78. La constante obtenida para la C21S puede ser una combinación de las reacciones de la cisteína 24 y la cisteína 78, en caso que las mismas tengan constantes muy similares. De otra forma solo se estaría observando la alquilación de una de las cisteínas, que probablemente sea la 78 ya que la constante obtenida fue similar a la determinada para la C21S/C24S. No se esperaba obtener un valor de k_{app} mayor para la C21S/C24S que para la C21S, pero estos valores son muy pequeños por lo que no deben considerarse como valores exactos.

Para la variante C24S, aunque se obtuvo una constante del orden de la obtenida para la 2CGrx1 WT, la misma fue aproximadamente unas 3 veces menor ($1014 \pm 56 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Este resultado estaría indicando que la cisteína 24 influye en la reactividad de la cisteína 21, siendo la cisteína 21 más reactiva en presencia de la cisteína 24.

En cuanto a las variantes *loop* y *loop* + WP, se obtuvieron constantes de $499 \pm 36 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $927 \pm 35 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Las constantes se encuentran en el orden de 10^2 por lo que lo más probable es que estos valores correspondan a la alquilación de la cisteína 21. En este caso, la cisteína 21 en la variante *loop* resultó ser 6 veces menos reactiva que en la WT, y en la variante *loop* + WP su reactividad fue 3 veces menor.

Para la 1CGrx1 se obtuvo una constante de $6,59 \pm 1,70 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta constante puede corresponder a la cisteína 104 (cisteína del sitio activo), a la cisteína 181, o puede ser resultado de la reacción de ambos residuos. Si se compara con las cisteínas de la 2CGrx1 su valor es del orden de las constantes obtenidas para la cisteína 78 y posiblemente la 24, y tres órdenes de magnitud menor que la obtenida para la cisteína 21. Se puede decir que a pH 7,2 la 1CGrx1 no tiene una cisteína tan reactiva como la C21 de la 2CGrx1.

De este ensayo se concluye que a pH 7,2 la cisteína 21 de la 2CGrx1 es la cisteína reactiva, cuya reacción con un electrófilo inespecífico (mBBr) es por lo menos 1000 veces mayor a las otras dos cisteínas de la proteína. Por otra parte, los tres elementos que caracterizan a las glutarredoxinas de clase II (sustitución de C24 por serina, inserción del *loop* y motivo WP) provocan una disminución en la velocidad de la reacción de la cisteína 21 con el mBBr. La inserción del *loop* provoca un descenso de 6 veces la constante de reacción de la cisteína 21, sin embargo cuando el *loop* se encuentra en presencia del motivo WP, el descenso es de 3 veces. La ausencia de la cisteína 24 también causa una disminución de 3 veces en la reactividad de la cisteína 21. De todas formas las constantes obtenidas para la cisteína 21 de estas tres variantes son significativamente más altas que para cualquiera de las dos cisteínas de la 1CGrx1. Es decir que estos motivos, aunque reducen la velocidad de reacción de la cisteína del sitio activo de la 2CGrx1 entre 3 y 6 veces, no son suficientes para que su reactividad alcance valores similares a los de la 1CGrx1.

Para la 2CGrx1 oxidada se esperaba obtener una constante del orden de la determinada para la variante C21S/C24S, ya que en ambos casos solo la cisteína 78 estaría disponible para reaccionar. Sin embargo, la constante fue de $4975 \pm 192 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, aún mayor que la constante obtenida para la 2CGrx1 WT. Este resultado indicaría que la formación de un enlace disulfuro entre la cisteína 21 y la cisteína 24 produce un aumento de 3 órdenes de magnitud en la reactividad de la cisteína 78, probablemente debido a un cambio conformacional en la proteína.

Para verificar que el residuo que estaba siendo alquilado por el mBBr era efectivamente la cisteína 78, se analizó la muestra alquilada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (Figura 30). Como se explicó previamente, la 2CGrx1 se oxidó con H_2O_2 , se alquiló con mBBr y se bloqueó con iodoacetamida.

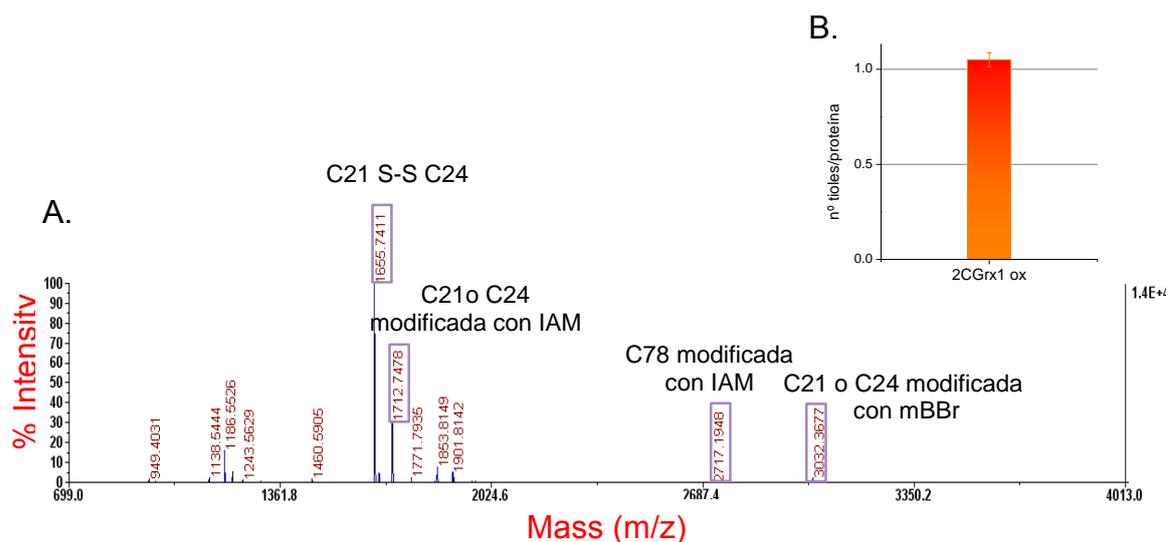


Figura 30: A. Espectro de masa de la 2CGrx1 luego de ser oxidada con H₂O₂. B. Número de tioles por unidad de proteína determinados a partir de su reacción con DTDPy para la 2CGrx1 oxidada.

Para el análisis de este resultado vamos a tener en cuenta el péptido VVFSWVTCPYCVR que contiene a las cisteínas del sitio activo (C21 y C24), y el péptido HETVPAIFINGNFIGGCSLEALDK que contiene a la cisteína 78. Para el primero se obtuvo una relación masa/carga de 1655 que indica que la cisteína 21 y la 24 se encontraban formando un enlace disulfuro. También se evidencia la presencia de la modificación con iodoacetamida en alguna de las cisteínas del sitio activo (m/z 1712) y la alquilación de una de las cisteínas con mBBr (m/z 3032), lo que indica que el sitio activo no se encontraba completamente oxidado en la muestra. Por otra parte, mediante la reacción de los tioles con DTDPy se logró cuantificar un tío por proteína, por lo que posiblemente la cantidad de sitios activos reducidos sea baja. En cuanto al péptido HETVPAIFINGNFIGGCSLEALDK, el espectro reveló que la cisteína 78 se encontraba Codificada con IAM (m/z 2717), pero no con mBBr, que hubiera dado un péptido cuya relación m/z sería de 3165. No se pudo verificar a partir de espectrometría de masa la alquilación de la cisteína 78 con mBBr. Se podría pensar que debido a que el sitio activo no se encontraba completamente oxidado, y por lo tanto la cisteína 21 fue capaz de reaccionar con el mBBr, se estuviese observando esta reacción y no la reacción de la cisteína 78. Sin embargo, el hecho de haber obtenido una constante mayor que en el ensayo donde se utilizó la 2CGrx1 completamente reducida da lugar a dudas. Por otra parte, aún que no se haya obtenido evidencia de la modificación con mBBr de la cisteína 78 por espectrometría de masa, esto no nos asegura que no se haya dado tal modificación.

Para resumir las constantes obtenidas para cada proteína, en la figura 31 se presenta un gráfico de barras donde se puede apreciar la diferencia de reactividad entre las diferentes glutarredoxinas a pH 7,2. Nótese que el eje de las constantes aparentes se encuentra representado en escala logarítmica.

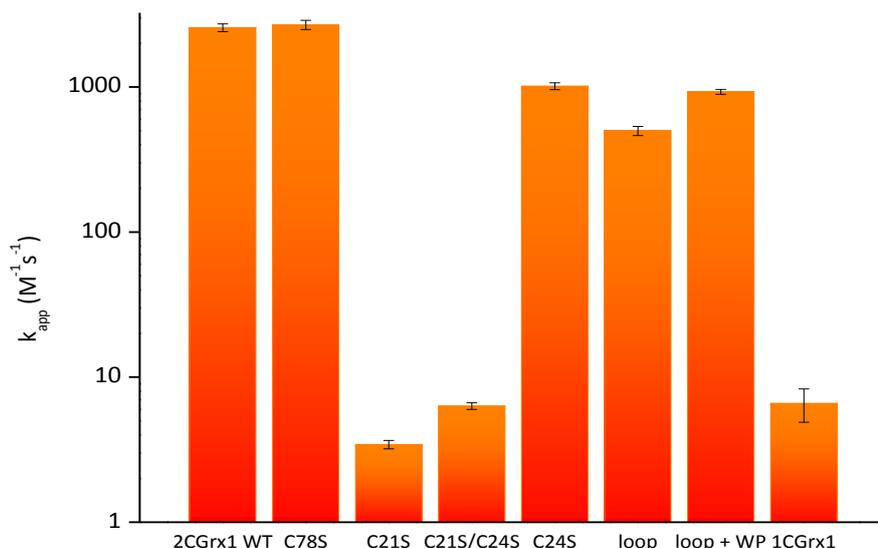


Figura 31: Gráfico de barras correspondiente a las constantes aparentes obtenidas a pH 7,2 de la reacción de las proteínas con mBBR.

Estos resultados fueron determinados a un pH cercano al neutro, pero no informan lo que sucede a otros pHs. Para independizarnos del pH de trabajo y del pKa de la cisteína 21 en las distintas variantes, se buscó obtener una constante de velocidad de segundo orden independiente del pH para la reacción de alquilación de esta cisteína con mBBR. Este valor se tomaría como indicador de la nucleofilia inespecífica de la cisteína 21.

4.5. Determinación de la constante independiente del pH de la reacción entre la cisteína 21 y mBBR

Para cumplir con el siguiente objetivo de esta tesina que se centraba en la obtención de un valor de nucleofilia para la cisteína 21, se procedió a determinar velocidades iniciales de la reacción entre las Grx y el mBBR a diferentes pHs como se mencionó en el apartado de materiales y métodos. Las velocidades iniciales obtenidas fueron extrapoladas a constantes aparentes y de estas curvas de pKa se obtuvieron valores de pKa y constantes independientes de pH para la cisteína 21 que fueron considerados valores de nucleofilia para esta cisteína en las diferentes proteínas trabajadas.

Este ensayo sirvió como método alternativo para la obtención de un valor de pKa para la cisteína 21. A partir del cambio en la fluorescencia intrínseca de la proteína con el pH no se pudo confirmar si el pKa obtenido correspondía efectivamente a la cisteína 21. Por lo tanto se esperaba que el empleo de una metodología independiente aportara información que contribuyera a la obtención de un valor de pKa para esta cisteína.

La reacción fue monitoreada a partir del aumento en la intensidad de fluorescencia a 482 nm del producto de alquilación de las cisteínas causada por la transferencia de energía (FRET) desde el Trp hacia el tioéter.

Para cada proteína la reacción se siguió en aproximadamente 19 condiciones de pH (por cuadruplicado). En la figura 32 se muestran registros de fluorescencia en el tiempo de 3 de las 19 muestras a tres pHs diferentes. Cada registro corresponde a un promedio de cuatro curvas. Los primeros 5 minutos (como tiempo mínimo) de cada curva fueron ajustados a una recta.

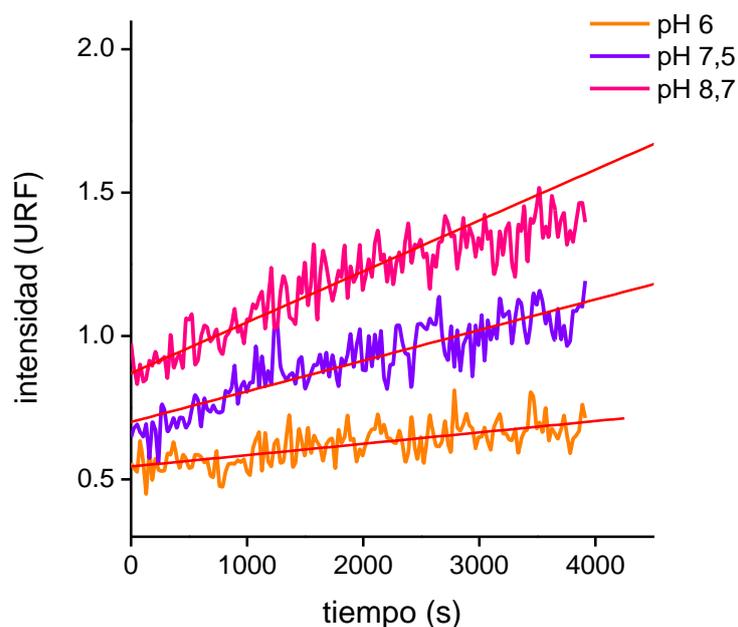


Figura 32: Cursos temporales de la reacción de la 2CGrx1 WT con mBBr a 3 pH distintos en condiciones de velocidad inicial.

De cada recta se obtuvo la pendiente, la cual es proporcional a la velocidad inicial, y se graficó en función del pH correspondiente. En la figura 33 se observa el gráfico del perfil de pH de la velocidad inicial de la alquilación de la 2CGrx1 WT con mBBr.

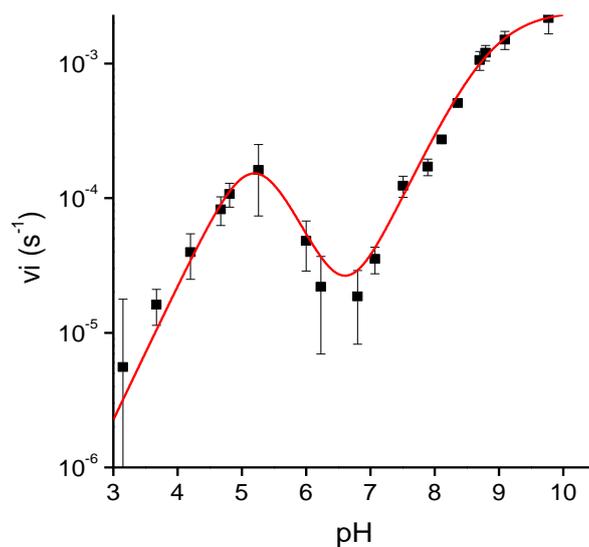


Figura 33: Perfil de pH de la velocidad inicial de la reacción entre la 2CGrx1 WT y mBBr.

Para cada proteína se obtuvieron curvas de velocidad inicial en función del pH. Luego, con el perfil de pH de la velocidad inicial y la k_{app} a pH 7,2, se calculó el factor de proporcionalidad y se extrapolaron el resto de los valores de k_{app} en todo el rango de pH estudiado. Estas curvas fueron ajustadas a funciones de pH apropiadas de acuerdo al número de equilibrios de ionización observados, como se muestra a continuación.

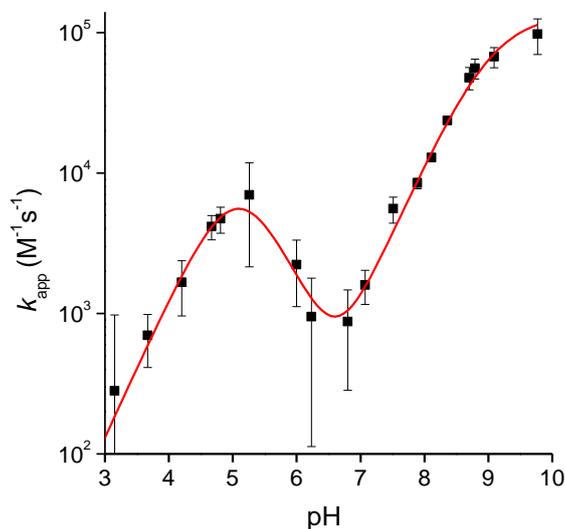


Figura 34: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de 2CGrx1 WT con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 16. Los datos obtenidos del mejor ajuste fueron: $pK_{a1} 5,13 \pm 0,61$; $pK_{a2} 5,05 \pm 0,58$; $pK_{a3} 9,05 \pm 0,09$; k_1 $0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_2 1,78 \pm 1,92 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_3 0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_4 1,35 \pm 0,24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Los valores en rojo fueron fijados a 0 debido a que el ajuste daba valores negativos.

El perfil de pH de 2CGrx1 WT mostró tres cambios de pendiente, lo que indica que hay tres equilibrios ácido-base involucrados en la reacción frente al mBBR. Esto significa que la 2CGrx1 WT se puede tratar como un ácido triprótico, donde



$$K_{a1} = \frac{[E - SH_2^-][H^+]}{[E - SH_3]} \quad (7)$$

$$K_{a2} = \frac{[E - SH^{2-}][H^+]}{[E - SH_2^-]} \quad (8)$$

$$K_{a3} = \frac{[E - S^{3-}][H^+]}{[E - SH^{2-}]} \quad (9)$$

La velocidad inicial de la reacción a un cierto pH va a depender de la concentración de cada grupo ionizable ($E - SH_3$, $E - SH_2^-$, $E - SH^{2-}$, $E - S^{3-}$), y de su contribución

$$vi = k_1[E - SH_3] + k_2[E - SH_2^-] + k_3[E - SH^{2-}] + k_4[E - S^{3-}] \quad (10)$$

Donde k_1, k_2, k_3, k_4 son las constantes independientes del pH de la reacción.

Si se considera

$$E_{TOTAL} = [E - SH_3] + [E - SH_2^-] + [E - SH^{2-}] + [E - S^{3-}] \quad (11)$$

se pueden obtener las funciones de Michaelis para cada grupo ionizable:

$$\frac{[E - SH_3]}{[E_{total}]} = 1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}} \quad (12)$$

$$\frac{[E - SH_2^-]}{[E_{total}]} = \frac{K_{a1}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} \quad (13)$$

$$\frac{[E - SH^{2-}]}{[E_{total}]} = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a2}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a3}} \quad (14)$$

$$\frac{[E - S^{3-}]}{[E_{total}]} = \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^3} + \frac{K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a3}}{[H^+]} + 1 \quad (15)$$

Por lo que el gráfico fue ajustado a la siguiente ecuación

$$\frac{v_i}{[E_{total}]} = \frac{k_1}{\frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^3} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + 1} + \frac{k_2}{\frac{K_{a2}K_{a3}}{[H^+]^2} + \frac{K_{a2}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}} + \frac{k_3}{\frac{K_{a3}}{[H^+]} + 1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}} + \frac{k_4}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a3}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a2}K_{a3}} + \frac{[H^+]^3}{K_{a1}K_{a2}K_{a3}}} \quad (16)$$

El hecho de que para esta proteína se observe una curva con tres cambios de pendiente tiene dos posibles interpretaciones. Una primera interpretación es que las tres reacciones observadas corresponden a la alquilación de las tres cisteínas de la proteína, la cisteína 21, 24 y 78, lo que coincide con el número de equilibrios ácido-base observados. Si esto fuera cierto, se esperaría que la reacción de la proteína con mBBr fuera más rápida a medida que el pH aumenta, consistente con la ionización secuencial de los grupos tiol de las cisteínas. Sin embargo, la forma de campana que se observa en la curva indica que la especie con pK_{a2} causa una disminución en la velocidad de la reacción a medida que aumenta el pH. Esto no concuerda con la alquilación de una cisteína, ya que es la forma tiolato la que es capaz de reaccionar con el mBBr y su proporción va a ser mayor cuanto más básico sea el pH, por lo que no tiene sentido que la reacción de una cisteína con mBBr cause una caída en la velocidad total de la reacción.

La segunda hipótesis es que la caída en la velocidad de la reacción sea causada por un grupo funcional de la proteína (grupo "x") cuya desprotonación causa una disminución en la reactividad de un grupo tiolato de una cisteína, provocando la fase descendiente en la curva. Este grupo "x" podría tratarse de un residuo de la proteína, o incluso un conjunto de residuos que al desprotonarse causen un cambio en el ambiente electrostático, hidrofóbico, estérico etc. de manera de afectar la reactividad de la cisteína. El pK_{a1} podría corresponder a la cisteína 21, el residuo responsable del primer aumento en la velocidad de la reacción, ya que este valor es de 5,13 y se encuentra cercano a los valores de pK_a obtenidos por cambio en la fluorescencia del triptófano (5,15 y 5,42). Además se verifica con los gráficos de los perfiles de pH de la velocidad inicial para las demás variantes que se muestran a continuación. El aumento en la velocidad de la reacción a pHs mayores que 7 probablemente sea resultado de la ionización de la cisteína 24 y la cisteína 78, para las cuales se obtiene un pK_a de 9,05. Es de suponer que sus pK_a s no sean suficientemente diferentes como para distinguirlos a partir de la reacción de alquilación con mBBr.

Según nuestra hipótesis, k_2 es la constante independiente del pH de reacción de la cisteína 21 en su forma ionizada con mBBr, estado en el que es capaz de realizar el ataque nucleofílico que da lugar al inicio de la reacción. Esta es la constante que nos interesa ya que representa la nucleofilia de esta cisteína. El valor de k_4 fue un orden mayor que el de k_2 . Probablemente a este valor estén contribuyendo la cisteína 78 y la 24, pero también existe una pequeña contribución de la cisteína 21. El valor de k_2 que se obtuvo a partir de este ajuste presentó un error muy alto. La gran dispersión que se observa en el valor de k_2 se debe a la forma de la función y a la escasa diferencia entre

pKa₁ y pKa₂. Dado que esta diferencia es menor que el error estándar del ajuste es imposible saber si pKa₁>pKa₂ o viceversa, y eso influye en el valor de k₂.

Debido a que la determinación del valor de constante independiente del pH para la cisteína 21 en la 2CGrx1 WT es uno de los principales objetivos para esta tesina, se optó por tomar los primeros dos tramos de la curva, en la cual están involucrados los equilibrios iónicos de la cisteína 21 y del grupo “x”, de modo que el ajuste sea más sencillo.

En este caso la 2CGrx1 se puede tratar como un ácido diprótico, por lo que luego de realizar el mismo análisis por el cual se llegó a la ecuación 16, se obtuvo una ecuación correspondiente a una curva de 2 pKas:

$$\frac{v_i}{[E_{total}]} = \frac{k_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2}} + \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}} + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} + \frac{k_3}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + \frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}}} \quad (17)$$

Al ajustar a una ecuación con un menor número de variables se esperaba obtener un valor de k₂ que presentara un menor error.

En la figura 34 se observan los primeros puntos de la curva obtenida para la 2CGrx1 WT ajustados a la ecuación 17.

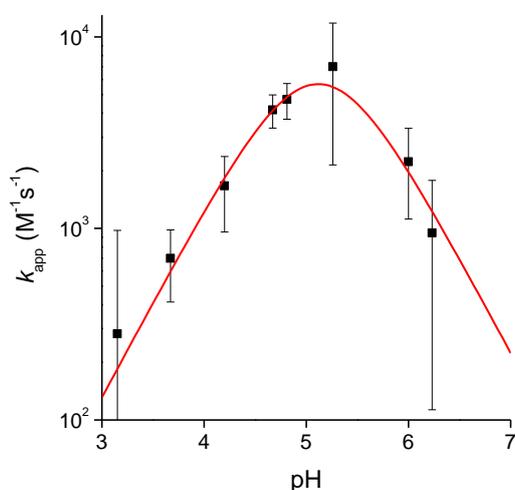


Figura 34: Primeros 8 puntos del perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de 2CGrx1 WT con mBBR. Los datos se ajustaron a la ecuación 17. Los datos obtenidos del mejor ajuste fueron: pKa₁ 5,10 ± 0,50; pKa₂ 5,14 ± 0,47; k₁ 0 M⁻¹s⁻¹; k₂ 1,65 ± 1,43 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹; k₃ 0 M⁻¹s⁻¹. Los valores en rojo fueron fijados a 0 debido a que el ajuste daba valores negativos.

A partir de este ajuste se lograron errores más pequeños, y lo que es importante, se logró que el error correspondiente al valor de k₂ no sobrepasara el valor de la constante. El valor de k₂ obtenido a partir de este ajuste resultó muy similar al valor que se había obtenido ajustando la curva completa. Los valores de pKa también resultaron similares a los obtenidos a partir del ajuste realizado sobre la curva

completa. Para la cisteína 21 se obtuvo un pKa de 5,10, mientras que para el grupo “x” se obtuvo un valor de pKa de 5,14.

Para lograr una mejor comprensión del patrón de reactividad observado para esta proteína, se llevó a cabo el mismo experimento utilizando las mutantes que carecían de algunas de las cisteínas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

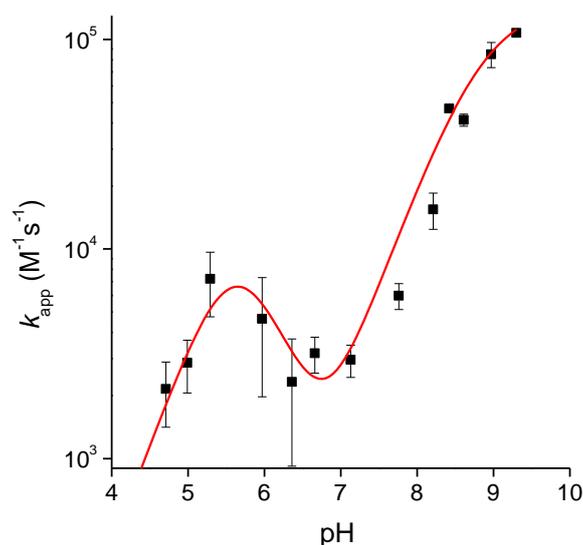


Figura 35: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de 2CGrx1 C78S con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 16. Los valores del mejor ajuste: pKa₁ 5,91 ± 12,01; pKa₂ 5,38 ± 10,84; pKa₃, 8,84 ± 0,21; k_1 0 $M^{-1}s^{-1}$; k_2 3,09 ± 68,91 × 10⁴ $M^{-1}s^{-1}$; k_3 0 $M^{-1}s^{-1}$; k_4 1,50 ± 0,42 × 10⁵ $M^{-1}s^{-1}$. Los valores en rojo fueron fijados a 0 debido a que el ajuste daba valores negativos.

En el gráfico correspondiente a la 2CGrx1 C78S se obtuvo un comportamiento similar al de la 2CGrx1 WT, donde se observan 3 equilibrios ácido-base.

A partir de este resultado y del análisis realizado para la curva correspondiente a la 2CGrx1 WT se propone que los residuos responsables de la curva obtenida para la C78S son la cisteína 21, el grupo “x” y la cisteína 24. En este caso en la última fase de la curva no participa la cisteína 78, ya que la misma se encuentra reemplazada.

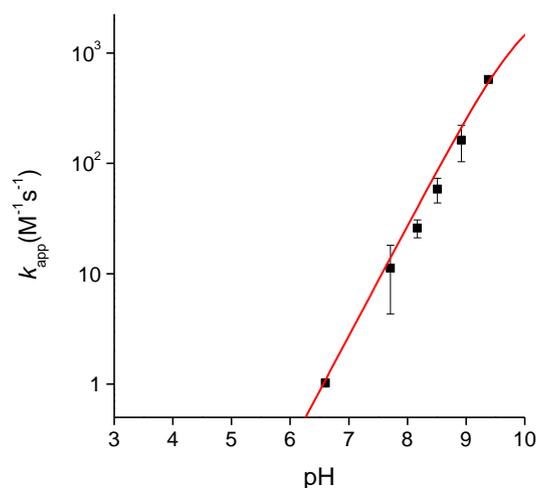


Figura 36: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de la 2CGrx1 C21S con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 18. pK_a $10,05 \pm 0,07$; k_1 $0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_2 $3,08 \pm 0,26 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El valor en rojo fue fijado a 0 debido a que el ajuste daba un valor negativo.

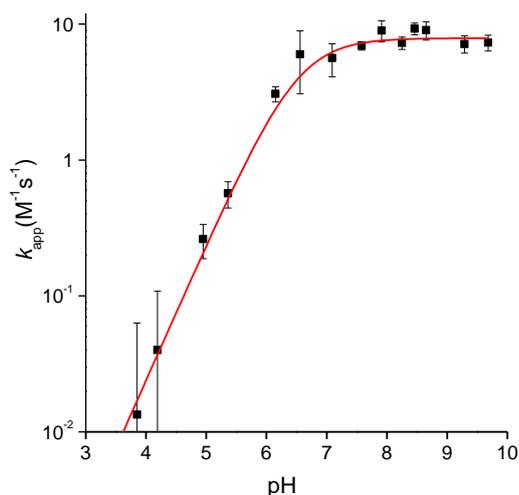


Figura 37: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de 2CGrx1 C21S/C24S con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 18. pK_a $6,52 \pm 0,10$; k_1 $0 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_2 $7,88 \pm 0,50 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El valor en rojo fue fijado a 0 debido a que el ajuste daba un valor negativo.

La 2CGrx1 C21S y la C21S/C24S se comportaron como ácidos monopróticos, por lo que las curvas se ajustaron a la ecuación 18 correspondiente a una curva de 1 pK_a :

$$\frac{vi}{[E_{total}]} = \frac{k_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]}} + \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}} \quad (18)$$

Para estas variantes, que carecen de la cisteína reactiva, no se observa la forma de campana que se observa en las curvas de las Grx que sí tienen a la cisteína

21 (2CGrx1 WT y C78S). En cambio se observa una forma sigmoidea que correspondería a los equilibrios de ionización de la cisteína 78 (C21S/C24S) o una contribución de la cisteína 78 y la 24 (C21S).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que las primeras dos pendientes observadas en la curva de la 2CGrx1 WT y la variante C78S son resultado de la reacción de alquilación de la cisteína 21 y la influencia sobre la misma de un grupo o más, cuya identidad se desconoce. Además, se corrobora que el valor de pKa de 5,10 - 5,13 obtenido para la 2CGrx1 WT efectivamente corresponde a la cisteína 21, lo que indica que a pH fisiológico estará principalmente como tiolato y no como tiol, favoreciendo su capacidad de reaccionar con su sustrato mediante un ataque nucleofílico.

Para obtener una mejor visión de los resultados se realizó una superposición de los gráficos hasta ahora presentados.

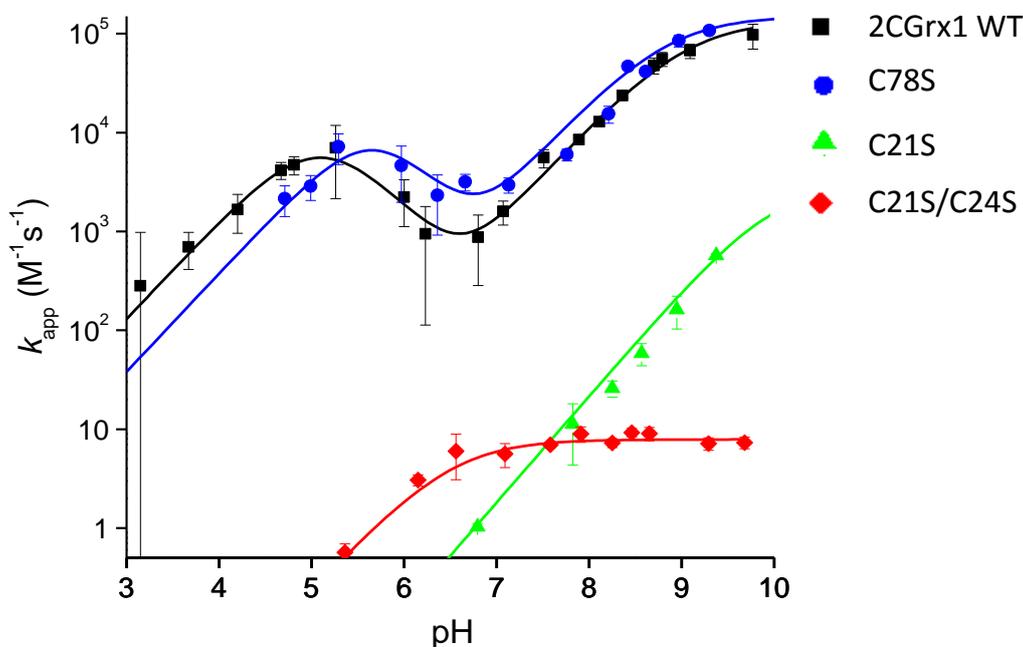


Figura 38: Superposición de las curvas de constante aparente en función del pH de la 2CGrx1 WT y las variantes C78S, C21S y C21S/C24S.

Esta figura revela que para la 2CGrx1 WT y C78S se obtuvieron constantes aparentes muy similares en todo el rango de pH trabajado. Sin embargo, también se puede observar que la sustitución de la cisteína 78 por una serina causa un desplazamiento de la curva hacia la derecha, es decir, que en ausencia de la cisteína 78 se obtiene un patrón de reactividad casi idéntico al de la 2CGrx1 WT pero con un desplazamiento de aproximadamente 0,5 unidades en el pH. Se puede decir que la cisteína 78 no presenta una reactividad significativa frente al mBBBr, sin embargo su presencia afecta la reactividad de las otras dos cisteínas de la proteína, aunque este efecto es mínimo si se compara con el efecto que provoca la ausencia/presencia de la C21. Si se comparan las curvas de estas proteínas que poseen la cisteína 21, con las variantes C21S y

C21S/C24S que carecen de la misma, se observa que las constantes de reacción de las últimas son de por lo menos dos órdenes de magnitud menores que para las primeras, en todo el rango de pH.

Se puede concluir que la cisteína 21 es un residuo clave para la reactividad general de la proteína, ya que su ausencia también afecta significativamente la reactividad de las otras dos cisteínas de la proteína (C24 y C78).

Además se puede decir que para la 2CGrx1 la reactividad de las cisteínas no tiene un comportamiento aditivo. Es decir, al quitar alguna de las cisteínas, en la curva resultante no solamente se elimina la contribución de la cisteína que se reemplazó, sino que se observa un comportamiento distinto de las cisteínas que se conservaron.

A continuación se muestran las curvas obtenidas para las variantes de la 2CGrx1 con motivos característicos de las Grx de clase II (C24S, *loop* y *loop* + WP).

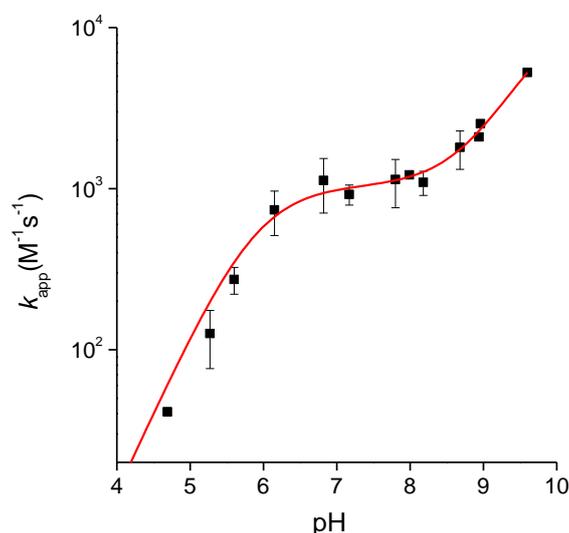


Figura 39: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de la 2CGrx1 C24S con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 17. $pK_{a1} 5,90 \pm 0,15$, $pK_{a2} 9,91 \pm 0,18$ $M^{-1}s^{-1}$; $k_1 0 M^{-1}s^{-1}$, $k_2 1,04 \pm 0,07 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$, $k_3 1,38 \pm 0,34 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$. El valor en rojo fue fijado a 0 debido a que el ajuste daba un valor negativo.

A partir de este resultado se puede suponer que la primera parte de la curva corresponde a la reacción de la cisteína 21, para la cual se obtiene un pK_a de $5,90 \pm 0,15$, similar a los obtenidos a partir de resultados anteriores. La segunda parte correspondería entonces a la alquilación de la cisteína 78. Aunque se esperaba obtener un comportamiento similar al de la 2CGrx1 WT y la C78S, para esta variante no se observa la contribución del grupo "x" a la reactividad de la cisteína 21. Una hipótesis es que la cisteína 24 esté mediando la interacción entre la cisteína 21 y el grupo "x", por lo que cuando la cisteína 24 se encuentra reemplazada por una serina esta interacción se debilita o se rompe. Otra hipótesis es que la ausencia de la cisteína 24 causa un cambio conformacional en el entorno del sitio activo que aleja a la cisteína 21 del grupo "x". Finalmente, la cisteína 24 podría estar interaccionando con el grupo "x" por

lo que su ausencia altera la capacidad de este grupo de influir sobre la reactividad de la cisteína 21.

Hay que aclarar sobre los valores de k_4 , que cuando los mismos se obtienen a pHs mayores que 9, como para el caso de la 2CGrx1 WT, C78S, C21S y C24S, este valor no resulta confiable. Es muy probable que a estos pHs la proteína adquiera conformaciones alternativas a la nativa, lo que puede estar alterando la reactividad de las cisteínas. En el caso de la C21S además el valor de pKa se encuentra por fuera de los puntos obtenidos experimentalmente.

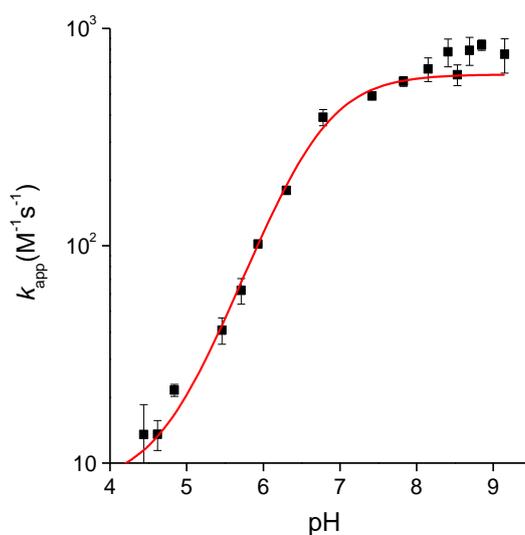


Figura 40: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de la 2CGrx1 + *loop* con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 18. pK_a $6,67 \pm 0,04$; k_1 $7,93 \pm 2,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_2 $6,14 \pm 0,34 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

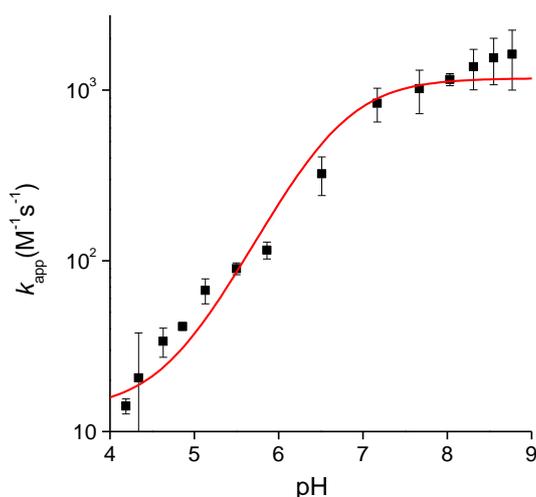


Figura 41: Perfil de pH de la constante aparente de la alquilación de la 2CGrx1 + *loop* + WP con mBBr. Los datos se ajustaron a la ecuación 18. pK_a $6,68 \pm 0,12$; k_1 $13,4 \pm 3,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; k_2 $1,17 \pm 0,21 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En cuanto a las variantes con inserciones (*loop* y *loop* + WP) se puede suponer que la reacción que se observa corresponde a la de la cisteína 21. Esta suposición se basa en los valores de k_{app} a pH 7,2 obtenidos en la sección 4.4, a partir de los cuales se concluyó que la cisteína responsable de la reacción de alquilación con el mBBr a este pH es la cisteína 21, mientras que las otras dos cisteínas de la proteína reaccionaban unas 1000 veces más lento. De todas formas también se podrían estar observando contribuciones de las otras cisteínas, principalmente cuando la curva se acerca a pHs más básicos.

En la siguiente figura se superpusieron los gráficos obtenidos para la 2CGrx1 WT, C24S, *loop*, *loop* + WP y 1CGrx1.

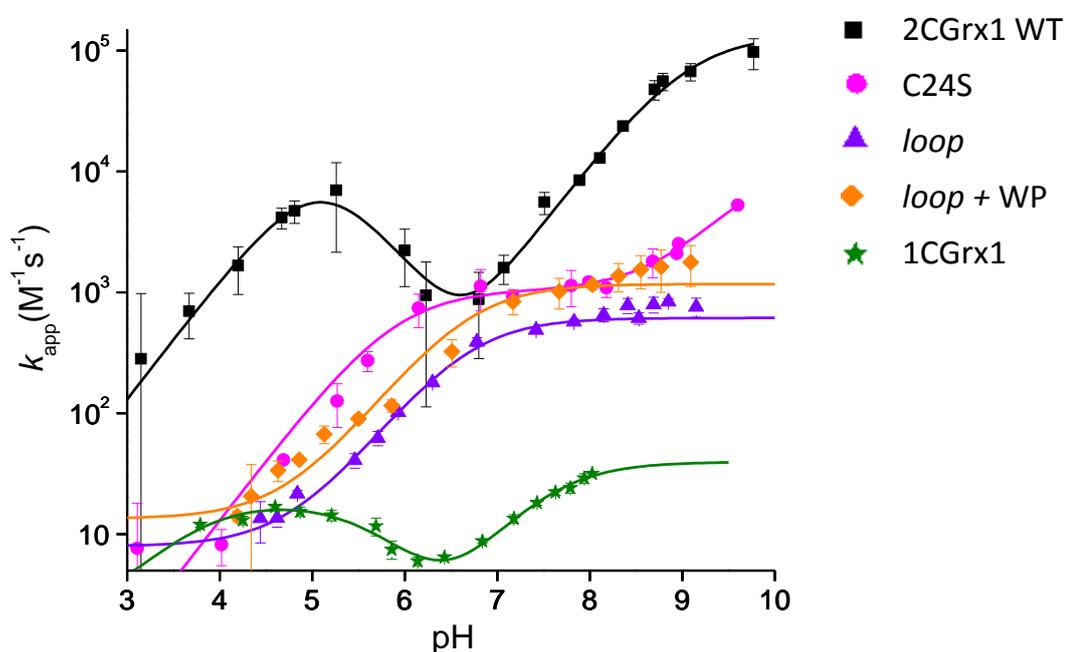


Figura 42: Superposición de las curvas correspondientes a los perfiles de pH de la constante aparente de la 2CGrx1 WT y las variantes C24S, *loop*, *loop* + WP y 1CGrx1.

La curva correspondiente a la 1CGrx1 fue obtenida a partir de los datos presentados en Sardi *et al*, 2013, para la cual se obtuvo una constante independiente del pH de $18,7 \pm 1,9 M^{-1}s^{-1}$.

A partir de esta figura se concluye que la sustitución de la cisteína 24 por una serina, la inserción del *loop* así como la inserción del *loop* acompañado del motivo WP, provocó un descenso en la reactividad de la 2CGrx1 que no se recupera a ningún pH en el rango trabajado. Sin embargo, cabe destacar que a pH cercanos al 7 esta diferencia en la reactividad se vuelve más pequeña. Este resultado concuerda con las constantes aparentes obtenidas a pH 7,2 para estas proteínas, que resultaron ser solamente entre 3 y 6 veces menores que para la 2CGrx1 WT, siendo la variante del *loop* la menos reactiva. La curva de la 1CGrx1 muestra que las constantes aparentes obtenidas para esta proteína se encuentran al menos 10 veces por debajo de las constantes obtenidas

para las variantes, por lo que el *loop*, el motivo WP y la sustitución C24S no fueron suficientes para disminuir la reactividad de la 2CGrx1 hasta los valores obtenidos para la 1CGrx1.

En las siguientes tablas (Va y Vb) se resumen los pKas y constantes determinadas a partir de las curvas obtenidas en este ensayo.

Tabla Va: pKas y constantes independientes del pH (en $M^{-1}s^{-1}$) obtenidas para las distintas proteínas estudiadas.

Grx	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄
2CGrx1 WT	5,1	5,1	9,1	0	$1,6 \times 10^4$	0	$1,3 \times 10^5$
C78S	5,9	5,4	8,8	0	3×10^4	0	$1,5 \times 10^5$
C21S	10,1	-----	-----	0	$3,1 \times 10^3$	-----	-----
C21S/C24S	6,5	-----	-----	0	7,9	-----	-----
C24S	5,9	9,9	-----	0	$1,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	-----
<i>loop</i>	6,7	-----	-----	7,9	$6,1 \times 10^2$	-----	-----
<i>loop</i> + WP	6,7	-----	-----	13,4	$1,2 \times 10^3$	-----	-----
1CGrx1	5,6	-----	-----	-----	18,7	-----	-----

Tabla Vb: Valores de pKas y constantes independientes del pH (en $M^{-1}s^{-1}$) obtenidos para la cisteína 21. Se incluyen los valores correspondientes a la cisteína 104 de la 1CGrx1.

Glutarredoxina	pKa C21	k C21
2CGrx1 WT	5,1	$1,7 \times 10^4$
C78S	5,9	3×10^4
C24S	5,9	1×10^3
<i>loop</i>	6,7	6×10^2
<i>loop</i> + WP	6,7	$1,2 \times 10^3$
1CGrx1 (C104)	5,6	18,7

A continuación se detallan las conclusiones que se lograron obtener a partir de este ensayo.

En cuanto a los valores de pKa para la cisteína 21, se confirmó que esta cisteína es la cisteína ácida de la proteína, para la cual se obtuvo un pKa de entre 5,10 y 5,13, valores que se corresponden con los valores obtenidos a partir del cambio con el pH de la fluorescencia intrínseca de la proteína, los cuales fueron de 5,15 y 5,42.

Se observó que el pKa de la cisteína 21 aumenta menos de una unidad en ausencia de la cisteína 24. También se había observado un aumento a partir de las curvas de intensidad y centro de masa vs pH para la C24S. La inserción del *loop* y del *loop* acompañado del motivo WP provoca un aumento de más de una unidad en el pKa de la cisteína 21, resultado que también se había observado a partir del gráfico de centro de masa vs pH de la variante *loop* + WP. Este aumento en el valor de pKa de la cisteína 21 en estas tres variantes concuerda con un aumento en valor de pKa para la cisteína 104 de la 1CGrx1 con respecto a la cisteína 21 de la 2CGrx1.

En cuanto a la reactividad de las proteínas, se puede decir que el patrón de reactividad observado para la cisteína 21 estaría influenciado por su cercanía a uno o un grupo de residuos de la proteína. Una de las posibles explicaciones es que la desprotonación de un grupo funcional cause un cambio conformacional que aleje el grupo tiolato de la cisteína 21 y lo mantenga fuera del alcance del agente alquilante. Otra posibilidad es que la ionización de este grupo genere una región con carga negativa y como la reacción de alquilación se da mediante un estado de transición aniónico la generación de un ambiente negativo en las proximidades del tiolato provoque un descenso en la velocidad de la reacción.

El reemplazo de alguna de las cisteínas del sitio activo (21 y/o 24) causa cambios tanto en la reactividad como en el pKa de las demás cisteínas. Posiblemente las cisteínas del sitio activo estén interactuando directamente o a través de otros residuos por lo que el reemplazo de alguna de ellas causa un cambio en el comportamiento de la otra. Pero además estos resultados indican que el sitio activo es un lugar clave para el mantenimiento de la conformación de la proteína, ya que si alguna de sus cisteínas se encuentra reemplazada, esto influye en la reactividad de la cisteína 78. En cambio, el reemplazo de la cisteína 78 por una serina no provoca grandes cambios en la reactividad de las cisteínas del sitio activo.

El reemplazo de la cisteína 24 del sitio activo por una serina causa una disminución en la reactividad de la Grx en todo el rango de pH trabajado. La cisteína 24 es importante tanto para la reactividad de la cisteína 21 frente a un electrófilo inespecífico como para que esta cisteína se encuentre en una mayor proporción de su forma ionizada a pH fisiológico, disponible para reaccionar.

La inserción de los 5 residuos que forman un *loop* cercano al sitio activo y del motivo WP, produce una disminución de la reactividad de la proteína en todo el rango de pH trabajado. Dado que el patrón de reactividad observado para estas variantes (*loop* y *loop* + WP) resultó ser muy similar, al igual que los valores de pKa, se puede decir que

el responsable de los cambios en estas propiedades con respecto a la 2CGrx1 WT fue la inserción del *loop* y no del motivo WP.

A partir de los valores de nucleofilia inespecífica para la cisteína 21 obtenidos para las distintas variantes se puede concluir que el reemplazo de la cisteína 24 del sitio activo por una serina produce una disminución de 20 veces en la nucleofilia de la cisteína 21. La inserción del *loop* precedente al sitio activo causa un descenso más marcado que resulta ser de 30 veces en la nucleofilia de la cisteína 21. Cuando el *loop* se encuentra además acompañado de la inserción del motivo WP, el descenso es menor, siendo la C21, 20 veces menos nucleofílica. Probablemente el responsable del descenso en la nucleofilia de la cisteína 21 tanto en la variante *loop* como en *loop* + WP sea la inserción del *loop* y no el motivo WP. Si se compara la nucleofilia de la cisteína 21 de la 2CGrx1 con el valor obtenido a partir de los datos de Sardi y col. para la cisteína 104 de la 1CGrx1, se concluye que la cisteína 21 es 1000 veces más nucleofílica que la cisteína 104.

5. Consideraciones finales

Los estudios realizados en el marco de esta tesina han permitido profundizar acerca de la reactividad de cisteínas de glutaredoxinas de *Trypanosoma brucei* y las relaciones entre la reactividad y los motivos estructurales que diferencian a las Grx de clase I y II.

Se logró estudiar la reactividad de las proteínas a partir de la reacción con monobromobimano. Este método permitió el empleo del FRET entre el triptofano de la proteína y el producto de alquilación, por lo que además de ser un método sensible resultó ser específico para cisteínas proteicas. También sirvió como método complementario para la determinación de pKas.

Las conclusiones que corresponden a los objetivos planteados se dividen en distintas secciones que se detallan a continuación.

Propiedades ácido-base

Se obtuvo un valor de pKa para la cisteína 21, que se encontró entre 5,1 y 5,4. Este valor se vio aumentado en menos de una unidad debido al reemplazo de la cisteína 24 por una serina y en más de una unidad cuando a la 2CGrx1 se le insertó el *loop*.

Nucleofilia

A partir de las constantes independientes del pH para la cisteína 21, que representan la nucleofilia inespecífica de esta cisteína, se pudo concluir que la cisteína 21 en las variantes de la 2CGrx1 con motivos estructurales característicos de las Grx de clase II fue entre 20 y 30 veces más nucleofílica que en la 2CGrx1 WT. Como sugería nuestra hipótesis, la inserción del *loop* y la sustitución de la cisteína 24 por una serina provocaron una disminución en la nucleofilia de la cisteína 21. Por otra parte se vio que la cisteína del sitio activo de la 1CGrx1 (C104) es 1000 veces menos nucleofílica que la cisteína 21 de la 2CGrx1. Estos valores pueden explicar parcialmente el hecho de que la 1CGrx1, a diferencia de las Grx de clase I, no tenga actividad redox. Aunque mediante la inserción y sustitución de ciertos motivos estructurales se pretendía intercambiar propiedades de reactividad entre la Grx de clase I (2CGrx1) y la Grx de clase II (1CGrx1), esto no se logró por completo, ya que las constantes obtenidas para las variantes C24S, *loop* y *loop* + WP fueron entre 30 y 50 veces más pequeñas que para la 1CGrx1, demostrando que estos motivos estructurales no son los únicos responsables de que la cisteína 104 de la 1CGrx1 no sea una cisteína nucleofílica.

Mediante el análisis de los valores de nucleofilia obtenidos para las variantes *loop* y *loop* + WP, los valores de constante aparente a pH 7,2 y de pKa, se concluyó que la inserción del motivo WP no ocasionó ningún efecto particular en las propiedades de reactividad estudiadas, y que la inserción del *loop* fue el principal determinante de los cambios observados.

Reactividad de las glutarredoxinas estudiadas en relación a tioles de bajo peso molecular

Las constantes independientes del pH para la cisteína 21 y la cisteína 78 de algunas de las variantes estudiadas se introdujeron en un gráfico de Brønsted que había sido construido a partir de las constantes de la reacción de tioles de bajo peso molecular con mBBr y su pKa. Este gráfico se obtuvo de Portillo y col., 2014 [46]. Los puntos del gráfico habían sido ajustados a una recta, obteniéndose la siguiente ecuación que relaciona acidez y nucleofilia de los tioles:

$$\text{Log}k_{RS^-} = 0,52 \text{ pKa} - 2,1 \quad (19)$$

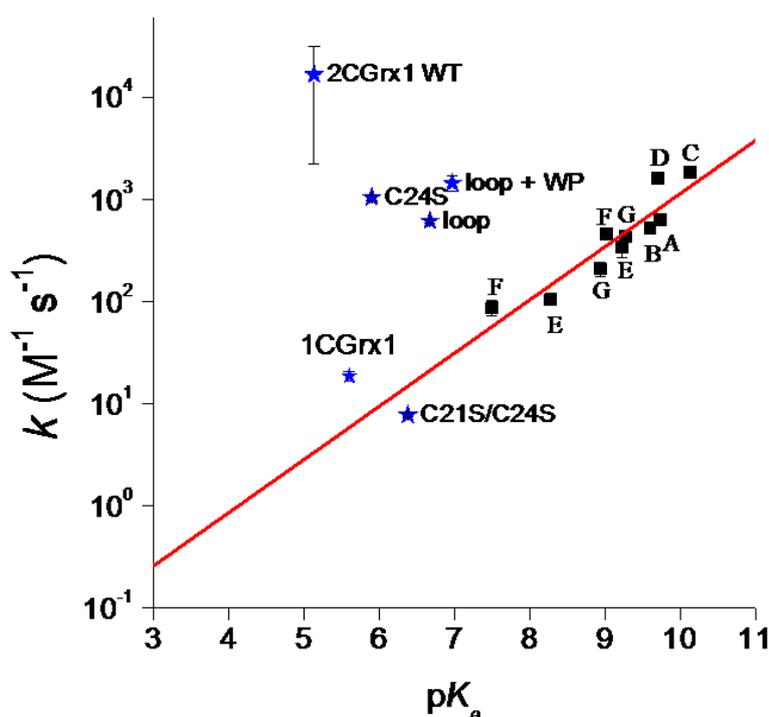


Figura 43: Gráfico de Brønsted para tioles de bajo peso molecular a partir de su reacción con mBBr. **A**, N-acetil-L-cisteína; **B**, 2-mercaptoetanol; **C**, captopril; **D**, ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA); **E**, L-cisteína; **F**, L-cisteína etil ester; **G**, glutatión. En el gráfico se incluyen como estrellas azules las constantes independientes del pH de algunas de las Grx estudiadas con el objetivo de compararlas con la curva obtenida para los tioles de bajo peso molecular. Estos puntos no fueron tomados en cuenta para la regresión lineal.

En el gráfico se puede apreciar que mientras que los valores de nucleofilia de los tioles de bajo peso molecular caen en la ubicación esperada por la correlación de Brønsted, la cisteína 21 tanto en la 2CGrx1 WT como en las variantes C24S, *loop* y *loop + WP* es más nucleofílica de lo esperado según su pKa, debido a que la misma se ve afectada por el entorno proteico. Por otra parte, la cisteína 78 en la C21S/C24S y la 104 en la 1CGrx1 se comportan como tioles de bajo peso molecular ya que su constante cae cercana a la recta. Si se sustituyen los valores de pKa de las Grx en la ecuación de la

recta obtenida a partir del ajuste se pueden determinar los valores que se espera que adquieran las constantes según la correlación de Brønsted y compararlos con las constantes obtenidas experimentalmente para estas proteínas. A partir de estas relaciones se puede concluir que la 2CGrx1 es 4300 veces más nucleofílica con respecto a un tiol de bajo peso molecular. Esto se debe a que el entorno proteico influye tanto en la nucleofilia como en el pKa del tiol de la cisteína, por lo que deja de comportarse como un tiol de bajo peso molecular. Este es importante para que esta glutarredoxina cumpla con su función de catalizar la reducción de enlaces disulfuros, para lo cual debe comenzar la reacción mediante un ataque nucleofílico sobre este enlace.

El caso opuesto es el de la cisteína 78, que aunque se encuentra formando parte de una proteína, al no participar en la catálisis, no es necesario un entorno proteico que favorezca su nucleofilia, y por lo tanto se puede decir que conserva las propiedades de reactividad de una cisteína libre. Lo mismo se observa para la cisteína 104 de la 1CGrx1, la cual aunque forma parte del sitio activo de la proteína, esta glutarredoxina no tiene actividad redox, y por lo tanto no necesita de la presencia de una cisteína nucleofílica en su sitio activo para cumplir su función. Los puntos pertenecientes a las variantes C24S, *loop* y *loop* + WP aunque quedaron por encima de la recta de los tioles de bajo peso molecular, se encontraron por debajo de la 2CGrx1 WT, lo que indica que la inserción y sustitución de estos motivos provocó que la reactividad de la cisteína 21 se aproximara a la de un tiol de bajo peso molecular. Para la variante *loop*, *loop* + WP y C24S, los valores de nucleofilia resultaron ser 30, 50 y 100 veces más altos que los esperados para tioles de bajo peso molecular, respectivamente.

Especificidad de la 2CGrx1 a pH neutro

Por otra parte, a partir del análisis del perfil de pH de las constantes aparentes de la 2CGrx1 WT se observó que la nucleofilia inespecífica de la misma se ve atenuada a pHs cercanos al neutro. Esto se ve como un mínimo en la curva. En cuanto a la reactividad específica de la 2CGrx1 con GSSG, sustrato de la misma, el perfil de pH de las constantes aparentes (Manta y col., en preparación) presenta una forma sigmoidea que aumenta hasta pHs cercanos a 7 y luego se va mantiene casi constante, es decir que no presenta mínimos, como se puede apreciar en la figura 44.

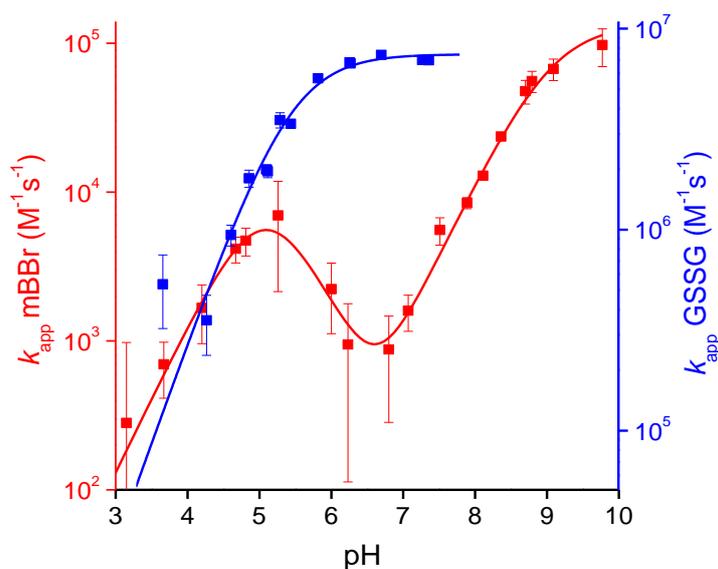


Figura 44: En rojo se muestra el perfil de pH de las constantes aparentes de la reacción de la 2CGrx1 con mBBr. En azul se muestra el perfil de pH de las constantes aparentes de la reacción de la 2CGrx1 con GSSG.

Se podría especular, a partir de estos resultados, que el hecho de que a pHs cercanos a 7, que es el pH aproximado al cual se encuentra la proteína en el interior del parásito, la 2CGrx1 presente un mínimo de reactividad inespecífica podría cumplir la función de evitar que la proteína reaccione con electrófilos inespecíficos (los cuales van a ser variados teniendo en cuenta el complejo ciclo de vida del parásito), protegiendo el grupo tiolato de la cisteína 21 y manteniéndolo activo para reaccionar con sus sustratos en la célula. De esta manera el particular comportamiento de la 2CGrx1 frente a un electrófilo inespecífico a pH neutro se habría seleccionado durante la evolución para favorecer la especificidad de la enzima.

Reacción de la C78 con mBBr

En cuanto a la constante aparente obtenida para la 2CGrx1 cuyo sitio activo se encontraba oxidado, se obtuvo un valor 1000 veces mayor que para la reacción de la C78 en la variante C21S/C24S. Sin embargo, no se logró obtener evidencia de que la reacción observada fuera efectivamente la alquilación de la cisteína 78. De ser esto cierto, el hecho de que la oxidación del sitio activo provoque un aumento de 1000 veces en la reactividad de la C78, se podría pensar como un mecanismo de encendido y apagado de esta cisteína, regulado por el estado redox del sitio activo. Como se mencionó en la introducción, dado que *T. brucei* carece de glutatión reductasa, el mecanismo de reducción del GSSG es a través de las glutarredoxinas del parásito. En condiciones en que el glutatión se encuentra en gran proporción en su estado oxidado (GSSG), este podría oxidar al sitio activo de la 2CGrx1, volviendo el glutatión a su estado reducido. A su vez, la oxidación del sitio activo resultaría en la activación de la

cisteína 78, aumentando notoriamente su reactividad. Se podría pensar que en estas condiciones, la cisteína 78 de la 2CGrx1 adquiere alguna función.

Bibliografía

1. E. Ströher and A. H. Millar, "The biological roles of glutaredoxins," *Biochem. J.*, vol. 446, no. 3, pp. 333–348, 2012.
2. E. Racker, "Glutathione-homocystine transhydrogenase," *J. Biol. Chem.*, vol. 217, pp. 867–875, 1955.
3. A. Holmgren, "Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside- diphosphate reductase dependent upon glutathione Biochemistry," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 73, no. 7, pp. 2275–2279, 1976.
4. C. H. Lillig and C. Berndt, "Glutaredoxins in Thiol/Disulfide Exchange," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 18, pp. 1654–1665, 2013.
5. A. P. Fernandes and A. Holmgren, "Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 6, no. 1, pp. 67–74, 2004.
6. J. Lupton, N. D. Turner, G. Wu, Y. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, "Glutathione Metabolism and Its Implications for Health Recent Advances in Nutritional Sciences Glutathione Metabolism and Its," *J. Nutr.*, 2004.
7. J. L. Martin, "Thioredoxin -a fold for all reasons," *Structure*, vol. 3, no. 3, pp. 245–250, 1995
8. C. H. Lillig, C. Berndt, and A. Holmgren, "Glutaredoxin systems," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1780, no. 11, pp. 1304–1317, 2008.
9. J. F. Collet and J. Messens, "Structure , Function , and Mechanism of Thioredoxin Proteins," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 13, no. 8, 2010.
10. M. Deponte, "Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 5, pp. 3217–3266, 2013.
11. K. Nordstrand, F. Aslund, A. Holmgren, G. Otting and K. D. Berndt, "NMR Structure of Escherichia coli Glutaredoxin 3- Glutathione Mixed Disulfide Complex: Implications for the Enzymatic Mechanism," *J. Mol. Biol*, vol. 286, pp. 541-552, 1999.
12. M. Fladvad, M. Bellanda, A. P. Fernandes, S. Mammi, A. Vlamis-Gardikas, A. Holmgren and M. Sunnerhagen, "Molecular Mapping of Functionalities in the Solution Structure of Reduced Grx4, a Monothiol Glutaredoxin from Escherichia coli," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 26, pp. 24553–24561, 2005.
13. M. Nikkola, F. K. Gleason, M. Saarinen, T. Joelson, O. Bjornberg and H. Eklund, "A Putative Glutathione-binding Site in T4 Glutaredoxin Investigated by Site-directed Mutagenesis," *J. Biol. Chem*, vol. 266, no. 24, pp. 16105-16112, 1991.
14. B. Manta, "Análisis funcional de glutaredoxinas de tripanosomas" Tesis de Doctorado PEDECIBA - Biología, opción Bioquímica; Universidad de la República, 2013
15. M. M. Gallogly, D. W. Starke, and J. J. Mieyal, "Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 5, pp. 1059–1081, 2009.
16. B. Manta, C. Pavan, M. Sturlese, A. Medeiros, M. Crispo, C. Berndt, R. L. Krauth-Siegel, M. Bellanda, and M. A. Comini, "Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of Trypanosoma brucei: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, no. 7, pp. 665–82, 2013

17. E. Herrero and M. A. de la Torre-Ruiz, "Monothiolglutaredoxins: a common domain for multiple functions," *Cell Mol Life Sci.*, vol. 64, no. 12, pp. 1518-1530, 2007
18. M. L. Tsang, "Assimilatory Sulfate Reduction in Escherichia coli: Identification of the Alternate Cofactor for Adenosine 3' - Phosphate 5' -Phosphosulfate Reductase as Glutaredoxin," *J. Bacteriol.*, vol. 146, no. 3, pp. 1059-1066, 1981.
19. M. Jozefczak *et al*, "Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defences," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, pp. 3145-3175, 2012.
20. L. Bräutigam, A. Holmgren, C. H. Lillig, L. Bräutigam, L. Dorothee, J. Rodrigo, T. Prozorovski, and M. Gellert, "Vertebrate-specific glutaredoxin is essential for brain development," *P. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 51, pp. 20532-20537, 2011.
21. G. Storz, M. Zheng, F. Åslund, and G. Storz, "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation," *Science*, vol. 279, pp. 1718-1721, 1998.
22. E. M. G. Allen, and J. J. Mieyal, "Protein-Thiol Oxidation and Cell Death: Regulatory Role of Glutaredoxins Protein-Thiol Oxidation and Cell Death," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 17, no. 12, pp. 1748-1763, 2012.
23. E. Pineda-Molina, P. Klatt, J. Vázquez, A. Marina, M. García de Lacoba, D. Pérez-Sala, S. Lamas, "Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding," *Biochemistry*, vol. 40, no. 47, pp. 14134-14142, 2001.
24. M. M. Gallogly, D. W. Starke, A. K. Leonberg, S. M. E. Ospina, J. J. Mieyal, "Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: Implications for intracellular roles," *Biochemistry*, vol. 47, pp. 11144-11157, 2008.
25. J. J. Mieyal and P. B. Chock, "Posttranslational Modification of Cysteine in Redox Signaling and Oxidative Stress: Focus on S-Glutathionylation," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 16, no. 6, pp. 441-475, 2011.
26. E. Cabisco, R. L. Levine, "The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation," *P. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 43, pp. 4170-4174, 1996.
27. N. M. Giles, A. B. Watts, G. I. Giles, F. H. Fry, J. A. Littlechild, and C. Jacob, "Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function," *Chem. Biol.*, vol. 10, pp. 677-693, 2003.
28. P. Klatt and S. Lamas, "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, pp. 4928-4944, 2000.
29. C. H. Lillig, C. Hudemann, E. Bill, C. H. Lillig, C. Berndt, O. Vergnolle, M. E. Lo, and A. Holmgren, "Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor," *P. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, no. 23, pp. 8168-8173, 2005.
30. T. Iwema, A. Picciocchi, D. A. K. Traore, J. L. Ferrer, F. Chauvat, L. Jacquamet, "Structural Basis for Delivery of the Intact [Fe₂S₂] Cluster by Monothiol Glutaredoxin," *Biochemistry*, vol. 48, no. 26, pp. 6041-6043, 2009.
31. M. T. Rodriguez-Manzanque, J. Tamarit, G. Bellí, J. Ross, E. Herrero and G. Bell, "Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron / Sulfur Enzymes," *Mol. Biol. Cell.*, 2002.
32. N. Rouhier, J. Couturier, M. K. Johnson, and J. P. Jacquot, "Glutaredoxins: roles in iron homeostasis," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 1, pp. 43-52, 2010.

33. L. Ojeda, G. Keller, U. Muhlenhoff, J. C. Rutherford, R. Lill, and D. R. Winge, "Role of Glutaredoxin-3 and Glutaredoxin-4 in the Iron Regulation of the Aft1 Transcriptional Activator in *Saccharomyces cerevisiae*," vol. 281, no. 26, pp. 17661–17669, 2006.
34. P. Haunhorst *et al*, "Crucial function of vertebrate glutaredoxin 3 (PICOT) in iron homeostasis and hemoglobin maturation," *Mol. Biol. Cell.*, vol. 24, 2013.
35. A. Seubert, C. H. Lillig, R. Godoy, M. A. Uzarska, N. Richter, A. Seubert, Y. Zhang, U. Mu, and S. Molik, "Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster," *Cell. Metab.*, vol. 12, pp. 373–385, 2010.
36. A. Cavalli and M. L. Bolognesi, "Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against trypanosoma and leishmania," *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 23, pp. 7339–7359, 2009.
37. L. I. Hannick *et al*, "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*" *Science*, vol. 309, pp. 416-422, 2005.
38. M. A. Comini and L. Flohe, "Trypanothione-Based Redox Metabolism of Trypanosomatids," In *Trypanosomatid Diseases, Molecular Routes to Drug Discovery*, T. Jager, O. Koch and L. Flohe, vol. 4, pp. 167-199, 2013.
39. M. A. Comini, R. L. Krauth-siegel, and M. Bellanda, "Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes," *Antioxid. Redox Signal*, vol. 19, no. 7, pp. 708-722, 2012.
40. S. Ceylan, V. Seidel, N. Ziebart, C. Berndt, N. Dirdjaja, R. L. Krauth-siegel, and T. D. Glutaredoxins, "The Dithiol Glutaredoxins of African Trypanosomes Have Distinct Roles and Are Closely Linked to the Unique Trypanothione Metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 45, pp. 35224–35237, 2010.
41. M. Filser, M. A. Comini, M. Maria, N. Dirdjaja, and R. L. Krauth-siegel, "Cloning , functional analysis , and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1," *Biol. Chem.*, vol. 389, no. 1, pp. 21–32, 2008.
42. M. A. Comini, J. Rettig, N. Dirdjaja, E. Hanschmann, C. Berndt, and R. L. Krauth-siegel, "Monothiol Glutaredoxin-1 Is an Essential Iron-Sulfur Protein in the Mitochondrion of African Trypanosomes," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 41, pp. 27785–27799, 2008
43. N. Mesecke, S. Mittler, E. Eckers, J. M. Herrmann and M. Deponte, "Glutathionylation of Trypanosomal Thiol Redox Proteins," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 8678-94, 2007.
44. G. Roos, N. Foloppe, and J. Messens, "Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 1, pp. 94–127, 2013.
45. G. B. Frederick, A. C. Thomas and D. L. Hughes, "Nucleophilicity, Basicity, and the Bronsted Equation," In *Nucleophilicity*, J. M. Harris, S. P. McManus, vol. 215, pp. 137–153, 1987.
46. S. Portillo-Ledesma, F. Sardi, B. Manta, A. Clippe, B. Knoop, B. Alvarez, E. L. Coitin, and G. Ferrer-Sueta, "Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin 5 Peroxidatic Cysteine," *Biochemistry*, vol. 53, no. 38, pp. 6113-6125, 2014.
47. F. Sardi, B. Manta, S. Portillo-ledesma, B. Knoop, M. A. Comini, and G. Ferrer-Sueta, "Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection," *Anal. Biochem.*, vol. 435, no. 1, pp. 74–82, 2013.

48. K. Döring, L. Konermann, T. Surrey and F. Jähnig, "A long lifetime component in the tryptophan fluorescence of some proteins," *Eur. Biophys. J.*, vol. 23, no. 6, pp. 423-32, 1995.
49. A. E. Wasserman, "Absorption and Fluorescence of Water-Soluble Pigments Produced by Four Species of *Pseudomonas*," *Appl. Microbiol.*, vol. 13, no. 2, pp. 175-180, 1965
50. N. S. Kosower, E. M. Kosower and H. M. Ranney, "Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiologic conditions," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 76, pp. 3382-3386, 1979.
51. E. M. Kosower and N. S. Kosower, "Bromobimane Probes for Thiols," *Methods in Enzymology*, vol. 251, pp. 133-148, 1995.
52. A. B. Ghisaidoobe, S. J. Chung, "Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 22518-22538, 2014.
53. L. D. Islas and W. N. Zagotta, "Short-range Molecular Rearrangements in Ion Channels Detected by Tryptophan Quenching of Bimane Fluorescence," *J. Gen. Physiol.*, vol. 128, no. 3, pp. 337-346, 2006.
54. A. E. Radkowsky and E. M. Kosower, "Bimanes. 17. (Haloalkyl)- 1,5-diazabicyclo[3.3.0]octadienediones (Halo-9,10-dioxabimanes): Reactivity toward the Tripeptide Thiol, Glutathione," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 108, pp. 4527-4531, 1986.
55. K. J. Ellis and J. F. Morrison, "Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes," *Methods Enzymol.*, vol. 87, pp. 405-426, 1982.