

Premios y menciones

PREMIO PROFESOR “DR. EZZIO EMILIANI”

Profesor “Dr. Ezzio Emiliani” a la mejor Tesis Doctoral en Biotecnología

Instituido por Resolución del CD 724 del 9 de diciembre de 2004, en memoria del Dr. Emiliani quien trabajó sobre temas que hoy tienen plena vigencia. Se desempeñó en la Facultad de Ingeniería Química desde el año 1949, ejerciendo una labor docente y de investigación de gran responsabilidad, de profunda seriedad y disciplina, de relevante trascendencia, que alcanzó nivel superior no solo en el ámbito nacional, sino también en el internacional. Fue, además, formador de investigadores que junto a él crecieron en saber y en capacidad, mostrando las dotes de los maestros como lo supieron apreciar muchos Ingenieros Químicos y Bioquímicos que fueron sus discípulos.

Fue designado Profesor Emérito en 1973 como Director del Departamento de Microbiología; integró el Consejo Directivo de la FIQ; fue Presidente del Consejo de Investigaciones de la UNL y representante de la misma ante la Comisión Asesora de Investigaciones Científicas del Consejo de Rectores de Universidades Nacionales, entre otros.

Jurado interviniente en la evaluación de los trabajos presentados al Premio del año 2011:

- Dr. Mariano Grasselli (Departamento de Ciencia y Tecnología) UNQ-CONICET
- Dr. Juan Pablo Ortiz (Facultad de Ciencias Agrarias) UNR-CONICET
- Dr. Jorge Reinheimer Facultad de Ingeniería Química-INLAIN-UNL-CONICET

Obtención de anticuerpos recombinantes anti-IFN- α 2b destinados a uso terapéutico humano

Autor: Dr. Depetris, Matías A.

Directora: Dra. Marina Etcheverrigaray

Codirector: Dr. Marcos Oggero

Lugar de realización: Laboratorio de Cultivos Celulares. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 20 de agosto de 2009.

Resumen

El IFN- α expresión endógena aumentada de IFN- α se asocia a numerosas desórdenes inflamatorios y enfermedades auto-

inmunes donde la citoquina puede ser un factor en el inicio o en el mantenimiento de la patología. En la actualidad, varios mAbs se comercializan para numerosas indicaciones y muchos se encuentran en etapas de ensayos clínicos, representando el IFN- α un potencial candidato para este tipo de terapias basadas en anticuerpos.

En el presente trabajo se obtuvo un fragmento recombinante a partir de un mAb (CA5E6) seleccionado por sus características de unión con el rhIFN- α 2b que fue capaz de inhibir la acción antiviral de un

conjunto heterogéneo de hIFN- α s, optimizándose su afinidad hasta el punto, en una primera instancia, de incrementar el valor de la correspondiente al mAb completo original ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del scFv EP18 frente a $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del mAb CA5E6).

Por otro lado, se evaluó la actividad neutralizante in vivo de la actividad antitumoral por parte del mAb CA5E6 parental utilizando células PC-3 tumorales humanas implantadas en ratones nude atímicos. En este ensayo se observó que los grupos de ratones correspondientes a los tratamientos con rhIFN- α 2b y con esta citoquina en presencia del mAb CA5E6 exhibieron una diferencia significativa ($p = 0,011$) entre los pesos promedios de los tumores correspondientes a los dos tratamientos (0,39 g y 0,92 g, respectivamente). Asimismo, no se observó diferencia significativa ($p = 0,3$) entre el grupo control (sin rhIFN- α 2b) y el grupo de animales tratados con el mAb CA5E6, confirmando el bloqueo de la actividad biológica del IFN.

Introducción

A pesar de que el IFN- α presenta actividades antiviral y antiproliferativa, y por lo tanto está indicado para el tratamiento de tumores y de ciertas infecciones virales, su expresión endógena aumentada se asocia a numerosos desórdenes inflamatorios y enfermedades autoinmunes donde la citoquina puede ser un factor en el inicio o en el mantenimiento de la patología. En pacientes que sufren lupus eritematoso sistémico se han detectado niveles elevados de IFN- α inducido por la acción de complejos inmunes sobre células mononucleadas de sangre periférica (1). Por otro lado, varias citoquinas, especialmente el IFN- α , se han visto implicadas en la patogénesis

de la diabetes tipo I en modelos animales y humanos (2). Adicionalmente, se ha demostrado la incidencia IFN- α en el desarrollo de la psoriasis (3).

Los efectos nocivos y síntomas generados por la liberación incrementada de IFN- α durante el transcurso de diferentes patologías podrían suprimirse con la utilización de anticuerpos monoclonales neutralizantes de dicha citoquina. Dada la inmunogenicidad registrada en humanos por parte de las inmunoglobulinas murinas, su utilidad en el tratamiento de enfermedades crónicas es limitada. Consecuentemente, en el presente trabajo se plantea el desarrollo de anticuerpos recombinantes anti-rhIFN- α 2 para su utilización terapéutica en los casos en que la producción endógena de dicha citoquina comprometa la salud humana.

En la actualidad, varios mAb se comercializan para numerosas indicaciones y muchos se encuentran en etapas de ensayos clínicos (4), representando el IFN- α un potencial candidato para este tipo de terapias basadas en anticuerpos neutralizantes.

Resultados y conclusiones

En el presente trabajo se obtuvo un panel de 11 mAbs (CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 y CB33B3) que demostraron capacidad de reconocimiento específico de rhIFN- α 2b inmovilizado en fase sólida. De igual manera, todos los mAbs exhibieron capacidad para reconocer a la citoquina en su estado nativo, observándose un rango de afinidades que osciló entre $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $1,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

En una etapa posterior, se estudió la especificidad de los epitopes reconocidos por cada mAb, estableciendo una ubicación relativa de los mismos en la molécula del

rhIFN- α 2b mediante ensayos de competición entre pares de mAbs. Cada inmunoglobulina constituye una entidad diferente, y a pesar de que grupos de anticuerpos presentaron similar especificidad por el epítipo identificado, existirían mínimas variaciones estructurales responsables de alteraciones a nivel del reconocimiento antigénico. Dichas variaciones dificultaron el agrupamiento de los mismos durante el mapeo de epítopos de la citoquina, manifestándose en forma más notoria al analizar otras propiedades de los anticuerpos como, por ejemplo, la capacidad de reconocimiento de la molécula parcialmente desnaturalizada o las propiedades neutralizantes de la actividad biológica del IFN. Así, anticuerpos que fueron agrupados en áreas moleculares comunes mediante el método competitivo, evidenciaron comportamientos diferentes cuando se analizaron otras propiedades de los mismos. De todas maneras, el mencionado método permitió clasificar a los anticuerpos según su capacidad para reconocer 4 áreas relativamente diferentes entre sí (I, II, III y IV) identificándose, para un área en particular, variaciones en el comportamiento de los mAbs que la mapearon. Estas variaciones son inherentes a la naturaleza de los anticuerpos.

En ensayos de neutralización de la actividad biológica *in vitro* del rhIFN- α 2b los mAbs CA1A3 y CB27H2 mostraron la mayor acción neutralizante. Los mAbs CB15D7, CA2G7, CA5E6 y CB29D3 neutralizaron en diferente medida la actividad antiviral de la citoquina, observándose en general un mayor grado de neutralización cuando la afinidad de los mAbs fue mayor.

Teniendo en cuenta la habilidad neutralizante de la actividad biológica *in vitro* del IFN- α 2b, la capacidad para mapear dife-

rentes áreas moleculares de la citoquina y el valor de sus constantes de afinidad, los mAbs CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CB27H2 fueron seleccionados para la preparación de fragmentos recombinantes scFv (5).

La estrategia de obtención de fragmentos scFv recombinantes a partir de hibridomas productores de mAbs involucró la extracción del ARN total de dichas células, la purificación del ARN mensajero correspondiente y el clonado de las regiones variables de la cadena pesada (V_H) y de la cadena liviana (V_L) de forma individual. Una vez obtenidos, los fragmentos de ADN de cada cadena se ensamblaron mediante un *linker* flexible para constituir los fragmentos scFv. Luego de llevar a cabo el procedimiento de *phage-display* sólo fue posible seleccionar clones productores de scFvs con capacidad de reconocimiento específico del rhIFN- α 2b correspondientes a los mAbs CA5E6 y CB27H2. Posteriormente, los fragmentos scFv CA5E6 y CB27H2 fueron producidos en forma soluble en el espacio periplásmico de la bacteria *E. coli* HB2151 y purificados mediante cromatografía de afinidad.

El procesamiento llevado a cabo para preparar fragmentos scFv a partir de sus inmunoglobulinas parentales puede generar modificaciones en el arreglo estructural o conformacional del sitio de reconocimiento antigénico que afecten la especificidad y/o afinidad de los mismos. En particular, la especificidad de los fragmentos frente al IFN fue confirmada para ambos anticuerpos recombinantes (scFv CA5E6 y CB27H2). Por lo tanto, con el fin de evaluar si las nuevas moléculas presentaron modificaciones a nivel de la energía de interacción con su antígeno específico, se llevaron a cabo ensayos para medir la constante de afinidad de cada fragmento. En el caso del scFv

CA5E6 no se observó una disminución significativa de la afinidad con respecto al mAb completo ($1,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). Por otro lado, el fragmento CB27H2 presentó una disminución notable en su afinidad comparándolo con su correspondiente mAb ($0,37 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $11,00 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). En este caso, la pérdida de las regiones constantes afectaría la conformación adoptada por el sitio de unión al epítopo, no pudiendo aportar, el *linker flexible*, una estabilización adicional. Contrariamente, en el fragmento scFv CA5E6 la estabilización de las regiones variables asistida por el mencionado *linker* resultó eficiente para retener en gran medida la afinidad del anticuerpo de origen.

Aun considerando el hecho de que los mAbs fueron generados utilizando únicamente una variante del hIFN- α , se planteó la posibilidad de estudiar la capacidad neutralizante de la actividad biológica antiviral de un grupo heterogéneo de subtipos de esta citoquina por parte de los scFv CA5E6 y CB27H2. El fragmento CA5E6 demostró capacidad para neutralizar, en grado diverso, la actividad biológica antiviral de todos los hIFN- α ensayados, incluidas las especies comprendidas en los denominados IFN leucocitario y linfoblástico.

La existencia de una correlación comprobada entre la expresión incrementada de diferentes subtipos de IFN- α con diversas enfermedades autoinmunes, justifica la selección del fragmento scFv CA5E6 como potencial candidato terapéutico. Con tal objetivo, y en la búsqueda de mejorar sus propiedades biológicas, se planteó una estrategia orientada a incrementar su capacidad de interacción con la citoquina. Para ello, a partir de su secuencia nucleotídica se generó una biblioteca de scFvs mutados (6)

que posteriormente se analizó mediante una variante de la técnica de *phage-display*. Con esta metodología se obtuvo un panel de 11 scFv solubles con un número de mutaciones que varió entre 1 y 4 sustituciones aminoacídicas. La mayoría de los fragmentos mutados exhibieron constantes de afinidad que no demostraron diferencias significativas con el anticuerpo original (valores entre $1,0 \cdot 10^8$ y $1,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$). Por otro lado, el scFv EP18 y el EP33 mostraron un incremento en su constante de afinidad ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $3,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$; respectivamente). Adicionalmente, se estudió la capacidad neutralizante de la actividad biológica anti-viral in vitro del hIFN- α por parte de ambos fragmentos. El scFv EP18 demostró una capacidad neutralizante levemente superior al fragmento CA5E6 "*wild type*" (0,20 nM y 0,40 nM, respectivamente), mientras que fue necesaria una mayor concentración del scFv EP33 (1,00 nM) para neutralizar la misma masa de rhIFN- α 2b.

En conclusión, se obtuvo un fragmento recombinante a partir de un mAb (CA5E6) seleccionado por sus características de unión con el rhIFN- α 2b que fue capaz de inhibir la acción antiviral de un conjunto heterogéneo de hIFN- α s, optimizándose su afinidad hasta el punto, en una primera instancia, de incrementar el valor de la correspondiente al mAb completo original ($3,50 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del scFv EP18 frente a $2,20 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ del mAb CA5E6).

Para completar la etapa preliminar en la búsqueda de un anticuerpo con propiedades neutralizantes del exceso de IFN- α endógeno producido en determinadas patologías humanas, se realizó un ensayo exploratorio o de concepto para valorar la actividad in vivo de la citoquina. Dicha experiencia se basó en el uso de células PC-3

tumorales humanas (de origen prostático) y ratones nude atímicos, analizando la actividad antitumoral del rhIFN- α 2b mediante el estudio de su capacidad para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados en dichos ratones inmunocomprometidos. Posteriormente, se evaluó la acción neutralizante *in vivo* de dicha actividad antitumoral por parte del anticuerpo original mAb CA5E6 utilizando dicho procedimiento.

En el primer ensayo se comprobó la actividad antiproliferativa del rhIFN- α 2b sobre el crecimiento de las células tumorales humanas PC-3 al encontrarse una diferencia significativa ($p = 0,007$) entre los pesos promedio de los tumores desarrollados por los ratones sin tratar con rhIFN- α 2b frente a la medida resultante en los ratones que se sometieron al tratamiento con la citoquina (0,67 g y 0,31 g, respectivamente).

En la siguiente experiencia se observó que los grupos de ratones correspondientes a los tratamientos con rhIFN- α 2b y con esta citoquina en presencia del mAb CA5E6 exhibieron una diferencia significativa ($p = 0,011$) entre los pesos promedios de los tumores correspondientes a los dos tratamientos (0,39 g y 0,92 g, respectivamente). Asimismo, no se observó diferencia significativa ($p = 0,3$) entre el grupo control (sin rhIFN- α 2b) y el grupo de animales tratados con el mAb CA5E6, confirmando el bloqueo de la actividad biológica del IFN.

En síntesis, es posible concluir que el mAb CA5E6 fue capaz de neutralizar la acción antiproliferativa de la citoquina en un sistema *in vivo*, proyectando el potencial terapéutico de esta inmunoglobulina.

Referencias bibliográficas

1. Batteux, F.; Palmer, P.; Daeron, M.; Weill, B. y Lebon, P. 1999. Fc γ RII (CD32)-dependent induction of interferon- α by serum from patients with lupus erythematosus. *Eur. Cytokine Netw.* **10**, 4: 509-514.
2. Chakrabarti, D.; Hultgren, B. y Stewart, T.A. 1996. IFN- α induces autoimmune T cells through the induction of intracellular adhesion molecule-1 and B7.2. *J. Immunol.* **157**: 522-528.
3. Nestle, F.O.; Conrad, C.; Tun-Kyi, A.; Homey, B.; Gombert, M.; Boyman, O.; Burg, G.; Liu, Y.J. y Gilliet, M. 2005. Plasmacytoid dendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J. Exp. Med.* **4**, 202:135-43.
4. Reichert, J.; Rosensweig, C.; Faden, L. y Dewitz, M. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* **23** 1073-1078.
5. Skerra, A.; Pfitzinger, I. y Plückthun, A. 1991. The functional expression of antibody Fv fragments in *E. coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Bio/Technology* **9**: 273-278.
6. Cadwell, R.C. y Joyce, G. F. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2**: 28-33.

Development of monoclonal antibodies against IFN- α 2b for therapeutic use in humans.

Summary

Despite IFN- α presents antiviral and antiproliferative activities, and thus being indicated for certain viral infections and tumour treatment, its increased endogenous expression is associated with inflammatory disorders and autoimmune illnesses, in which cytokine can be a factor either in the beginning or in the maintenance of the pathology. Nowadays, various mAbs are commercialized for numerous indications and many of

them are in clinic test stage, being IFN- α a potential candidate for these type of antibody-based therapies.

A recombinant fragment was obtained from a mAb (CA5E6) selected from its interaction characteristics with the rhIFN- α 2b capable to inhibit the antiviral action of an heterogeneous group of hIFN- α s, optimizing its affinity up to the point to, in a first instance, increase the value of the corresponding to the original complete mAb.

Besides, the in vivo neutralizing activity of the parental CA5E6 mAb antitumoral activity was evaluated, using humane tumoral PC-3 cells implanted in atomic nude mice. It was observed that the groups of mice

corresponding to the treatment with rhIFN- α 2b and with this cytokine in presence of the CA5E6 mAb, exhibited a significant difference in the average weight of both treatments (0.39 g and 0.92 g, respectively). Additionally, the control group (rhIFN- α 2b) and the group of animals treated with the CA5E6 mAb did not show a significant difference ($p=0.3$), confirming the blockage of the IFN biological activity.

It is possible to conclude that the CA5E6 mAb was capable of neutralizing the cytokine's antiproliferative action in an in vivo system, projecting the therapeutical potential of this immunoglobulin.

Caracterización de genes de plantas involucrados en la respuesta a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

MENCIÓN

Autor: Dr. Daurelio, Lucas D.

Directora: Elena G. Orellano

Codirectora: Jorgelina Ottado

Lugar de realización: Rosario, Santa Fe, Argentina

Fecha de la defensa: 24 de febrero de 2009

Resumen

La cancrrosis de los cítricos es la enfermedad producida por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) que afecta a todas las especies del género Citrus. Esta enfermedad, declarada endémica en nuestro país, genera cuantiosas pérdidas a nivel de la producción y de la comercialización de los frutos, siendo uno de los problemas

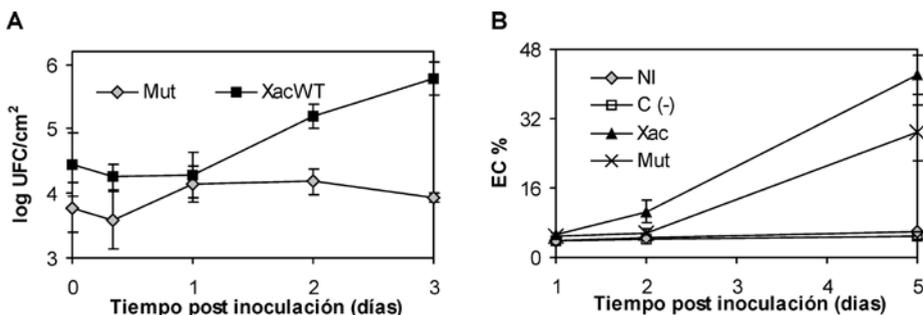
más grave que debe afrontar la actividad citrícola. Debido a que no se conocen hasta la actualidad cultivares del género resistentes a la enfermedad, no es posible planificar estrategias de mejoramiento clásico. En este sentido se decidió estudiar interacciones planta-patógeno que involucren a Xac y/o plantas de *C. sinensis* cv. Valencia Late (naranja), con el objetivo de dilucidar las bases moleculares que producen los distintos tipos de respuestas. El enfoque molecular se llevó a cabo estudiando los cambios en la transcripción de genes de las plantas en presencia de los patógenos, con el objetivo de encontrar genes que participen en la respuesta de defensa o en el desarrollo de la enfermedad.

Evaluación de la respuesta de cítricos a Xac e identificación de genes de cítricos que modifican su expresión durante la interacción

En primer lugar se analizaron los cambios en el transcriptoma de naranjo en la interacción con Xac que produce la cancrrosis. Para esto, se analizó la respuesta temprana de los cítricos frente a las cepas de Xac salvaje y una mutante en el Sistema de Secreción de Tipo III (XacHrpB⁻ o Mut). La mutante nos permitió evaluar que parte de la respuesta a Xac corresponde a la respuesta basal o innata, debido a que es incapaz de formar el injectosoma y secretar los efectores correspondientes, pero aún conserva las moléculas tipo PAMPs causantes de dicha respuesta. De esta manera, al comparar la respuesta de la planta frente a Xac y a Mut, podríamos detectar transcritos de respuesta específica al SSTT o a los efectores secretados por el mismo.

Se realizaron curvas de crecimiento tomando muestras a tiempos pi tempranos donde se observó que el patrón de crecimiento a tiempos posinfiltración (pi) cortos para ambas cepas es similar (Figura 1). Análisis de liberación de iones mostraron que Xac provoca un daño en la membrana celular notable a partir de las 48 h pi, mientras que Mut generó daño a los 5 d pi, indicando que la planta no estaría reaccionando a ninguna de las dos cepas a tiempos cortos (Figura 1). El daño observado a tiempos tardíos pi se puede atribuir en el caso de la cepa salvaje a la ruptura del tejido y la desorganización celular como consecuencia de los síntomas generados por la enfermedad, que provoca entre otros síntomas de hiperplasia celular (1). En el caso de la mutante, las diferencias observadas podrían ser consecuencia de la presencia de las PAMPs que actuarían despertando la respuesta basal de la planta (2).

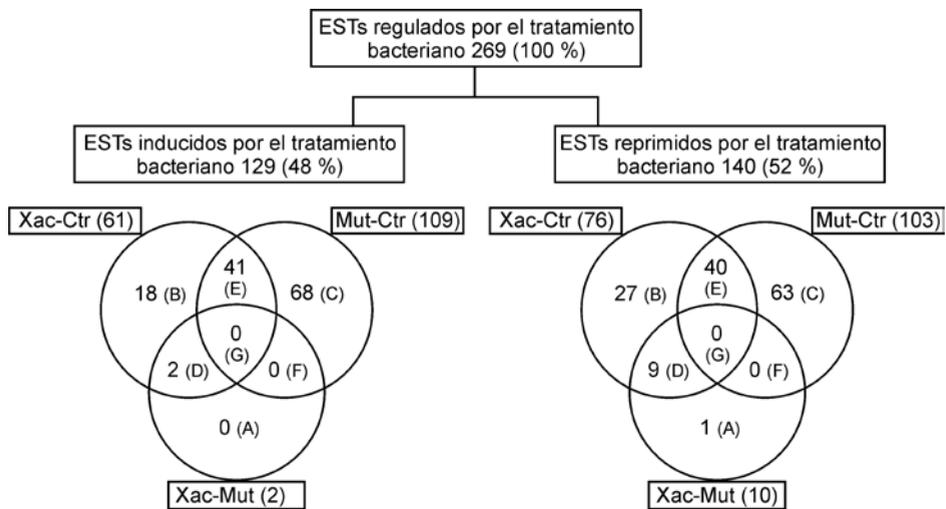
Figura 1. Estudio de la respuesta temprana de naranjo (*C. sinensis* cv. Valencia Late) frente a Xac y Mut XachrpB⁻. (A) Curvas de crecimiento bacteriano de la cepa salvaje y la mutantes en el SSTT en hojas de naranjo. Los valores representan la medida de tres muestras y las barras de error representan las desviaciones estándar. (B) Ensayo de liberación de iones indicativo de disrupción de la membrana plasmática del tejido vegetal. Se indican los porcentajes de iones liberados del total obtenidos en el tiempo para ambas cepas, el control negativo C (-) (MgCl₂ 10 mM) y de tejido sin infiltrar (NI).



Posteriormente se analizaron los cambios transcripcionales a fin de poder detectar aquellos genes de respuesta temprana, previos al inicio de la replicación de Xac. Se realizaron infiltraciones con ambas bacterias por separado en hojas de *C. sinensis* cv. Valencia Late y se tomaron muestras a

las 8 h pi de las plantas control e infectadas. De las 21.081 secuencias etiquetadas (ESTs) impresas en la micromatriz de cDNA utilizada (3), únicamente un 1,3 % (269 ESTs = 100%) modifican su expresión por la presencia de Xac, Mut o en ambas (Figura 2).

Figura 2. Diagramas de Venn de los ESTs regulados por la presencia de los tratamientos bacterianos en hojas de naranjo. Los rectángulos indican los tratamientos analizados y el número respectivo de ESTs correspondiente a cada uno de dichos tratamientos. Las letras asignadas entre paréntesis fueron incorporadas para una mayor claridad en el texto.



La clasificación funcional de los transcritos mostró frecuencias similares de ESTs inducidos o reprimidos para cada categoría. Estos resultados indican que existe una escasa diferencia en los cambios observados a nivel transcripcional en naranjo entre los tratamientos con Xac o Mut a las 8 h pi, y para cada una de ellas comparada con el control.

Los subgrupos a considerar fueron el G (ESTs además diferenciales entre los tratamientos bacterianos y sus controles) y F (ESTs que se diferencian además en Mut-Ctr) donde ningún EST presentó expresión diferencial, mientras que 11 ESTs (4,1 %) se

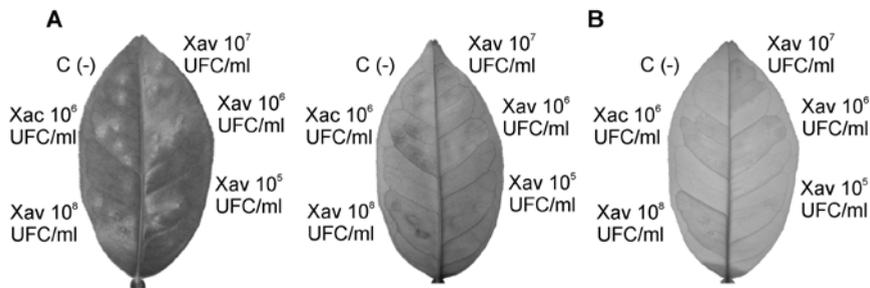
observan en el subgrupo D (ESTs además diferenciales entre Xac-Ctr), de los cuales 2 presentaban inducción y 9 represión frente a Xac. Los mismos se estarían diferenciando en la interacción con Xac frente al control, no así en el caso de la interacción con Mut, dando el indicio de que podrían estar relacionados a la presencia del SSTT o a alguno de los efectores secretados por el mismo. Este subgrupo incluyó genes cuya regulación por dichos efectores podría conducir al desarrollo de la cancrrosis, como ser los codificantes para una proteína SUMO tipo 1 (*small ubiquitin-like modifier*), una Ferredoxina

xina–NADP+ reductasa, una RGC2 (*resistance gene candidate*), una MAPKKK4 quinasa llamada YODA, una tubulina gama, una proteína GRP7 (small glycine-rich RNA binding protein), una Glutamato–cisteína ligasa (GSH1), y una deshidrogenasa de la vía catabólica de la lisina.

Caracterización de la respuesta y análisis del transcriptoma de cítricos en la interacción con Xav

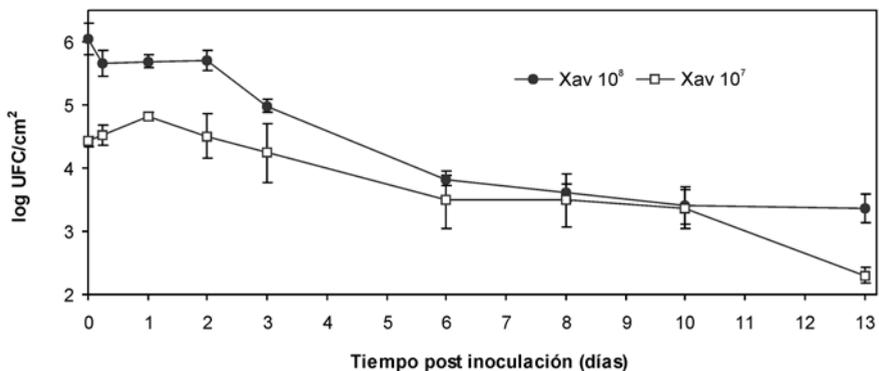
En segundo lugar se estudió la respuesta de plantas de naranjo en la interacción incompatible no hospedadora frente a la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), perteneciente al mismo género que Xac. La observación de los síntomas fenotípicos en hojas mostró daño en forma rápida y con características de necrosis y muerte celular (Figura 3).

Figura 3. (A) Estudio de la respuesta de naranjo frente a Xav a 48 h pi, en ambos lados de la hoja. (B) Observación mediante decoloración con etanol a las 48 h pi. Las diluciones bacterianas utilizadas en UFC/ml se indican en la figura.



Para confirmar que estos síntomas se debían a la respuesta de defensa por parte de la planta se realizaron curvas de crecimiento del patógeno observándose, como era esperado, que Xav no aumentó en el número de células (Figura 4).

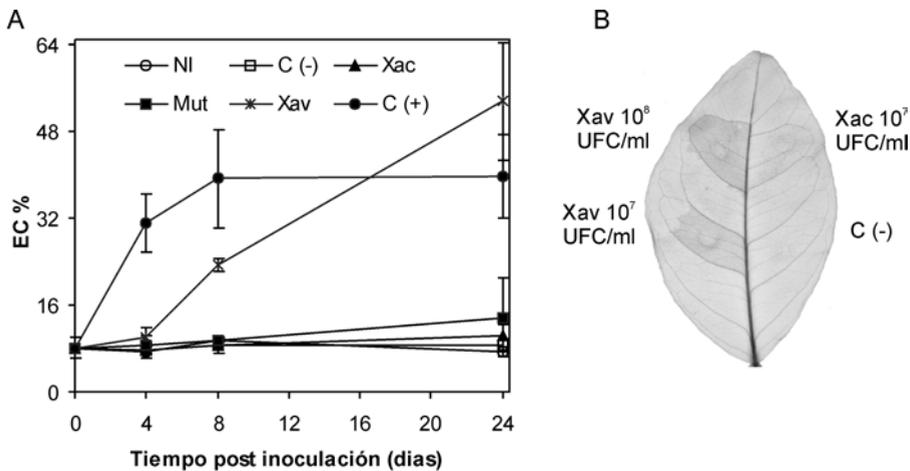
Figura 4. Curvas de crecimiento bacteriano para 10⁶ UFC/ml y 10⁷ UFC/ml de Xav, inoculadas en hojas de naranjo. Los valores representan la medida de tres muestras y las barras de error los desvíos estándar respectivos.



Un síntoma característico de la respuesta de defensa no hospedadora de tipo hipersensible (HR) en plantas es la liberación de iones debido a la disrupción de la membrana celular y la producción de especies reactivas del

oxígeno (ROS) por parte de la planta. La presencia de Xav mostró una fuerte y rápida inducción en ambas características en hojas de naranjo indicando una respuesta de éste tipo (Figura 5).

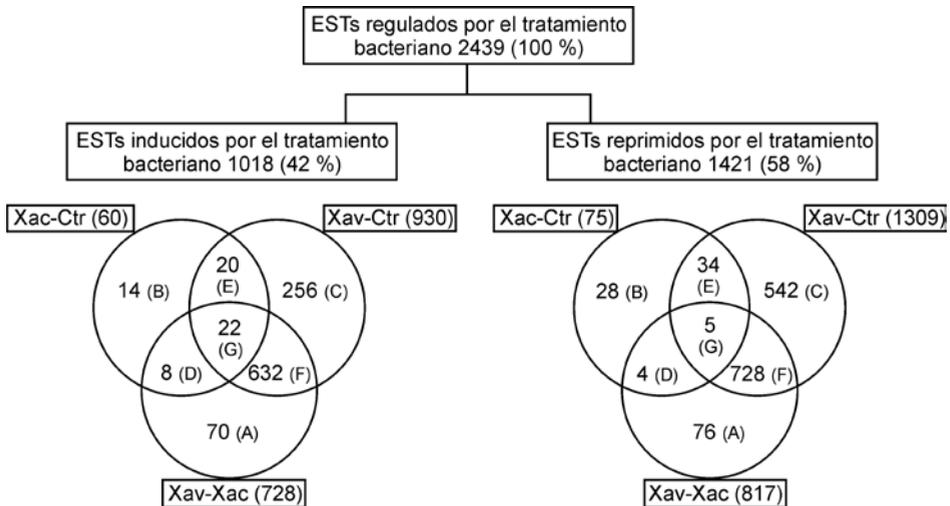
Figura 5. (A) Ensayo de liberación de iones. Se indican los porcentajes de iones liberados del total en el tiempo para Xav, Xac, Mut, C (+) (AS 1 mM), C (-) (MgCl₂ 10 mM) y de tejido sin infiltrar (NI). (B) Tinción de DAB indicando la presencia de H₂O₂. Las hojas fueron infiltradas con diluciones de las cepas indicadas y el C (-).



Posteriormente se analizaron los cambios de expresión de genes en naranjo frente a Xav, de manera de detectar genes involucrados en la respuesta que modificaran su expresión en comparación con la presencia

de Xac o enfermedad. De los 21.081 ESTs, un 11,56 % (2439 ESTs = 100%) modifican su expresión por la presencia de Xav, Xac o en ambas (Figura 6).

Figura 6. Diagramas de Venn de los ESTs regulados por la presencia de los tratamientos bacterianos en hojas de naranjo. Los rectángulos indican los tratamientos analizados y el número respectivo de ESTs correspondiente. Las letras asignadas entre paréntesis fueron incorporadas para una mayor claridad en el texto



Analizando las cantidades de ESTs que presentaron expresión diferencial puede observarse una cantidad mucho mayor en la interacción con Xav comparada con Xac (Figura 6). Esto es concordante con el hecho de que en la interacción no hospedadora se produce una respuesta más fuerte y rápida. Las categorías funcionales “rescate celular, defensa y virulencia” e “interacción con el medioambiente” fueron las que presentaron una mayor proporción de ESTs diferenciales indicando que la respuesta involucra genes pertenecientes a las mismas.

Los subgrupos a considerar son las intersecciones que involucran el grupo Xav–Xac (subgrupos F y G), o sea aquellos ESTs que estarían relacionados con la respuesta de la planta a Xav en forma específica (Figura 6). Estos abarcaron entre ambos más del 50 % de los ESTs diferenciales, incluyendo: 8 proteínas relacionadas a patogénesis (PR), 5 proteínas de defensa, 13 proteínas de regu-

lación de la transcripción, 9 proteínas involucradas en la cascada de señales, 6 proteínas relacionadas al metabolismo de defensa y 6 proteínas de metabolismo de ROS. Se observó además el aumento de expresión en presencia de Xav de un EST homólogo a un alelo de la Oxidasa Alternativa Mitocondrial (Aox).

Análisis de la Aox de naranjo y su participación en la respuesta hospedadora y no hospedadora

Como consecuencia del aumento de la expresión del alelo de la Aox mencionado, se decidió analizar en detalle esta familia génica en naranjo y su participación en el estrés biótico.

En primer lugar se realizaron estudios de amplificación y clonado de la región conservada de esta proteína y se secuenciaron dos fragmentos, uno perteneciente a la subfamilia de tipo 1 y el otro a la de tipo 2

(*AoxOra 1* y *AoxOra2* respectivamente). Utilizando el fragmento *AoxOra 1* en ensayos de *Southern Blot* se detectaron dos alelos correspondientes a la subfamilia de tipo 1, uno de los cuales fue clonado (*Aox1a*). La secuenciación del fragmento arrojó un total de 2103 pb abarcando 1749 pb de la región codificante de la *Aox1a* y 354 pb correspondientes a su región promotora. La estructura de éste alelo fue similar a la mayoría de las *Aox1* de plantas superiores, consistente de 4 exones separados por 3 intrones. La secuencia del correspondiente ADNc fue ensamblada y traducida, presentando los aminoácidos conservados a lo largo de todas las AOX secuenciadas hasta la fecha. En análisis filogenéticos se observó que la enzima AOX1a se agrupó con proteínas similares de especies relacionadas, confirmando que ésta pertenece a la subfamilia 1 de las *Aox*. Además, considerando que las distancias podrían indicar el origen de un antecesor en común, se pudo observar que el mismo sería compartido con las proteínas AOX1a de *Arabidopsis* y AOX1 de caupí. En la región promotora se localizaron motivos de regulación putativos (Tabla 1), reconocidos por factores de transcripción que

participan en procesos como respuesta a la luz (G-box, I-Box, MRE, GT1-Motif), hormonas (ABRE, GCC Box), estrés (GC Motif), ciclo celular (E2F-2) y desarrollo de tejidos (SEF1 Motif). Además fueron localizadas secuencias regulatorias que participan en la interacción con patógenos (W-BOX y PR BOX). Notablemente en esta porción de la región promotora de la *Aox1a* no se encontró ninguna región de respuesta a Ácido Salicílico, lo cual sugiere que este alelo no estaría bajo su regulación, a diferencia de algunos alelos de *Aox* encontrados hasta la fecha (4). Cuando esta región promotora se comparó con la región denominada MRR (región de respuesta retrógrada mitocondrial) de la *Aox1a* de *Arabidopsis* (5) se pudo observar que a pesar de la baja homología presentada a nivel de secuencia, todos los motivos de unión a factores de transcripción encontrados en la región MRR están presentes en la zona promotora secuenciada de la *Aox* de naranjo, a excepción de un sitio CCA1 involucrado en la regulación del reloj circadiano (5, 6). Esta gran similitud indica que la regulación de la *Aox* sería, además de compleja, altamente conservada.

Tabla 1. Elementos putativos de unión a proteínas reguladoras de la región promotora de la *Aox1a* de naranja indicando funciones, posiciones y hebra sobre la que se localizan.

Nombre	Función	Posición	Hebra
G-BOX	Respuesta a la luz.	-423	+, +
I-BOX	Respuesta a la luz.	-195	+
MRE	Respuesta a la luz.	-143	+, +
GT1 Motif	Respuesta a la luz.	-86	-
ABRE	Respuesta a ABA.	-253	-
W-Box	Asociada con defensa a patógenos.	-168	-
GC Motif	Inducible específicamente por anoxia.	-177	+
PR BOX	Caja PR.	-123	-
E2F-2	Genes relacionados al ciclo celular.	-75	+
GCC Box	Motivo relacionado al Etileno.	-173	+
SEF1 Motif	Involucrado en desarrollo de tejidos.	-293	-
Dof Motif	Procesos específicos de plantas.	-65	-

Debido a la presencia de sitios de unión a factores de transcripción de respuesta a estrés biótico, como las cajas W-Box y PR Box, se decidió analizar la participación de la *Aox1a* de naranjo bajo distintos tipos de tratamientos, mediante análisis de expresión utilizando RT-PCR semicuantitativa. Los resultados indicaron que esta *Aox* tipo 1 de naranjo no se induce en la interacción compatible frente a *Xac*, presentando niveles bajos de expresión, pero si en la HR frente a *Xav* (resultado que corrobora lo observado en el ensayo de microarrays), cuya función propuesta sería contribuir en el mantenimiento del flujo de electrones evitando así la sobresaturación en la cadena de transporte mitocondrial. Además la *Aox1a* de naranjo cumpliría una función similar en la interacción con hongos y artrópodos, pero mediante un mecanismo de inducción distinto a los anteriores. Por otro lado no se observó inducción frente a ácido salicílico (AS) lo que sugiere que la expresión de la *Aox* tipo 1 de naranjo no sería dependiente de ésta vía. Si bien cabe la posibilidad de esperar inducción en tiempos más cortos por AS, esto no ocurre en los casos reportados donde la inducción se observa a las 28 h pi (7).

Caracterización de genes de plantas no hospedadoras involucrados en la interacción con *Xac*

Como una aproximación diferente se decidió estudiar cambios en la expresión de genes en plantas no hospedadoras que produzcan HR en la interacción con *Xac*, de manera de detectar genes de defensa que modificaran su expresión involucrados en la respuesta a la misma. Este análisis de la interacción con *Xac* fue realizado en plantas no hospedadoras de tabaco (*Nicotiana tabacum*

cv. Petit Habana) y utilizando la técnica de ADNc-AFLP a las 2, 8 y 24 h pi. Como control se tomó la muestra a las 2 h pi ya que de existir modificaciones a nivel transcripcional debido al mecanismo de infiltración, las mismas deberían aparecer a tiempos cortos.

Fueron utilizadas 39 combinaciones de cebadores que permitieron analizar un total de 2087 transcritos (FDTs), de los cuales 316 presentaron expresión diferencial. Se consideraron para la clasificación seis grupos de FDTs que aumentaban o disminuían su nivel de expresión para cada uno de los tiempos pi. Esta clasificación se realizó comparando con el patrón de expresión del tiempo inmediato anterior. Un cambio en el nivel de expresión se consideró cuando la intensidad de la banda aumentó al doble o disminuyó de la mitad. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Continuando con el estudio de la respuesta de tabaco frente a *Xac* se eligieron 130 de los FDTs que presentaron expresión diferencial, con el objetivo de secuenciarlos. Se seleccionaron FDTs que presentaran un tamaño mayor a 100 pb (de manera tal de aumentar la probabilidad de encontrar secuencias homólogas en las bases de datos) y que además presentaran un cambio notorio en la expresión (altamente reprimidos o inducidos). Se consideraron las bandas que modificaron su expresión a 2 y 8 h pi preferentemente, debido a que tendrían una mayor probabilidad de estar involucrados en la respuesta al patógeno. Se obtuvieron secuencias analizables de 82 TDFs, de los cuales mediante análisis de homología se asignó una función putativa al 63 % de los mismos (51 FDTs), mientras que el 15 % presentó homología a secuencias sin función asignada (13 FDTs) y el 22 % no presentó homología alguna (18 FDTs).

Tabla 2. Resumen de los TDFs analizados. N°: número de transcriptos; % del análisis: % de los 2087 transcriptos analizados; % del total: % del transcriptoma total de tabaco. Down o Up y el tiempo pi respectivo indica si presentaban una disminución o aumento en los niveles de expresión y en que tiempo pi respectivamente.

FDTs	N°	% del análisis	% del total
Totales	2087	100	20
Diferenciales	316	15.1	2.8
Down	138	6.6	1.2
Up	178	8.5	1.6
2 h pi Up	56	2,7	0,5
2 h pi Down	25	1,2	0,2
8 h pi Up	101	4,8	0,9
8 h pi Down	76	3,6	0,7
24 h pi Up	21	1	0,2
24 h pi Down	37	1,8	0,3

Del total, 5 FDTs presentaron funciones relacionadas a la respuesta de defensa a patógenos (1 a las 2 h pi y 4 a las 8 h pi). Estas presentaron homología a una quitinasa de la familia 18 también llamadas h-type o clase III, una lipasa clase 3, una quitinasa/lisozima de tabaco de clase V dentro del grupo de las PR-3, una PR-10 y una proteína receptora de una xilanasa elicitadora de origen fúngico (EIX) inductora de etileno. El patrón de expresión fue confirmado mediante Real Time PCR en 5 de 6 TDFs analizados.

Referencias

1. Brunings, A. M. y Gabriel, D. W., 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* **4**: 141–157.

2. Chisholm, S. T.; Coaker, G.; Day, B. y Staskawicz, B. J., 2006. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 4: 803–814.

3. Martínez–Godoy, M. A.; Mauri, N.; Juárez, J.; Marques, M. C.; Santiago, J.; Forment, J. y Gadea, J., 2008. A genome–wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC.*

Genomics **9**: 318.

4. Thirkettle–Watts, D.; McCabe, T. C.; Clifton, R., Moore, C.; Finnegan, P. M.; Day, D. A. y Whelan, J., 2003. Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean. *Plant Physiol* **133**, 3: 1158–1169.

5. Dojcinovic, D.; Krosting, J.; Harris, A. J.; Wagner, D. J. y Rhoads, D. M., 2005. Identification of a region of the Arabidopsis AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression. *Plant Mol. Biol.* **58**, 2: 159–175.

6. Ho, L. H.; Giraud, E.; Uggalla, V.; Lister, R.; Clifton, R.; Glen, A.; Thirkettle–Watts, D.; Van, A. O. y Whelan, J., 2008. Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide–insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol.* **143**, 3: 1519–1533.

7. Polidoros, A. N.; Mylona, P. V.; Pasentsis, K.; Scandalios, J. G. y Tsaftaris, A. S., 2005. The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox. Rep.* **10**, 2: 71–78.

Summary

*Characterization of plant genes implicated in the response to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri**

The bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) is responsible for the disease called citrus canker, that affects all citrus species. In Argentina, citrus canker (declared endemic) causes great losses in production and commercialization, constituting one of the most significant troubles for citrus industry. To date, because no citrus cultivar presents tolerance or resistance to Xac, it has been impossible to apply classical plant breeding looking for canker resistant citrus. In this work, different plant–pathogen interactions that include Xac, orange (*Citrus sinensis* cv. Valencia Late) or both, were carried out trying to contribute to the knowledge of the molecular basis responsible for the different kinds of plant responses. The molecular approach used consists in analyzing plant expression pattern changes to detect genes that participate or are responsible for the plant response. The analysis of orange against Xac and a Xac mutant in Type Three Secretion System (TTSS) allowed us to detect genes which expressions were exclusively modified by TTSS or its effectors and, therefore, could be responsible for bacterial disease generation in citrus. The challenge of orange with *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) caused hypersensitive response (HR) symptoms, so transcriptome modifications permitted the detection of orange genes involved in HR. Moreover, tobacco exposition to Xac also showed HR, allowing us to identify non–host plant genes modifications against Xac during HR. The novel genes reported could be used in future plans of molecular breeding for citrus canker resistance.

PREMIO PROFESOR “DR. JORGE BRAULIO MULLOR”

Profesor “Dr. Jorge Braulio Mullor” a la mejor Tesis Doctoral en Bioquímica

Instituido por Resolución del CD 695 del 7 de noviembre de 2007, en memoria del Dr. Mullor quien en su larga y destacada permanencia en la vida universitaria hiciera su mayor aporte en el Departamento de Ciencias Biológicas de esta Facultad.

Comenzó su vinculación con la Universidad en el año 1922, desarrollando sus actividades como Profesor en diversas cátedras.

Fue autor de numerosas obras y trabajos científicos que se difundieron en el país y en el exterior, con temas cuyos contenidos hoy tienen plena vigencia.

Integró la Comisión redactora de la Farmacopea Nacional Argentina; fue Director

del Departamento de Bromatología y Nutrición de la FIQ; inicia las actuaciones de la carrera de Doctorado en Química, siendo esto el nacimiento de la carrera de Bioquímica en Santa Fe; fue designado Profesor Emérito de la UNL, en reconocimiento de su vasta trayectoria en la vida Universitaria; fue Rector de la UNL y Ciudadano Ilustre de la ciudad de Santa Fe; entre otras participaciones.

Jurado interviniente en la evaluación de los trabajos presentados al Premio del año 2011:

- Dra. Beatriz Leonor Caputto UNC–CI–QUIBIC–CONICET
- Dr. Néstor José Carrillo UNR–IBR–CONICET
- Dr. Armando J. Parodi Fundación Leloir–CONICET

Estudio comparativo de proteínas involucradas en el balance de óxido–reducción en diferentes organismos. Caracterización del sistema de tiorredoxina en protozoos y algas eucariotas

Autor: Dr. Arias, Diego Gustavo

Director: Dr. Sergio Adrián Guerrero.

Codirector: Dr. Alberto Álvaro Iglesias.

Lugar de realización: Laboratorio de Bioquímica Microbiana y Laboratorio de Enzimología Molecular – FBCB –UNL.

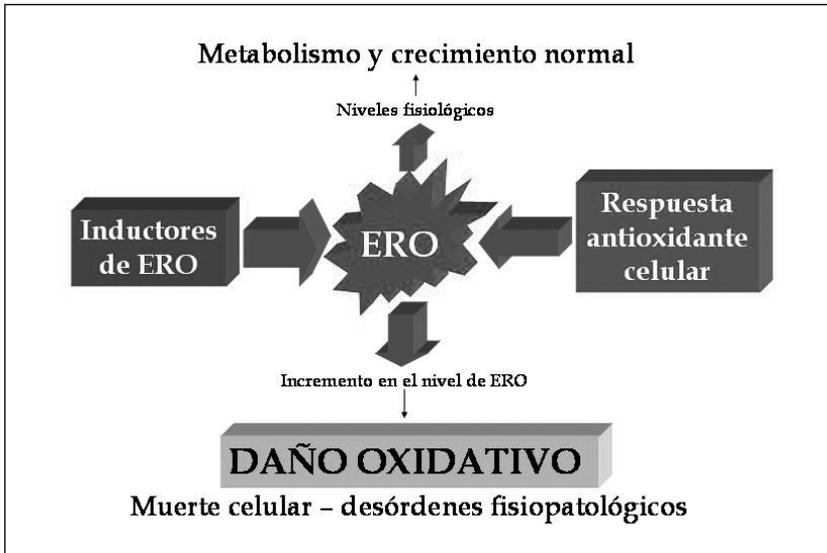
Fecha de la defensa: 20 de marzo de 2009.

Resumen

Todas las formas de vida han desarrollado sistemas enzimáticos eficientes para resistir el daño oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno (ERO). El estado redox celular es un mediador crucial de diferentes procesos metabólicos, actuando en la señalización y regulación de diversos procesos metabólicos y celulares. Diferentes procesos biológicos tienen al sistema dependiente de tiorredoxina (TRX) desempeñando un rol significativo (respuesta al

estrés oxidativo, regulación de actividades enzimáticas, reparación del daño oxidativo en proteínas, síntesis de ADN, transcripción génica, crecimiento celular y apoptosis) (Figura 1) (1).

Figura 1: Homeostasis redox y estrés oxidativo.



La homeostasis del equilibrio redox intracelular es dependiente en muchos organismos de tioles de bajo peso molecular que, como por ejemplo el glutatión, poseen una amplia distribución en todos los reinos biológicos. Éste provee equivalentes de reducción (provenientes del NADPH) a la célula en condiciones de estrés oxidativo, siendo oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), que es regenerado por la enzima glutatión reductasa (GR) a expensas del NADPH (2).

Dentro de los mecanismos de reparación del daño oxidativo en proteínas se encuentran aquellos dependientes de las metionina sulfóxido reductasas (MSR), enzimas encargadas de revertir la oxidación de metioninas en proteínas. Estas enzimas reciben el poder reductor del NADPH, a través del sistema TRX (entre otros) (3).

En esta tesis se presenta la caracterización funcional de distintos componentes del metabolismo redox de organismos unicelulares como: *Entamoeba histolytica* (un parásito anaerobio), *Phaeodactylum tricornutum* (una diatomea) y *Trypanosoma cruzi* (un parásito aerobio).

El parásito intestinal *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amebiosis, una enfermedad de importancia en salud pública en países en vías de desarrollo. Normalmente, el parásito vive y se desarrolla en el intestino grueso bajo condiciones anaeróbicas o microaerófilas. Sin embargo, *E. histolytica* es capaz de atravesar la mucosa intestinal e infectar el hígado. Durante la fase extraintestinal, *E. histolytica* es expuesto a un incremento en la presión de oxígeno y, consecuentemente, a altas

concentraciones de especies reactivas del oxígeno. Estudios previos han demostrado que el parásito puede tolerar hasta un 5% de oxígeno gaseoso (4,5). El sistema TRX se ha caracterizado en diferentes tipos de parásitos. En el caso de *E. histolytica*, se propuso que el balance redox intracelular era mantenido principalmente por cisteína, una peroxirredoxina (*Ehp29* o *Eh2CysPrx*) y una proteína de 34 kDa caracterizada como una NADPH:flavina oxidoreductasa. Se pudo establecer además que *E. histolytica* posee insignificantes cantidades de glutatión y de que carece de las enzimas asociadas a él, siendo la cisteína el tiol intracelular principal (6).

En *E. histolytica* se estudió el sistema TRX, formado por una TRXR de bajo peso molecular (*EhTRXR*) y cuatro isoformas de TRX (*EhTRX6*, *EhTRX8*, *EhTRX41*, *EhTRX111*). Estos sistemas enzimáticos exhibieron capacidad para operar junto con la *Eh2CysPrx* en la reducción dependiente de NADPH, de hidroperóxidos, así como en la reducción de disulfuros de bajo peso molecular [tales como cistina, tripanotión disulfuro (TS_2) y GSSG] y de S-nitrosotioles (tales como GSNO y CysNO). La enzima *EhTRXR* presentó la facultad de emplear NADH como sustrato reductor con afinidades comparables al NADPH. Esta gran versatilidad del sistema TRX de *E. histolytica* se debe, en parte, a sus potenciales de reducción: de -292 mV para *EhTRXR* y de -283 mV (promedio) para las *EhTRX*, lo que favorece la reducción de una amplia variedad de sustratos. Los componentes de este sistema localizaron a nivel celular sobre la periferia de la membrana plasmática en células del parásito. Los resultados obtenidos son un aporte al conocimiento de

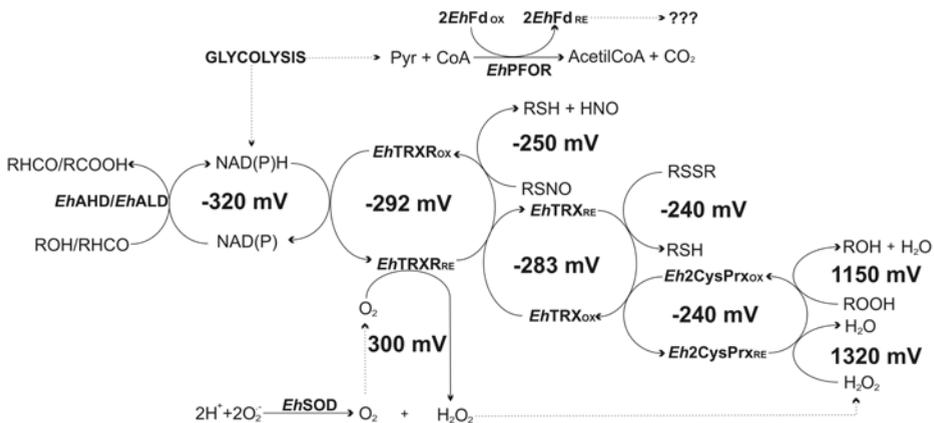
las reacciones que, en *E. histolytica*, regulan el flujo de equivalentes de reducción entre distintos metabolitos, metabolismo crítico para la supervivencia y virulencia del protozoo. Este parásito, asociado a la pobreza, la ignorancia, malnutrición y/o malas condiciones sanitarias, es el agente etiológico de uno de los principales problemas de salud pública mundial. El incremento del número de casos de cepas resistentes a drogas convencionales para el tratamiento de la amebiasis, motivan nuevos estudios integrales para la caracterización de vías metabólicas (como el metabolismo redox) que faciliten el diseño racional de nuevos agentes terapéuticos. Los resultados obtenidos *in vitro* demostraron que *EhTRXR* es un potencial blanco molecular para el diseño racional de nuevas drogas antiparasitarias. Esta idea se basa en el funcionamiento versátil que presenta el sistema TRX, el cual puede jugar un rol relevante en la defensa del parásito contra las especies reactivas del oxígeno durante la fase extraintestinal de la infección amebiana. Se observó que, tanto el azul de metileno (MB) como el aceite esencial de tomillo presentaron una alta capacidad de inhibir la actividad disulfuro reductasa de *EhTRXR*, estimulando la oxidación-catalizada de NADPH. Los resultados aquí presentados muestran la potencialidad de estos compuestos como modelos para la generación de nuevos agentes antiparasitarios, sentando las bases para la formación de nuevas líneas de investigación en el tema.

Nuestros resultados amplían el conocimiento sobre las reacciones que, en *E. histolytica*, dirigen el flujo de equivalentes de reducción (Figura 2). Este mecanismo metabólico sería crítico para la supervivencia y

virulencia del parásito, no solo por la participación en la detoxificación de hidroperóxidos, sino también por el mantenimiento de las formas reducidas de otros compuestos. Este funcionamiento versátil soporta la idea de que el sistema TRX juega un rol relevante en la defensa del parásito contra las

especies reactivas del oxígeno durante la fase extraintestinal de la infección. En adición, estos resultados posibilitan hacer una correcta asignación estructura-función de los datos obtenidos del proyecto genoma de este parásito.

Figura 2. Representación esquemática del escenario redox dependiente del sistema tiorredoxina en *Entamoeba histolytica* asociado a otros sistemas previamente caracterizados. Se presenta dentro de los ciclos los respectivos valores de potencial de reducción estándar. EhAHD: alcohol deshidrogenasa; EhALD: aldehído deshidrogenasa; EhFd: ferredoxina; EhPFOR: piruvato-ferredoxina óxido-reductasa; EhSOD: superóxido dismutasa; EhTRXR: tiorredoxina reductasa; EhTRX: tiorredoxina; Eh2CysPrx: 2Cys peroxirredoxina; RSH: tiol de baja masa molecular; RSSR: disulfuro de baja masa molecular; RSNO: S-nitrosotiol; ROOH; hidroperóxido orgánico; RHCO: aldehído; ROH: alcohol; RCOOH: ácido orgánico.



Las diatomeas son componentes marinos destacados del fitoplancton con particular importancia biogeoquímica en el reciclado de minerales, especialmente el silicio, y del carbono (7). Estos organismos son algas pardas, unicelulares, que pueden desarrollarse en forma fotosintética, heterotrófica o mixta y que se estima contribuyen hasta en un 25% de la producción primaria total sobre la superficie terrestre. Pese a la relevancia evolutiva, ecológica y productiva,

los estudios sobre la biología de las diatomeas, a nivel molecular, están relativamente poco desarrollados. El modelo experimental dentro de las diatomeas es la especie *Phaeodactylum tricoratum*, la cual tiene un genoma relativamente pequeño, un tiempo de generación corto y es factible de ser transformada genéticamente (7,8). Estos microorganismos están entonces evolutivamente muy relacionados con protozoos y es de importancia realizar estudios com-

parativos de las rutas metabólicas y de las propiedades de las proteínas involucradas entre los mismos. En este sentido, el metabolismo de óxido-reducción (redox) es uno particularmente importante para su caracterización entre estos organismos ubicados en un enclave evolutivo.

En extractos crudos de *Phaeodactylum tricornutum*, se detectaron actividades enzimáticas como la de GR, dihidrolipoamida deshidrogenasa y TRXR (utilizando con DTNB como sustrato disulfuro). A partir de estos resultados, se purificó a homogeneidad una enzima con actividad glutatión reductasa a partir de extractos celulares del alga y se la caracterizó funcionalmente. La enzima demostró especificidad por NADPH como sustrato reductor y GSSG como sustrato disulfuro. La reducción de GSSG dependiente de NADPH siguió un mecanismo de reacción del tipo "ping-pong" híbrido. Es de remarcar que la GR purificada presentó la capacidad de reducir GSNO sin presentar inactivación por este compuesto, a diferencia de otras GR de otras fuentes. Se determinó que la GR purificada es un homodímero de 118 kDa que posee flavina como grupo prostético. Los resultados obtenidos apoyan la existencia de sistemas redox dependientes de TRX y GSH en esta diatomea. Estos resultados aportan más información a la incipiente genómica y proteómica de *P. tricornutum*.

La metionina (Met) es un aminoácido susceptible de ser oxidado a metionina sulfóxido (MetSO). La reducción de MetSO a Met es catalizada por la enzima metionina sulfóxido reductasa (MSR), una enzima presente en casi todos los seres vivos (9). Esta enzima participa en la reparación del daño oxidativo en proteínas y péptidos. Es invo-

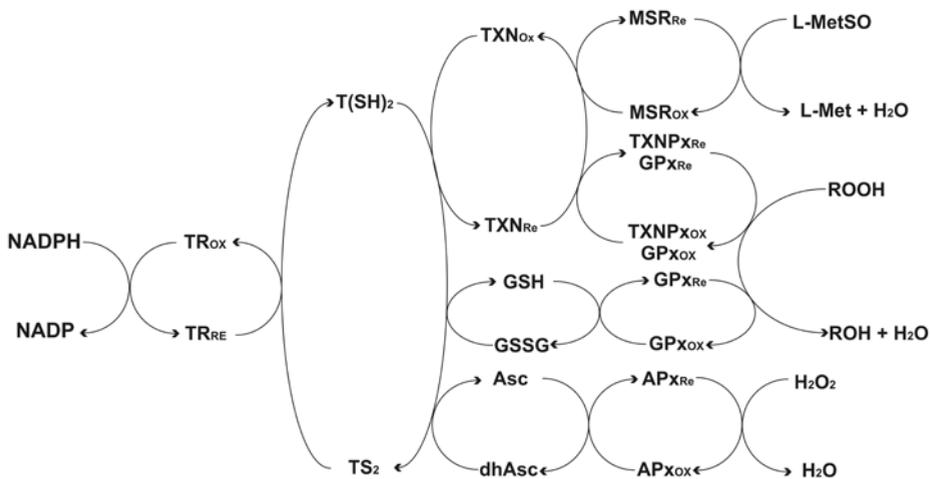
lucrada en la resistencia al estrés biótico y abiótico en animales y plantas, además de actuar como un factor de virulencia en algunas bacterias patógenas (3). En tripanosomátidos, el estudio de los sistemas antioxidantes ha sido ampliamente focalizado en el rol central que posee el tripanotión en estos organismos, no existiendo información sobre los mecanismos de reparación de proteínas oxidadas ni de la relevancia de éstos para la supervivencia de estos patógenos en los diferentes estadios de su ciclo de vida (10,11).

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (10) y de los tres organismos estudiados en esta tesis, es el que presenta mayor cantidad de trabajos de caracterización del metabolismo de detoxificación de hidroperóxidos. En esta tesis se evaluaron rutas metabólicas relacionadas con la habilidad del microorganismo para afrontar condiciones ambientales oxidantes. Específicamente aquellas relacionadas con la reparación de proteínas oxidadas. El interés se centró en dos genes alelos: *tcmsr10* y *tcmsr180*, que codifican para sendas metionina sulfóxido reductasas del tipo A. Ambas enzimas recombinantes fueron activas en la reducción de metionina sulfóxido, utilizando proteínas tioles de *T. cruzi* (TXNI y TRX) como cosustratos reductores. Por electroforesis en geles de poliacrilamida (en condiciones desnaturantes y no reductoras) se observó que ambas enzimas presentan diferencias en sus movilidades electroforéticas dependiendo del estado redox en que se encuentran. Además, para un estado redox determinado, se visualizaron distintos perfiles electroforéticos en condiciones nativas para cada enzima. Esta diferencia fue atribuida a desigualda-

des en las cargas superficiales de ambas proteínas, como se evidenció a partir de estudios *in silico*. Mediante modelado molecular se mostró también que los residuos que arreglan el sitio de unión al sulfóxido se distribuyen en forma idéntica en ambas isoformas, pero con diferencias en el entorno superficial adyacente al mismo. Estas enzimas exhibieron una cinética del tipo doble sustitución, coherente con un mecanismo de reacción de intercambio tiol–disulfuro. Mediante titulación redox, utilizando el par GSSG/GSH, se determinaron los potenciales de reducción estándares para estas enzimas en -178 mV (valor promedio). Se realizaron ensayos de inmunodetección de estas enzimas (o de al menos una de ellas) en extractos crudos de epimastigotes y

amastigotes, formas replicativas del parásito. Se utilizó en estos ensayos un suero policlonal específico anti-TcMSR10 obtenido en conejo. Estos anticuerpos también fueron utilizados en ensayos de inmunocalización, que evidenciaron la ocurrencia citoplasmática de estas proteínas (demostrado anteriormente para este tipo de enzimas en otros organismos). Estos resultados constituyen un aporte más a la caracterización de nuevos componentes del escenario redox en *T. cruzi* (Figura 3), siendo estas enzimas nuevos blancos moleculares que podrían ser de utilidad para el diseño y desarrollo de fármacos específicos que actúen alterando la viabilidad y supervivencia de este patógeno humano.

Figura 3. Representación esquemática del metabolismo dependiente de trypanotión. TR: trypanotión reductasa; T(SH)₂: trypanotión reducido; TS₂: trypanotión oxidado; TXN: tryparredoxina; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; Asc: ascorbato; dhAsc: dehidroascorbato; MSR: metionina sulfóxido reductasa; TXNPx: tryparredoxina peroxidasa; GPx: glutatión peroxidasa; APx: ascorbato peroxidasa; L–MetSO: L–metionina sulfóxido; L–Met: L–metionina; ROOH: peróxido orgánico/peróxido de hidrógeno; ROH; alcohol/agua.



Bibliografía

1. Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M. E., Hudemann, C., and Lillig, C. H. 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, *Biochem Soc Trans* **33**, 1375–1377.
2. Muller, S., Liebau, E., Walter, R. D., and Krauth–Siegel, R. L. 2003. Thiol–based redox metabolism of protozoan parasites, *Trends Parasitol* **19**, 320–328.
3. Boschi–Muller, S., Gand, A., and Branlant, G. 2008. The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities, *Arch Biochem Biophys* **474**, 266–273.
4. Ramos–Martinez, E., Olivos–Garcia, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Sanchez, E. C., Tello, E., El–Hafidi, M., Saralegui, A., Pineda, E., Delgado, J., Montfort, I., and Perez–Tamayo, R. 2008. *Entamoeba histolytica*: Oxygen resistance and virulence, *Int J Parasitol* **39**, 693–702.
5. Choi, M. H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B. E., and Reed, S. L. 2005. An unusual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack, *Mol Biochem Parasitol* **143**, 80–89.
6. Bhattacharya, A., Satish, S., Bagchi, A., and Bhattacharya, S. 2000. The genome of *Entamoeba histolytica*, *Int J Parasitol* **30**, 401–410.
7. Round, F. E., and Crawford, R. M. 1990. *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge University Press, UK.
8. Maheswari, U., Montsant, A., Goll, J., Krishnasamy, S., Rajyashri, K. R., Patell, V. M., and Bowler, C. 2005. The Diatom EST Database, *Nucleic Acids Res* **33**, D344–347.
9. Moskovitz, J. 2005. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging–associated diseases, *Biochim Biophys Acta* **1703**, 213–219.
10. Irigoien, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohe, L., and Radi, R. 2008. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification, *Free Radic Biol Med* **45** 733–42.
11. Krauth–Siegel, R. L., and Comini, M. A. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione–based thiol metabolism, *Biochim Biophys Acta* **1780** 1236–48.

Comparative study of proteins involved in redox balance in different organisms. Characterization of thioredoxin system from eukaryotic algae and protozoa

Summary

All the living forms developed efficient enzymatic systems to resist damage generated by oxidizing reactive oxygen species (ROS). The redox cellular status is a crucial mediator for different metabolic processes acting in signaling and regulation of several metabolic and cellular processes.

This thesis work deals on the functional characterization of several thiol depending redox systems from unicellular organisms (protists): *Entamoeba histolytica* (an anaerobic parasite), *Phaeodactylum tricornutum* (a diatom) and *Trypanosoma cruzi* (an aerobic parasite).

In *E. histolytica* we revealed the occurrence of the TRX system. The latter includes a low molecular weight TRXR (*Eh*TRXR) and four isoforms of TRX (*Eh*TRX6, *Eh*TRX8, *Eh*TRX41, and *Eh*TRX111). These results contribute to the knowledge of the reactions that, in *E. histolytica*, regulate the flow of reduction equivalents between different metabolites; which constitutes a critical metabolic mechanism for the survival and virulence of the parasite.

In *Phaeodactylum tricornutum*, enzymatic activities of GR, dihydrolipoamide dehydrogenase and TRXR were detected. An enzyme with GR activity from the diatom cellular extracts was purified to homogeneity and functionally characterized. The enzyme exhibited specificity toward NADPH and GSSG as main substrates. Unlike to many GR from other sources, the purified *P. tricornutum* GR presented capacity to catalyze reduction of GSNO. Our results strongly support the existence of TRX and GSH dependent redox systems in this diatom. These results add information to the incipient genomic and proteomic of *P. tricornutum*.

In the present thesis work, several metabolic routes were evaluated in relation with the ability of *Trypanosoma cruzi* to cope with oxidative environmental conditions. Specifically, mechanisms involved in the reparation of oxidized protein were elucidated. We centered our interest on two isoforms of methionine sulfoxide reductase A. Both enzymes were active in the reduction of methionine sulfoxide, using thiol proteins of *T. cruzi* as reducing co-substrates. These results constitute a contribution to the description of the metabolic redox scenario in *T. cruzi*. Additionally, the results elucidated new components of the antioxidant metabolism in this organism, after pointing out the occurrence of enzymatic systems involved in repairing oxidized macromolecules.