

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**Caracterización del metabolismo antioxidante y de
reparación del daño oxidativo en *Leptospira* spp. Estudio
de la relevancia de la homeostasis redox en la viabilidad
de las bacterias**

Bioq. Natalia Sasoni

Director: Dr. Diego Gustavo Arias

Co-director: Dr. Sergio Adrián Guerrero

IAL - UNL- CONICET

2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	viii
AGRADECIMIENTOS	x
PUBLICACIONES Y REUNIONES CIENTÍFICAS	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Evolución de la vida: “desde una atmósfera anoxigénica a una atmósfera oxigénica”	1
1.2. Especies reactivas y estrés oxidativo.....	1
1.2.1. Conceptos.....	1
1.2.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs).....	3
1.2.3. Especies reactivas de nitrógeno (ERNs).....	4
1.2.4. Especies reactivas de halógenos (ERHs).....	6
1.2.5. Especies reactivas de azufre (ERSs).....	6
1.3. Sistemas antioxidantes	9
1.3.1. Sistemas de reducción de enlaces tiol-disulfuro.....	10
1.3.1.1. Sistema Tiorredoxina.....	10
1.3.1.1. A. Tiorredoxinas.....	10
1.3.1.1. B. Tiorredoxina reductasa	12
1.3.1.1. C. Sistema dependiente de glutatión.....	14
1.3.1.1. C.1. Glutatión	14
1.3.1.1. C.2. Glutamato cisteína ligasa.....	17
1.3.1.1. C.3. Glutarredoxinas	19
1.3.1.1. C.3.i. Funciones de los centros [Fe-S].....	21
1.3.1.1. C.3.ii. Sistemas de ensamblaje de los centros [Fe-S]	22
1.3.1.1. C.3.iii. Rol de las Grxs en el metabolismo del Fe y su relación con los centros [Fe-S].....	23
1.3.1.1. D. Los sistemas antioxidantes como mediadores en modificaciones post-traduccionales de proteínas.	26
1.3.1.1. D.1. S-tiolación	26
1.3.1.1. D.2. S-nitrosilación	27
1.3.2. Sistema de eliminación de EROs	28

1.3.2.1. Peroxirredoxinas	28
1.3.2.2. Catalasa	30
1.3.3. Sistemas de reparación.....	32
1.3.3.1. Metionina sulfóxido reductasa.....	32
1.4. Leptospiras.....	35
1.4.1. Características generales.....	35
1.4.2. Clasificación y nomenclatura	37
1.4.3. Organización genómica	39
1.4.4. Fisiología y metabolismo	39
1.4.5. Epidemiología y patogénesis	40
1.4.6. Tratamiento.....	43
1.4.7. Metabolismo redox en leptospiras	44
1.5. Incumbencias del trabajo de Tesis	46
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
3.1. Materiales y reactivos químicos.....	50
3.2. Cepas microbianas, procedimientos de cultivos, preservación de los microorganismos y plásmidos utilizados.....	50
3.2.1. Cepas de <i>Leptospira</i> spp y procedimientos de cultivo.....	50
3.2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> y procedimientos de cultivo	51
3.2.3. Cepas de levaduras y procedimientos de cultivo.....	52
3.3. Vectores plasmídicos utilizados.....	54
3.4. Métodos de Biología Molecular	54
3.4.1. Extracción de ADN genómico de <i>Leptospira</i> spp	55
3.4.2. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	55
3.4.3. Extracción de ARN total de <i>Leptospira</i> spp.....	55
3.4.4. Transcripción inversa del ARNm.....	56
3.4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa	56
3.4.6. Electroforesis en gel de agarosa	58
3.4.7. Purificación de ADN en gel de agarosa.....	58
3.4.8. Precipitación de ADN	58
3.4.9. Secuenciación de ADN.....	58
3.4.10. Digestiones enzimáticas del ADN.....	59
3.4.11. Ligación de los fragmentos de ADN a vectores plasmídicos	59

3.4.12. Transformación de <i>E. coli</i> por el método de CaCl ₂	59
3.4.13. Transformación de las levaduras.....	60
3.5. Métodos Bioquímicos	60
3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	60
3.5.2. Preparación de antisueros.	61
3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección	61
3.5.4. Concentración de soluciones de proteínas	62
3.5.5. Cuantificación de proteínas.....	62
3.6. Expresión y Purificación de proteínas recombinantes.....	63
3.6.1. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes	63
3.6.2. Disrupción celular y preparación de extractos crudos	63
3.6.3. Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)	63
3.6.4. Cromatografía de afinidad por unión a amilosa	64
3.6.5. Digestión proteolítica de las proteínas de fusión	64
3.7. Métodos analíticos	65
3.7.1. Cromatografía de filtración por gel.....	65
3.7.2. Determinación de flavinas.....	65
3.7.3. Cuantificación de tioles totales	66
3.7.4. Cuantificación de ácido sulfénico en residuos de Cys presentes en proteínas.....	66
3.7.5. Determinación de cofactores metálicos presentes en proteínas.....	66
3.7.6. Determinación del potencial de reducción estándar de TRX	66
3.7.7. Espectroscopia de absorbancia UV-visible de las proteínas recombinantes puras	67
3.7.8. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de las proteínas recombinantes puras	67
3.7.9. Ensayos de auto-glutationilación de las glutarredoxinas recombinantes	67
3.7.10. Ensayos de nitrosilación de las redoxinas recombinantes	68
3.7.11. Determinación del contenido de GSH acomplejado al centro de Fe- S	68
3.8. Ensayos enzimáticos.....	68
3.8.1. Preparación de extractos proteicos a partir de cultivos de leptospiras para realizar determinaciones enzimáticas	69

3.8.2. Determinación de la capacidad de reducción de DTNB.	69
3.8.3. Estudios de inhibición de actividad DTNB reductasa.....	70
3.8.4. Determinación de la actividad disulfuro reductasa del sistema Trx.....	70
3.8.5. Ensayo de reducción de S-nitrosotioles	71
3.8.6. Ensayo de actividad diaforasa del sistema Trx.....	71
3.8.7. Reducción de hidroperóxidos por el sistema Trx.....	71
3.8.8. Determinación de actividad catalasa	72
3.8.9. Determinación de actividad peroxidasa de la <i>Lincatalasa</i>	72
3.8.10. Ensayo de inactivación de la catalasa por oxidantes	72
3.8.11. Evaluación de la actividad glutamato cisteína ligasa	72
3.8.12. Ensayo de reducción de la insulina bovina	73
3.8.13. Ensayo de reducción de hidroxietildisulfuro mediada Grxs.....	73
3.8.14. Determinación de actividad dehidroascórbico reductasa de Grxs	74
3.8.15. Determinación de la actividad MetSO reductasa.	74
3.8.16. Reducción de <i>LinMsrBA35N-SO</i> por 2-nitro-5-tio-benzoato como reductor	75
3.8.17. Determinación de actividad glutatión reductasa	75
3.8.18. Determinación de actividad glutatión-S-transferasa	75
3.8.19. Medida de actividad catalasa en gel	76
3.9. Ensayos sobre cultivos de <i>E. coli</i>	76
3.9.1. Ensayo de tolerancia al estrés.....	76
3.9.2. Titulación de tioles totales	76
3.10. Ensayos sobre cultivos de <i>S. cerevisiae</i>	77
3.10.1. Evaluación de la funcionalidad de las glutarredoxinas monotiólicas..	77
3.10.2. Medida de la respiración celular	78
3.10.3. Evaluación de la funcionalidad de las Msr	78
3.11. Ensayos sobre cultivos de <i>Leptospira</i> spp.....	78
3.11.1. Evaluación de la sensibilidad a drogas.....	78
3.11.2. Tolerancia al estrés oxidativo y detoxificación de peróxidos <i>in vivo</i>	79
3.11.3. Modulación de la expresión de proteínas de <i>Leptospira</i> spp. en situación de estrés oxidativo y/o nitrosativo	79
3.11.4. Permeabilización de células de <i>L. interrogans</i> con digitonina	80
3.11.5. Identificación de proteínas sustratos de <i>LinTrx</i> a partir de extractos celulares de <i>L. interrogans</i> mediante el empleo de una cromatografía	

covalente	80
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO 1: Sistemas enzimáticos antioxidantes en <i>Leptospira</i> spp	83
4.1.1. Análisis de entidades enzimáticas con funciones antioxidantes en <i>Leptospira</i> spp	83
4.1.2. Obtención en forma recombinante de <i>Lincatalasa</i>	84
4.1.3. Estudio de las propiedades cinéticas y estructurales de la <i>Lincatalasa</i> ..	85
4.1.3.1. Determinación de actividad catalasa y peroxidasa de la enzima recombinante	85
4.1.3.2. Evaluación del efecto de ERNs sobre <i>Lincatalasa</i>	93
4.1.4. Determinación de cambios en el nivel de <i>Lincatalasa</i> sobre extractos celulares.....	95
4.1.5. Discusión.....	97
CAPÍTULO 2: Caracterización del sistema tiorredoxina en <i>Leptospira</i> spp	102
4.2.1. Obtención en forma recombinante de <i>LinTrx</i> , <i>LinTrxR</i> , <i>LbiTrxR1</i> y <i>LbiTrxR2</i>	102
4.2.2. Características físicas y estructurales de las <i>LinTrx</i> , <i>LinTrxR</i> , <i>LbiTrxR1</i> y <i>LbiTrxR2</i>	105
4.2.3. Estudio de las propiedades cinéticas del sistema tiorredoxina en <i>Leptospiras</i> spp	108
4.2.3.1. Evaluación de la actividad TrxR de las proteínas recombinantes.....	108
4.2.3.2. Estudios de inhibición de la actividad disulfuro reductasa de <i>LinTrxR</i> y <i>LbiTrxR1</i>	114
4.2.3.3. Capacidad de reducción de disulfuros de baja masa molecular y S-nitrosotioles por la <i>LinTrx</i>	116
4.2.3.4. Determinación del potencial redox de <i>LinTrx</i>	117
4.2.3.5. Evaluación de la capacidad antioxidante de las proteínas recombinantes sobre células de <i>E. coli</i>	119
4.2.4. Evaluación de modificaciones post-traduccionales de <i>LinTrx</i>	120
4.2.4.1. Glutacionilación de <i>LinTrx</i>	121
4.2.4.1. A. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de <i>LinTrx</i> según el estado redox.....	121
4.2.4.1. B. Capacidad de auto-glutacionilarse de <i>LinTrx</i>	122
4.2.4.2. S-nitrosilación de <i>LinTrx</i>	123

4.2.5. Evaluación de las propiedades antioxidantes sobre extractos celulares de especies de <i>Leptospira</i> spp	126
4.2.5.1. Determinación de la capacidad de detoxificar peróxidos y de la actividad antioxidante de células de <i>Leptospiras</i> spp	126
4.2.5.2. Sobreoxidación de <i>LinAhpC</i> <i>in vivo</i>	132
4.2.5.3. Efecto inhibitorio de diferentes compuestos en crecimiento celular de <i>L. interrogans</i>	134
4.2.6. Identificación de interactores de <i>LinTrx</i>	135
4.2.7. Discusión.....	138
CAPÍTULO 3: Caracterización funcional de una glutamato cisteína ligasa de <i>L. interrogans</i>	143
4.3.1. Identificación, clonado y expresión del gen codificante para la glutamato cisteína ligasa de <i>L. interrogans</i>	143
4.3.2. Determinación de la funcionalidad de la <i>LinGCL</i>	144
4.3.2.1. Evaluación de la actividad enzimática y promiscuidad por sustratos de la <i>LinGCL</i>	144
4.3.2.2. Efecto inhibitorio de diferentes compuestos sobre la <i>LinGCL</i>	147
4.3.3. Determinación de la funcionalidad de la <i>LinGCL</i> en células de <i>E.coli</i>	152
4.3.4. Discusión.....	153
CAPÍTULO 4: Sistema de reparación del daño oxidativo en <i>L. interrogans</i>	159
4.4.1. Clonado y expresión de los genes codificantes para <i>LinMsrA1</i> , <i>LinMsrA2</i> y <i>LinMsrB</i>	159
4.4.2. Localización celular de <i>MsrB</i> en <i>L. interrogans</i>	163
4.4.3. Caracterización básica de la estructura y función de las <i>Msrs</i>	164
4.4.4. Caracterización cinética de <i>LinMsrBΔ35</i> y <i>LinMsrA2</i>	170
4.4.5. Reversión de la inactivación de la <i>Lincatalasa</i> causada por HClO	174
4.4.6. Ensayos de complementación en levaduras	175
4.4.6.1. Evaluación de la funcionalidad <i>in vivo</i> de las <i>Msrs</i>	175
4.4.6.2. Evaluación de la sensibilidad de las levaduras recombinantes en condiciones de estrés	177
4.4.7. Discusión.....	180
CAPÍTULO 5: Estudios de funcionalidad de una glutarredoxina ditiólica y una monotiólica de <i>L.interrogans</i>	184

4.5.1. Obtención recombinante de una glutarredoxina ditiólica y una glutarredoxina monotiólica de <i>L. interrogans</i>	184
4.5.2. Características relacionadas con la estructura de ambas Grxs	190
4.5.2.1. Determinación de la estructura nativa de las Grxs y coordinación de centros Fe-S por la holoproteína	190
4.5.2.2. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de las Grx recombinantes	192
4.5.2.3. Ensayos de auto-glutationilación de las Grx recombinantes.....	193
4.5.2.4. Ensayo de S-nitrosilación de la <i>Lin1CGrx</i>	194
4.5.3. Determinación de la funcionalidad de las Grx <i>in vitro</i>	195
4.5.3.1. Ensayo de reducción de insulina	195
4.5.3.2. Ensayo de reducción de disulfuros mixtos no proteicos.....	197
4.5.3.3. Capacidad de <i>Lin2CGrx</i> de reducir proteínas involucradas en el metabolismo redox	199
4.5.4. Determinación de la funcionalidad de la <i>Lin1CGrx in vivo</i>	201
5. CONCLUSIONES	213
6. BIBLIOGRAFÍA.....	222

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1CGrx	glutarredoxina monotiólica
2CGrx	glutarredoxina ditiólica
2 β -ME-SSG	2- β -mercaptoetanol
γ -GC	gamma-glutamil cisteína
γ -GCSNO	gamma-glutamil nitrosocisteína
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
AhpC	peroxirredoxina de 2-Cys típica
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CAT	catalasa
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CTE	cadena transportadora de electrones
Cys	cisteína
CySNO	S-nitroso-cisteína
dNTP	desoxinucleótidos
Di-E-GSSG	dieosina glutatión disulfuro
DO	densidad óptica
DHA	Ácido dehidroascórbico
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
E _h	potencial de reducción estándar
ER	especies reactivas
EROs	especies reactivas del oxígeno
ERNs	especies reactivas del nitrógeno
ERHs	especies reactivas de halógenos
FAD	flavín adenín dinucleótido
FMN	flavín mononucleótido
FNR	ferredoxina NADP ⁺ reductasa
<i>freeMsr</i>	metionina sulfóxido reductasa de tipo libre
GCL	glutamato cisteína ligasa
Glc	glucosa
Glu	glutámico
Grx	glutaredoxina
GOD	glucosa oxidasa
GPx	glutatión peroxidasa
GSH	glutatión
GSNO	S-nitrosoglutatión
GSSG	glutatión disulfuro
GST	glutatión-S-transferasa
HED	<i>2-hydroxyethyl disulfide</i>
HClO	ácido hipocloroso
IAA	iodoacetamida
IC ₅₀	concentración inhibitoria al 50%
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado

IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosido
K_{av}	coeficiente de distribución
k_{cat}	constante catalítica
K_i	constante de inhibición
K_m	constante de Michaelis-Menten
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LiOAc	acetato de litio
Lp32	lipoproteína de membrana 32
MB	azul de metileno
MBP	proteína de unión a maltosa
MBQ	2-metil-benzoquinona
Met(R)SO	metionina R sulfóxido
MetSO	metionina sulfóxido (racémica)
Met(S)SO	metionina S sulfóxido
MM	masa molecular
MsrA	metionina sulfóxido reductasa de tipo A
MsrB	metionina sulfóxido reductasa de tipo B
MV	metil viologeno
NAD ⁺	nicotiamida-adenina dinucleótido
NADH	nicotiamida-adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT	Cloruro de <i>nitroblue tetrazolium</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	marco abierto de lectura
Ori	origen de replicación
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Pi	fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato
Prx	Peroxiirredoxina
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNO	s-nitrosotioles
SOD	superóxido dismutasa
TAE	tampón Tris acetato EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	ácido tricloroacético
TLC	cromatografía en capa delgada
T_m	temperatura de <i>melting</i>
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
U	unidad enzimática
UF	unidades de fluorescencia
UV	Ultravioleta
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
YPD	medio rico-dextrosa
YPG	medio rico-glicerol

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a las personas e instituciones que hicieron posible la realización de este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por las oportunidades de estudiar, enseñar e investigar. Al Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biológicas y a la Dirección de Posgrado de esta Facultad.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, por darme el espacio para poder desarrollar mis actividades.

A CONICET, por otorgarme la beca doctoral que me permitió llevar adelante este trabajo de Tesis.

A las instituciones que financiaron los proyectos en que se enmarca esta tesis: CONICET, ANPCyT y UNL.

Al Dr. Diego Arias por dirigirme con tanta paciencia y dedicación. Por trasmitirme sus conocimientos, su pasión por la ciencia, por enseñarme a cuestionarme cada nuevo ensayo a desarrollar, por preocuparse por que aprenda y me supere cada día. Por sus palabras de ánimo ante cada caída, por las discusiones científicas (y no científicas también). ¡¡¡ Gracias por todo Diego!!!, sin vos esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Alberto Iglesias por abrimme las puertas de su laboratorio para permitirme insertar en el ámbito científico. Por la confianza puesta en mí, por sus aportes científicos y por la motivación trasmitidas.

Al Dr. Sergio Guerrero, por darme la oportunidad de concretar este trabajo y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A todo el excelente grupo de trabajo del LEM, compuesto de grandes personas, dispuestas a ayudar en lo que sea, a quedar horas hablando de ciencia y cosas de la vida en general. Gracias por los momentos compartidos, por su amistad, por hacer mucho más ameno estos años de doctorado. También gracias, por tantas comilonas y bebidas compartidas. ¡Gracias a todos y a cada uno de los integrantes del LEM, a los que están y los que estuvieron!

A Mati por “lookearme” todos mis trabajos (y a veces a mí también), por los consejos laborales y de vida, por su paciencia, por su predisposición para ayudar, por compartir y discutir conmigo sus ensayos. A “Roberto” por su humor “Beccariano”, por solucionarme toodos mis problemas informáticos, por su “sentimentalidad silenciosa”, por su predisposición a ayudar, por ser mi compañerito de fines de semana

y feriados, junto a la Señora, obviamente. A “Antonieta” por siempre estar dispuesta ayudarme, por sus consejos laborales y de vida, por “retarme” cuando fuese necesario. A “la Tetilia” por su risa contagiosa, por sus cantos, por las actividades extra-laborales compartidas, por hacerme sentir otra habitante de su hogar. A Ana por ser la mamá del laboratorio, por cuidarnos, escucharnos y por mimarnos con cosas ricas. A Esteban, por hacerme reír, por ser mi hermanito peleador del laboratorio, por su ayuda y consejos. A mis “hermanitas Minions”, Sofi y Dani, por las charlas gatunas, por compartir los gustos por las cosas infantiles (pero, si son re tiernas!!!). A Bruno, por su humor y por ser el segundo “wikipedia del lab”. A Carlos, por su buena predisposición, por guiarme durante un tiempo junto a Anita con “Galfredo y sus amigos” con tanta paciencia, y por los momentos compartidos. A Matías, por sus cargadas... “Laura”, por decirme desde el primer día que cada resultado positivo se festejaba con una torta. A Vane, la organizadora de los “meetings”, gracias por los momentos compartidos, por su predisposición a ayudar. A las pequeñas, Vicky y Dai, por su humor, por los buenos momentos compartidos. A los más nuevitos, a Romi por su buena onda; y a Tomás, el silencioso alumnito de TP.

A quienes ya no están pero fueron muy importantes. A “la Anita” (“my real boss”) por acompañarme en los primeros pasos por un laboratorio de investigación, por alegrar los días con sus cantos, por sus increíbles anécdotas, por sus consejos, por su paciencia, por “retarme” cuando fuese necesario. A Mati C. por alegrar los días de trabajo en el laboratorio, por “templarme” el carácter, por sus enseñanzas. A Vanis por los “matitos” compartidos y largas charlas de Enero, además de su predisposición a ayudar. A Meli P. por su humor, a veces un poco ácido. A la Regner, por ser el espíritu de los “after lab”, por su ayuda. A la Sofi O., “la mejor compañera que se puede tener”, a Lau, mi compañerita de aventuras, a “La Anahí” mi compañerita Leptospira. A Machunchus, a Anto B., a Cintia, a Ana P., a Sole. Espero no olvidarme de nadie. Gracias a todos!

A las profes de Macro, a Mabel, como olvidar sus alfajores, sus poesías, su humor. A la Vir, “la mejor profe de TP”, por animarme a hablar enfrente de los alumnos. A Ceci, por su dulzura. A Silvia, por su buena onda y ocurrencias que te hacen reír.

A la gente del LBM, gracias por los consejos técnicos, y la buena predisposición para ayudar.

A la Bioq. Silvia Fusco, por atender con mucha paciencia mis consultas respecto al cultivo y cuidado de las leptos.

Al Dr. Alejandro Beccaria, por su tranquilidad, por enseñar el orden en el laboratorio, por su disposición a explicar y enseñar. A la gente de Viro, Gabi y Vero, por su buen humor, las charlas y momentos compartidos.

A mis amigas de la facu, a las que están conmigo desde los primeros años, Moni, Noe, Virgi, Meli M., Clari, Dani, Lau y Flor. A las que conocí años posteriores, Beti, Indi, Caro y Vero. Gracias por la hermosa amistad que nos une, pese al tiempo y la distancia.

A “las anchitas” gracias por los hermosos momentos compartidos y su amistad.

A mis amigos que me acompañan desde el secundario, a Caro, a Cache, a Lore, a Bel, a Ceci, a Jesi, a Lunga, a Meli, a Jor y a Fiore. Gracias por seguir siendo personitas muy importantes en mi vida. Gracias por tantos años de esta amistad. A Sabri, mi amiguita desde la primaria, por todo lo compartido, por tu hermosa amistad.

A mis padres y hermanos, por entenderme, acompañarme, por su amor. A mi padrino, por esperar ansioso mis visitas, por su cariño. A mis tíos y primos. A mi abuelita, quién estaría muy orgullosa de mí por haber llegado a esta instancia, quién me llenó con todo su amor desde pequeña y a quién extraño muchísimo. También quiero agradecer a mi familia política, por ser mi segundo hogar en Santa Fe, quienes siempre están dispuestos a ayudarme, por su cariño, por entender mis ausencias.

A Sergio “el señor”, gracias por su buena onda, por su predisposición para ayudar.

Finalmente, quiero darles las gracias a mi compañero de vida, a vos Bodo, por tu amor, por intentar entender que me gusta estudiar, por tu paciencia, por elegirme.

A todos gracias y los quiero muchísimo!!!!

PUBLICACIONES Y REUNIONES CIENTÍFICAS

Este trabajo de Tesis fue desarrollado en el Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET) y en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (Universidad Nacional del Litoral), bajo la dirección del Dr. Diego G. Arias y la codirección del Dr. Sergio A. Guerrero. Parte de los resultados expuestos fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Publicaciones:

Arias, D.G.; Reinoso, A.; Sasoni, N.; Hartman, M.D.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. (2014). Kinetic and structural characterization of a typical two-cysteine peroxiredoxin from *Leptospira interrogans* exhibiting redox sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.*, 77:30-40 (aceptado).

Sasoni, N.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A.; Arias, D.G. (2016). Functional thioredoxin reductase from pathogenic and free-living *Leptospira* spp. *Free Radic. Biol. Med.*, 97: 1-13 (aceptado).

Reuniones Científicas:

Sasoni, N.; Reinoso, A.; Arias, D.G.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. "Characterization of Thioredoxin system from *Leptospira interrogans*". XLVIII Reunión Anual de SAIB (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular). Mendoza, Argentina, 29 de Octubre al 1° de Noviembre de 2012, p131.

Sasoni, N.; Arias, D.G.; Iglesias, A.A.; Guerrero, S.A. "Caracterización cinética y estructural de componentes del sistema Tiorredoxina en especies patógenas y saprófitas de leptospiaras". XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires (CABA), Argentina, 22 al 26 de Septiembre de 2013.

Sasoni, N.; Guerrero, S.A.; Iglesias, A.A.; Arias, D.G. "Characterization of a promiscuous glutamate cysteine ligase from *Leptospira interrogans*". L Reunión

Anual de SAIB (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular). Rosario, Argentina, 11 al 14 de Noviembre de 2014, p115.

Sasoni, N.; Guerrero, S.A.; Iglesias, A.A.; Arias, D.G. "Functional enzyme to repair oxidized methionine in proteins damaged by ROS in *Leptospira interrogans*". LI Reunión Anual de SAIB (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular). Mar del Plata, Argentina, 3 al 6 de Noviembre de 2015, p88.

Sasoni N.; Guerrero S.A.; Iglesias A.A.; Arias D.G. "Oxidoreductase activity and iron-sulfur cluster binding of glutaredoxins from *Leptospira interrogans*". LII Reunión Anual de SAIB (Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular). Córdoba, Argentina, 7 al 10 de Noviembre de 2016, p38

RESUMEN

RESUMEN

Las bacterias del género *Leptospira* se encuentran expuestas a especies reactivas (ER) que son generadas durante la infección al huésped o como subproductos de su metabolismo aeróbico. En los sistemas vivientes existen especies reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN), de halógenos (ERH), de azufre (ERS), etc.; y la homeostasis de estas ER está estrechamente relacionada. El daño que éstas provoquen dependerá del balance entre la concentración de las mismas y las defensas antioxidantes que presentan las células. Cuando se pierde dicho balance, el organismo se encuentra en una situación de estrés oxidativo. Bajo esta condición de estrés oxidativo, las ER reaccionan químicamente con lípidos, hidratos de carbono, proteínas y otros componentes celulares, produciendo modificaciones químicas que pueden desencadenar un daño irreversible. Los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) tienen la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Sin embargo, concentraciones de ER no dañinas para las macromoléculas han sido involucradas en diferentes modificaciones post-traduccionales de residuos de Cys, particularmente, la S-tiolación y la S-nitrosilación. La primera, protege proteínas de su oxidación irreversible a ácido sulfínico (R-SO₂H) y sulfónico (R-SO₃H). La segunda, regula una multitud de procesos celulares, incluyendo señalización, metabolismo y las respuestas de estrés.

Esta Tesis se centra en el estudio de diferentes sistemas antioxidantes presentes en el agente causal de la leptospirosis, *L. interrogans* (*L. interrogans*), el cual tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en los tejidos del huésped, escapando de los mecanismos naturales del mismo, así como también contra aquellas ER producidas en forma endógenas.

El primer capítulo de este trabajo comprende los estudios bioquímicos realizados con el objetivo de enriquecer la caracterización cinética y estructural de la catalasa. La enzima constituye un importante factor de virulencia para la bacteria. Entre los resultados obtenidos se observó una inactivación de la misma en presencia de ácido hipocloroso (HClO) y *tert*-butilohidroperóxido (*t*-BuOOH). La inactivación registrada a expensas del HClO condujo a la formación de agregados de elevada masa molecular. Entre unos de los motivos responsables de los efectos inactivadores producidos por el HClO sobre la catalasa se propuso a la oxidación de sus residuos de Met.

En el segundo capítulo se realizó una caracterización comparativa funcional del sistema tiorredoxina (Trx) de especies de leptospiras patógenas y saprófitas (o de vida libre). El sistema Trx incluye una flavoproteína NADPH dependiente, la tiorredoxina reductasa (TrxR), con capacidad de reducir a la Trx. Mediante el análisis *in silico*, se ha podido establecer la presencia de un gen que codifica para una TrxR (*LinTrxR*) y uno para la Trx (*LinTrx*) en la especie patógena. Por otro lado, se identificaron dos secuencias codificantes para TrxRs (*LbiTrxR1* y *LbiTrxR2*) en el genoma de la especie saprófita. Tanto la *LinTrxR* como la *LbiTrxR1*, mostraron actividad tiorredoxina reductasa. Contrariamente, no fue detectada esta actividad en la *LbiTrxR2*, lo cual se asoció con la ausencia de residuos aminoacídicos esenciales para la unión de la coenzima reducida. La *LinTrx* presentó elevada capacidad para reducir disulfuros de baja masa molecular. Se pudo establecer además, mediante ensayos cinéticos *in vitro*, una inhibición del sistema Trx a expensas de azul de metileno (agente antimalárico). Así mismo, ese compuesto produjo una disminución en el crecimiento bacteriano. Por otro lado, se estableció la capacidad de la *Lin2CysPrx* (peroxirredoxina de dos Cys típica) de aceptar electrones del sistema Trx homólogo para mediar la reducción de hidroperóxidos y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La *Lin2CysPrx* mostró elevada sensibilidad a la sobreoxidación, detectándose la forma monomérica (e inactiva) de la proteína en ensayos de *western blot*, realizados sobre extractos bacterianos. Finalmente, fue establecido que la *LinTrx* interacciona mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro con factores que forman parte de la maquinaria de síntesis de proteínas.

En el tercer capítulo se abordó el estudio de la glutamato cisteína ligasa (GCL), la enzima que cataliza el paso limitante en la síntesis de glutatión (GSH). Esta fue expresada en forma recombinante y mostró funcionalidad en presencia de sus sustratos fisiológicos (glutamato, cisteína y ATP). También fue capaz de emplear GTP, aspártico y serina, aunque en menor proporción. Contrariamente a lo informado para enzimas GCL de otros organismos, la enzima de *L. interrogans* mostró ser inhibida por su producto (gamma-glutamilcisteína).

En el cuarto capítulo se estableció la funcionalidad de enzimas responsables de reparar el daño causado por las ER. La reducción de metionina sulfóxido (MetSO) a metionina es catalizada por la metionina sulfóxido reductasa (Msr), una enzima presente en casi todos los organismos. Los tipos de Msr más estudiadas, la MsrA y MsrB, reparan de forma específica cada uno de los estero-isómeros de Met, la Met(S)SO

y Met(R)SO, respectivamente. Se identificaron en *L. interrogans* dos isoformas de MsrA (*LinMsrA1* y *LinMsrA2*) y una MsrB (*LinMsrB*). La esteroespecificidad de ambas isoformas de Msrs generadas en forma recombinante (*LinMsrB* y *LinMsrA2*) se estableció a través de ensayos *in vitro*, cinéticos y cromatografía en capa delgada. Así mismo, su funcionalidad fue puesta de manifiesto a través de ensayos *in vivo* por complementación de cepas mutantes de levaduras en sus Msrs endógenas. En estos ensayos se evidenció funcionalidad de la *LinMsrA1* (no obtenida en forma recombinante). Para el reciclaje de su forma oxidada, las Msrs utilizaron dos sistemas diferentes: mientras el reciclaje de la *LinMsrB* fue a expensas del sistema Trx, el de la *LinMsrA2* estuvo mediado por el par glutatión/glutarredoxina heterólogo. Adicionalmente, la *LinMsrB* fue capaz de recuperar parcialmente a la catalasa homóloga (*Lincatalasa*) de la inactivación a expensas del HClO.

En el último capítulo, se abordó el estudio de una glutarredoxina ditiólica en *L. interrogans* (*Lin2CGrx*). La obtención de la proteína recombinante, permitió la caracterización de esta proteína a través de ensayos cinéticos. Como resultado de estos ensayos fue posible identificar su habilidad para catalizar la reducción de sustratos conjugados con GSH como el 2-hidroxietil disulfuro (HED), así como también sus posibles blancos fisiológicos, como la *LinMsrB*. Así mismo se estudió una glutarredoxina monotiólica identificada en el patógeno (*Lin1CGrx*). Valiéndose de la enzima obtenida en forma recombinante no fue posible detectar actividad disulfuro reductasa mediante el ensayo de HED. Sin embargo, a través de ensayos de complementación en levaduras mutantes en *Grx5*, se obtuvieron resultados que permitieron apoyar la hipótesis planteada sobre la posible función de esta proteína en los sistemas encargados de mantener la homeostasis intracelular del hierro. Desde esta perspectiva *in vivo*, se puso de manifiesto los roles que podría cumplir esta Grx en procesos vinculados con estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, permiten asignarle función a los genes codificantes para proteínas putativas cuya información está disponible en el proyecto genoma de la bacteria. Además, contribuyen al conocimiento de los distintos componentes del metabolismo redox, lo cual será de utilidad para entender la bioquímica y fisiología del organismo modelo de estudio.

ABSTRACT

ABSTRACT

Bacterium from *Leptospira* genus are exposed to reactive species (RS) which are generated during the infection in the host or as byproducts of its aerobic metabolism. Living systems possess a plethora of reactive oxygen species (ROS), nitrogen (RNS), halogen (RHS), sulfur (RSS), etc.; and homeostasis between all these is closely related. The damage that these RS cause will depend on the balance between concentration and the antioxidant defenses present in host's cells. When this balance is lost, cells are under oxidative stress. Under this condition, the RS react chemically with lipids, carbohydrates, proteins and other cellular components, producing chemical modifications that can trigger an irreversible damage. Antioxidant systems (enzymatic and non-enzymatic) can retard or prevent the oxidation of other molecules. Some RS, in lower concentrations than those with deleterious effect at cellular level, have been involved in various post-translational modifications of proteins. Among these, the S-thiolation and S-nitrosylation, occurring at the level of major Cys residues in certain proteins. The former, protects proteins-thiols from being irreversibly oxidized to acid sulfinic (R-SO₂H) and sulfonic acid (R-SO₃H). The latter, regulates a wide range of cellular processes, including signaling, metabolism and stress responses.

This thesis focuses on the study of various antioxidant systems in the causal agent of leptospirosis, *L. interrogans*, which has the ability to survive and grow in the host's tissues, escaping from the RS endogenously produced as well as against those generated by immune host defense mechanisms.

The first chapter of this work involves biochemical studies performed to deepen the knowledge on the kinetic and structural characterization of catalase. The enzyme is an important virulence factor for the bacterium. After a detailed characterization, it is worth mentioning that both HClO and *t*-BuOOH inactivated the enzyme. The registered inactivation (at the HClO expenses) led to the formation of high molecular mass aggregates. It was proposed that a possible reason for the observed HClO-dependent inactivation of catalase could be the oxidation of Met residues.

In the second chapter it was performed a comparative functional characterization of the thioredoxin (Trx) system between pathogenic and saprophytic (or free living) species of *Leptospira*. The Trx system includes a NADPH-dependent flavoprotein, the thioredoxin reductase (TrxR), which was able to reduce by the TrxR. By *in silico* analysis, it has been established the presence of a gene that encodes for a TrxR

(*LinTrxR*) and one for the Trx (*LinTrx*) in the pathogenic species. On the other hand, two coding sequences for TrxRs (*LbiTrxR1* and *LbiTrxR2*) were identified in the genome of the saprophyte species. Both the *LinTrxR* and the *LbiTrxR1*, showed thioredoxin reductase activity. Contrary, this activity not was detected in *LbiTrxR2*, which is associated with the absence of essential amino acids for reduced coenzyme binding. The *LinTrx* presented high ability to reduce disulfides of low molecular mass. It has also been established the inhibition of the Trx system to expense of methylene blue (antimalarial agent). Likewise, the compound resulted in a decrease in bacterial growth. On the other hand, two typical Cys peroxiredoxin (*Lin2CysPrx*) had the ability of accepting electrons from the homologous Trx system to mediate the reduction of hydroperoxides and hydrogen peroxide (H_2O_2). The *Lin2CysPrx* showed high sensitivity to overoxidation, and the monomeric (and inactive) protein form was detected by western blot on bacterial extracts. Finally, was established that the *LinTrx* interacts through of reactions of thiol-disulfide exchange with factors that are part of the machinery of protein synthesis.

In the third chapter, it was studied the glutamate cysteine ligase (GCL), an enzyme that catalyzes the limiting step within glutathione synthesis. The enzyme was recombinantly expressed and its catalytic activity was evidenced *in vitro* in the presence of its physiological substrates (glutamate, cysteine and ATP). The enzyme was also able to use GTP, aspartic, and serine, although in a lower extent. Unlike GCL from other organisms, *LinGCL* was inactivated by its product (gamma-glutamylcysteine).

The functionality of enzymes responsible for repairing the damage caused by the RS was established in the fourth chapter. The reduction of MetSO to methionine is catalyzed by methionine sulfoxide reductase (Msr), an enzyme present in almost all organisms. The most studied types of Msr, the MsrA and MsrB, which repaired specifically each one stereoisomers of Met, the Met(S) SO, and Met(R)SO, respectively, were identified in *L. interrogans* (*LinMsrB*, *LinMsrA1* and *LinMsrA2*). The stereospecificity of both recombinant Msrs isoforms (*LinMsrB* and *LinMsrA2*) was established by *in vitro* kinetic assays as well as by thin layer chromatography. Furthermore, its functionality was evidenced by *in vivo* trials (complementation of mutant yeast strains in their endogenous Msrs). These experiments showed the *LinMsrA1* functionality. Both Msrs recycled from their oxidized forms by two different

systems: while the recycling of the *LinMsrB* was performed at expense of the Trx system, that *LinMsrA2* recovery was mediated by the heterologous glutathione/ glutaredoxin. In addition, the *LinMsrB* was able to partially recover to the homologous catalase from HClO-dependent inactivation.

In the last chapter, was addressed the study of a dithiolic glutaredoxin identified in *L. interrogans* (*Lin2CGrx*). It has been obtained the recombinant protein with high purity, allowing us to perform a detailed kinetic characterization. The enzyme was able to catalyze the reduction of substrates such as the 2-hydroxyethyl disulfide (HED) and glutathione. Furthermore, the enzyme was able to reduce a physiological substrate, the *LinMsrB*. A monothiolic glutaredoxin in the pathogen (*Lin1CGrx*) was also studied. Despite the fact that it could not detected disulfide reductase activity using the pure recombinant enzyme, it has been complemented a yeast mutant strain (lacking Grx5). These results allowed us to hypothesize about a possible function of *Lin1CGrx* in intracellular iron homeostasis maintaining. From this *in vivo* perspective, have brought to light the roles that this Grx could fulfill in processes linked with oxidative stress.

The results obtained in this thesis work, allow it to assign function to genes coding for proteins whose information is available in the draft genome of the bacterium. They also contribute to the knowledge of the various components of the redox metabolism, which will be useful to understand the biochemistry and physiology of the organism model study.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución de la vida: “desde una atmósfera anoxigénica a una atmósfera oxigénica”

Durante el curso de la evolución, los recursos energéticos disponibles para las formas de vida existentes en la Tierra se tornaron limitados, estimulando la utilización de diferentes alternativas y promoviendo de esta forma la diversificación de los caminos bioenergéticos existentes (Banerjee, R. 2008). Los primeros organismos sobre la tierra disponían de una atmósfera levemente reductora con mucho N_2 , CO_2 y poco O_2 . Los metabolismos de éstos eran primordialmente anaerobios. El advenimiento del O_2 atmosférico hace unos 2,2 billones de años atrás fue causa de la aparición de la fotosíntesis oxigénica a cargo de cianobacterias (Halliwell, B. 2006). El resultado químico de este proceso es la generación de O_2 a partir del clivaje de dos moléculas de agua a expensas de la energía solar (Halliwell, B. 2006; Banerjee, R. 2008). Esta aparición del O_2 fue ventajosa en varios sentidos: condujo a la formación de la capa de ozono, que protege a los organismos vivientes de la radiación UV-C y fue un elemento clave en la remoción del hierro (en la forma de Fe^{2+}) de los medios acuáticos (Halliwell, B. 2006). Además, el O_2 permitió facilitar la producción eficiente de la energía ya que su reducción rinde un cambio de energía libre muy favorable (Banerjee, R. 2008). Esta adaptación significó un incremento en el rendimiento de ATP obtenido a partir de las moléculas empleadas como combustibles celulares (por ejemplo glucosa). Detrás de esta utilización eficiente, con el incremento del oxígeno muchos organismos anaerobios murieron, mientras que otros evolucionaron mecanismos de defensa antioxidantes, aunque debieron confinarse a nichos anaerobios (McCord, J.M. 2000). La evolución también dirigió a muchos de los organismos que adaptaron su tolerancia al O_2 para utilizarlo para diferentes transformaciones metabólicas (Halliwell, B. 2006; Banerjee, R. 2008).

1.2. Especies reactivas y estrés oxidativo

1.2.1. Conceptos

Un radical libre es cualquier átomo o molécula de independiente existencia (de ahí el término libre) que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital

exterior. Un electrón desapareado es uno que ocupa un orbital atómico por sí mismo (Halliwell, B. 2006; Lushchak, V.I. 2014). El término radical libre enfatiza una reactividad más alta comparada con moléculas cuyos átomos están ligados a otros por covalencia. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón (reducción) que necesita, la molécula estable que lo pierde (oxidación) se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena (Halliwell, B. 2006; Lushchak, V.I. 2014). Debido a que estas especies reactivas no poseen blancos específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre diversos componentes celulares. En la mayoría de los casos, "radicales libres" y "especies reactivas" se utilizan indistintamente, sin embargo no es del todo correcto. Se prefiere el término especies reactivas (ER), debido a que el mismo incluye a todas las sustancias altamente oxidantes (tanto radicales libres como no radicales) generadas como productos del metabolismo normal de organismos aerobios (Halliwell, B. 2006; Cinco, M. 2010; Lushchak, V.I. 2014).

En los sistemas vivientes existen especies reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN), de halógenos (ERH), de azufre (ERS), etc.; y la homeostasis de todas estas ER está estrechamente relacionada (Halliwell, B. 2006; Lushchak, V.I. 2014). El daño que éstas provoquen dependerá del balance entre la concentración de las mismas y las defensas antioxidantes que presenten las células (Foyer, C.H. y col. 2005; Moller, I.M. y col. 2007). Cuando se pierde dicho balance, el organismo se encuentra en una situación de estrés oxidativo. Bajo esta condición de estrés oxidativo, las ER reaccionan químicamente con lípidos, hidratos de carbono, proteínas y otros componentes celulares, produciendo modificaciones químicas que pueden desencadenar un daño irreversible y consecuentemente, la muerte celular (Forman, H.J. y col. 2004; Winyard, P.G. y col. 2005) (**Figura 1**).

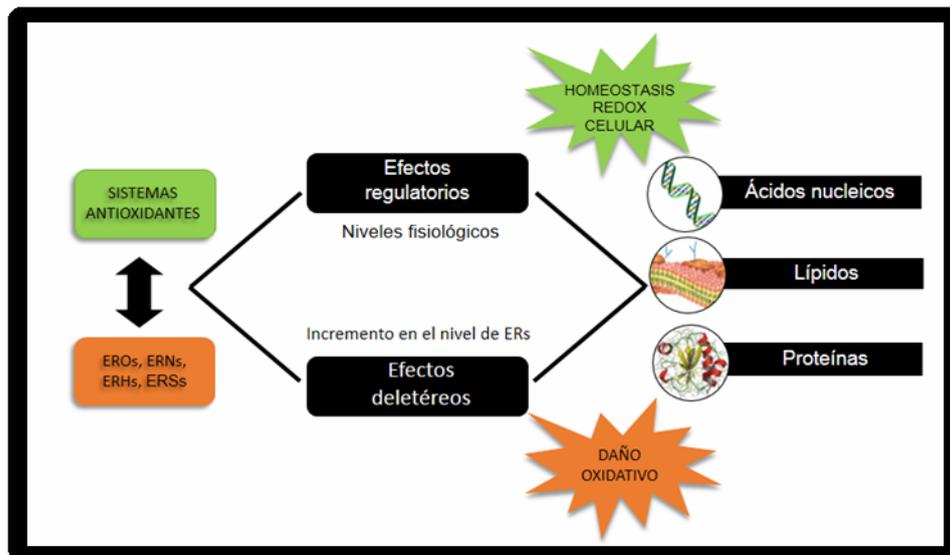


Figura 1 | Homeostasis redox y estrés oxidativo.

1.2.2. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Existen distintos tipos de especies reactivas de oxígeno (EROs) que presentan diferentes características como: poder oxidante, capacidad de difundir o vida media. El radical hidroxilo es extremadamente reactivo, mientras que el superóxido y el peróxido de hidrógeno lo son en menor grado. La **Figura 2** resume su modo de producción a partir de la molécula de oxígeno activado u oxígeno singlete (1O_2). En el estado fundamental esta molécula de O_2 está en forma de triplete (*spins* paralelos) y esta configuración electrónica le confiere estabilidad y baja reactividad. Esta estructura de oxígeno activado u oxígeno singlete (1O_2) es susceptible a cuatro reducciones parciales, en las cuales se pasa de a un electrón por vez, dando como producto final agua. La reducción por transferencia de un electrón genera el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), la reducción por adición de dos electrones genera H_2O_2 , mientras que la adición de tres electrones produce (HO^{\bullet}) (Winyard, P.G. y col. 2005). El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), creado a partir del oxígeno singlete (1O_2), no es un radical altamente reactivo, no posee la capacidad de penetrar membranas lipídicas y es por ello que queda confinado en el compartimiento en el que se produjo. Se genera de forma espontánea en ambientes aeróbicos ricos en electrones (membrana interna mitocondrial) y en forma endógena por flavoenzimas. Dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ rápidamente dismutan a H_2O_2 y O_2 , siendo esta reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004; Banerjee, R. 2008). El H_2O_2 es capaz de atravesar las membranas biológicas, cumpliendo un rol importante en la formación de moléculas

más reactivas, incluyendo el HClO y el HO• vía oxidación de metales de transición (Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004; Banerjee, R. 2008). El HO• es la especie más oxidante de las EROs y la más tóxica en los sistemas biológicos. Este radical es formado a partir de H₂O₂ en una reacción catalizada por iones metálicos, como Fe²⁺ o Cu²⁺, a veces unidos a proteínas u otras moléculas (reacción de Fenton). El superóxido juega un papel relevante en conexión con la reacción de Fenton, por reciclado del ión metálico (Banerjee, R. 2008). La suma de ambas reacciones es la reacción de Haber-Weiss (Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004; Banerjee, R. 2008). Por otro lado, la alta difusibilidad del H₂O₂, su producción en forma endógena, su acumulación local y su interacción con enzimas para metabolizarse, lo hace un atractivo segundo mensajero relacionado con la señalización intracelular, regulando actividades de proteínas que componen diferentes vías metabólicas mediante una oxidación reversible de las moléculas blanco (Rhee, S.G. y col. 2005; Halliwell, B. 2006; Banerjee, R. 2008).

1.2.3. Especies reactivas de nitrógeno (ERNs)

El óxido nítrico (NO•) es producido por la NO sintasa a partir de L-arginina y O₂ (Martinez, 2009). Éste es un radical libre similar al (O₂•-) ya que no reacciona rápidamente con las biomoléculas. Por otro lado, reacciona fácilmente con otros radicales libres (por ejemplo radicales peroxilos y alquilos) produciendo fundamentalmente moléculas menos reactivas, y es por ello que funciona como un antioxidante (Patel, M.P. y col. 1998; Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004). Si el O₂•- es producido en grandes cantidades en paralelo con el NO•, éstos reaccionan entre ellos para dar el ONOO• (peroxinitrito), el cual reacciona rápidamente con biomoléculas. El ONOO• puede reaccionar directamente con CO₂ para formar una especie más reactiva, nitrosoperoxocarboxilato (ONOOOCO₂), o la forma protonada, ácido peroxinitroso (ONOOH), así como experimentar homólisis, dando HO• y •NO₂ o reordenarse a nitrato (Patel, M.P. y col. 1998; Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004). En concentraciones fisiológicas el NO• funciona como un mensajero intracelular y dado a su capacidad de atravesar membranas celulares puede transmitir las señales a otras células. Sin embargo, su acción directa es limitada debido a su corta vida media y la relativamente corta distancia que esta molécula puede atravesar. Por otro lado, cuando es producido en grandes cantidades, el NO• se torna un factor significativo en el control redox de las funciones celulares. La nitrosación es la

condensación del grupo NO^+ a grupos tiolatos (R-S) en proteínas, y actúa como regulador de la función de las mismas (Patel, M.P. y col. 1998; Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004). La excesiva producción de $\text{NO}\cdot$ puede ser contrarrestada por su conjunción con glutatión (GSH), dando S-nitrosoglutatión (GSNO). El GSNO puede actuar como oxidante/regulador enzimático. Éste puede ser reducido a GSH y $\text{NO}\cdot$ nuevamente. Las reacciones de denitrosilación pueden ser realizadas por una GSNO reductasa, generando glutatión disulfuro (GSSG) y amonio, permitiendo de este modo regular los niveles intracelulares de S-nitrosotioles. Otra modificación post-traducciona que puede ser inducida por ERNs es la nitración de tirosinas, una reacción de dos etapas. La primera, es la generación del radical tirosilo por oxidación de la tirosina por especies reactivas generadas a partir del $\text{ONOO}\cdot$. La segunda, el radical tirosilo reacciona con NO_2 para formar 3- NO_2 -Tyr (3-nitrotirosina), la cual es indicador del ataque del $\text{ONOO}\cdot$ a proteínas (Martínez, M.C. y col. 2009) (**Figura 2**).

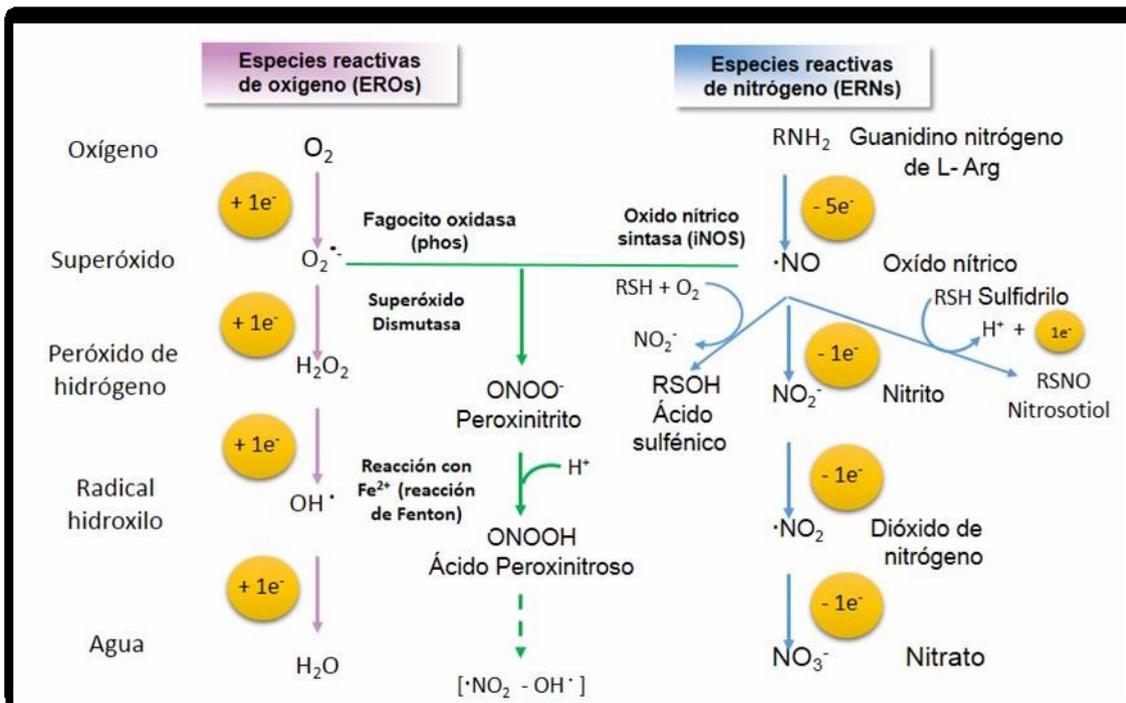


Figura 2 | Formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Imagen adaptada de Fang, F.C. (2004).

1.2.4. Especies reactivas de halógenos (ERHs)

Las hemoperoxidasas presentes en los neutrófilos y los eosinófilos producen ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, cloraminas y bromaminas. Estos oxidantes altamente reactivos desempeñan un papel central en la defensa del huésped así como también causan daño tisular durante el proceso inflamatorio (Peskin, A.V. y col. 2009). La mieloperoxidasa (MPO) cataliza la oxidación, en presencia de H_2O_2 , de Cl^- , Br^- o SCN^- a $HClO$, $HBrO$ o $HOSCN$, respectivamente. El $HClO$ y el $HBrO$ reaccionan rápidamente con Cys y Met, oxidándolas a diversas especies. Las cloraminas y bromaminas, formadas por reacción de $HClO$ y $HBrO$ con residuos de aminas, si bien son menos reactivas muestran una preferencia similar por reaccionar con los residuos de Cys y Met (Peskin, A.V. y col. 2009; Ronsein, G.E. y col. 2014). Las ERHs son capaces de oxidar Met a $MetSO$ (Peskin, A.V. y col. 2009; Ronsein, G.E. y col. 2014). La oxidación de residuos de Met en proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales que puede ocurrir tanto *in vivo* como *in vitro*, y está asociada con la pérdida de actividad biológica en una amplia gama de proteínas, entre ellas los citocromos (Philpott, C.C. y col. 2002). La oxidación preferencial de Met (en proteínas o libre) y su posterior reducción por la Msr puede conferir defensa contra el estrés oxidativo a través del consumo de oxidantes que de otro modo serían perjudiciales. Además, las vías de señalización celulares que dependen de oxidantes pueden explotar la conmutación fácil entre residuos de Met y $MetSO$ en proteínas (Peskin, A.V. y col. 2009; Ronsein, G.E. y col. 2014).

1.2.5. Especies reactivas de azufre (ERSs)

El azufre al igual que el oxígeno, existe naturalmente en los sistemas vivos, donde desempeña una amplia variedad de importantes funciones biológicas en pequeñas moléculas, péptidos y proteínas (Giles, G.I. y col. 2002). En condiciones fisiológicas, el oxígeno existe en pocos estados de oxidación, entre 0 (en el O_2) y -2 (en el H_2O). En contraste, el azufre puede existir en aproximadamente 10 estados de oxidación que van desde -2 (en tioles, $R-SH$) a +6 (SO_4^{2-}) (**Figura 3**). Los potenciales de reducción de las especies del azufre son considerablemente menos positivos que los de oxígeno. En tanto que, las especies de azufre son más reductoras que las correspondientes especies derivadas del oxígeno, apoyando la noción popular de que el azufre es un «elemento antioxidante» (Giles, G.I. y col. 2002; Mishanina, T.V. y col.

2015). La oxidación de R-SH celulares da lugar a especies que se pueden oxidar y posteriormente inhibir la actividad enzimática de proteínas sensibles al estado redox. Las especies oxidadas de azufre incluyen los radicales centrados en el azufre, disulfuros (R-S-S-R), disulfuro-S-óxidos [R-S-S(=O)-R] y ácidos sulfénicos (R-SOH) (Giles, G.I. y col. 2002). La oxidación de Cys por pérdida de un electrón resulta en la formación del radical tílo (R-S•), el cual es inestable bajo condiciones fisiológicas. Este radical puede ser formado por tres rutas: 1) donación de hidrógeno, 2) oxidación enzimática catalizada por peroxidasa, y 3) reacción con EROs. Las dos primeras rutas constituyen las principales fuentes de R-S• en condiciones fisiológicas normales; mientras que la tercera constituye una fuente adicional de R-S• en condiciones de estrés oxidativo, debido al incremento en la concentración de EROs (principalmente HO• y ONOO•) (Giles, G.I. y col. 2002).

Durante los últimos 20 años, un número adicional de radicales centrados en el azufre, químicamente algo complicado, fueron implicados en procesos fisiológicos, entre ellos el radical pertil (R-S-S•), el catión radical sulfuro (R-S•+) y el catión radical disulfuro unido por tres electrones (R-S•:S-R). Curiosamente, el comportamiento redox del azufre, no sólo permite radicales cationes disulfuro, sino también radicales aniones disulfuro [(R-S-S-R)•-]. Estos últimos, son formados por reacción del R-S• con un R-SH, y dada a la alta disponibilidad de R-S• y R-SH en la células, los (R-S-S-R)•- serían los radicales centrados en azufre más comunes (Giles, G.I. y col. 2002). Los disulfuros a nivel celular causan daño oxidativo cuando están presentes en altas concentraciones y su formación en exceso contribuye al estrés oxidativo. Por ejemplo, el glutatión disulfuro (GSSG) es formado en altas cantidades en estrés oxidativo como resultado de la oxidación directa o catalizada enzimáticamente, de glutatión (GSH) por EROs y otros oxidantes celulares. Un gran número de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), tioltransferasas, peroxirredoxinas (Prx) y glutarredoxinas (Grx) usan GSH como especie reductora y convierten éste en GSSG durante el proceso (Giles, G.I. y col. 2002). Un camino adicional para la generación de ERSs es a través de la oxidación de R-SH y R-S-S-R a R-S-S(=O)-R. Así, por ejemplo, la oxidación de GSH con una variedad de oxidantes genera entre sus productos GSSG, así como también glutatión disulfuro-S-monóxido [GS-S(=O)G] y glutatión disulfuro-S-dióxido [GS-S(=O)₂G] (Giles, G.I. y col. 2002). El R-SOH contiene al azufre en un bajo estado de oxidación, éste puede ser formado por oxidación directa de R-SH con H₂O₂, así como también por reducción de R-S-S(=O)-R. Este ácido es altamente reactivo, de forma tal que reacciona

con R-SH para formar R-S-S-R y con otras EROs para formar una forma más estable, el ácido sulfínico (R-SO₂H). El R-SOH ha sido encontrado en un número de enzimas y proteínas, entre ellas NADH peroxidasa, NADH oxidasa, peroxirredoxinas, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, etc., pudiendo ser reducido a tiol durante el ciclo redox de las mismas. Además de su rol como catalizador redox en enzimas, el R-SOH es considerado parte de sistemas de señalización celular y potencial participante del estrés oxidativo. Por otro lado, el R-SO₂H (también asociado con traducción de señales redox dependiente) no puede reducirse a R-SH en ausencia de un catalizador específico, pero sí puede ser oxidado a ácido sulfónico (R-SO₃H). El R-SO₃H es mayoritariamente redox inerte bajo condiciones fisiológicas (Giles, G.I. y col. 2002).

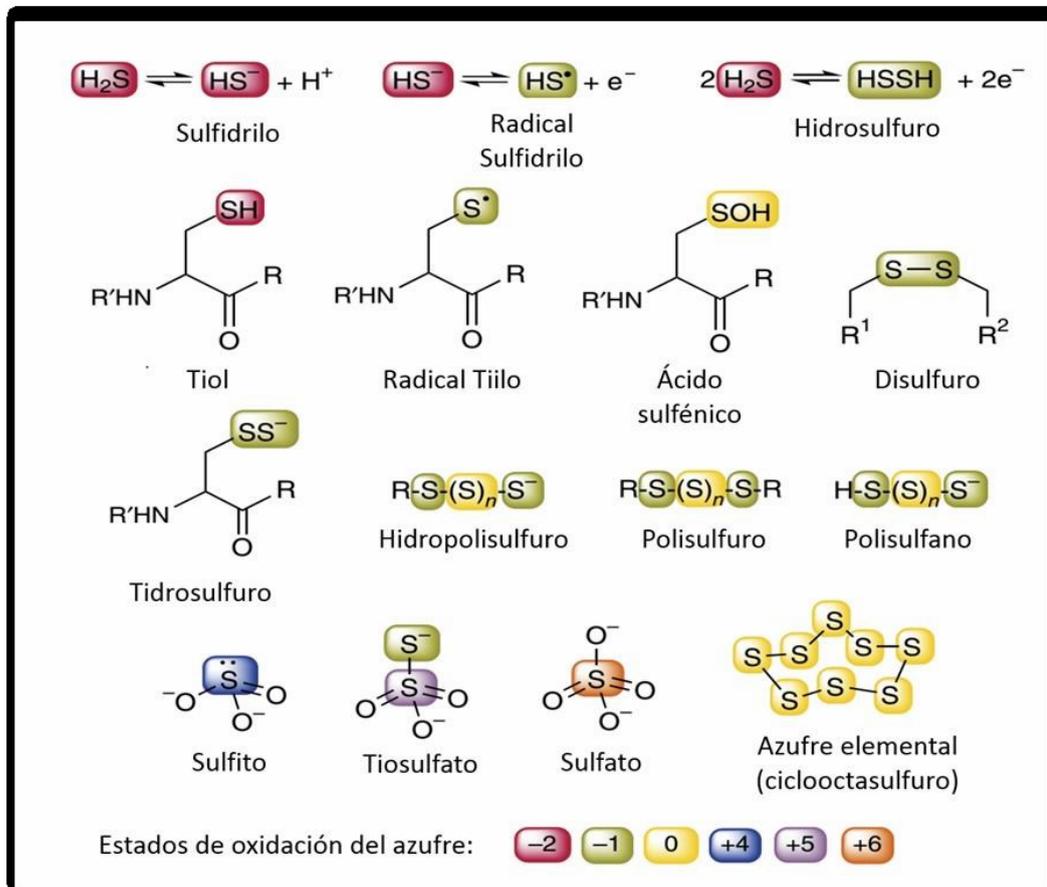


Figura 3 | Estructura de algunas ERSs biológicamente relevantes. Imagen adaptada de Mishanina, T.V. y col. (2015).

1.3. Sistemas antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Como se mencionó anteriormente, las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células. Los antioxidantes terminan estas reacciones por eliminación de intermedios reactivos, deteniendo las reacciones de oxidación, y en consecuencia, oxidándose ellos mismos. Debido a esto es que los antioxidantes, en general, son agentes reductores. Dentro de la célula los sistemas antioxidantes son encargados de mantener la homeostasis redox y se dividen en dos grandes grupos; no enzimáticos y enzimáticos (Trachootham, D. y col. 2008). Los sistemas antioxidantes no enzimáticos incluyen las coenzimas redox como las flavinas (FAD, FMN), piridina-nucleótido (NAD/NADH, NADP/NADPH), quinonas, pteridinas y ácido fólico, las cuales participan en reacciones catalizadas por enzimas y su función es la transferencias de electrones (Banerjee, R. 2008; Circu, M.L. y col. 2010). Además, se encuentran dentro de este grupo moléculas antioxidantes como ascorbato, β -caroteno, ácido dihidrolipoico, α -tocoferol, flavonoides, ácido úrico y los R-SH de baja masa molecular entre ellos el GSH. Por otra parte, los sistemas antioxidantes enzimáticos (**Figura 4**), pueden catalizar reacciones de:

- eliminación de ROS, como por ejemplo catalasa, superóxido dismutasa, peroxirredoxinas;
- reducción de sustratos disulfuros, como las Trx y las Grxs;
- reparación, como por ejemplo las Msrs y las sulfirredoxinas;
- detoxificación, como las GSH transferasas (GST).

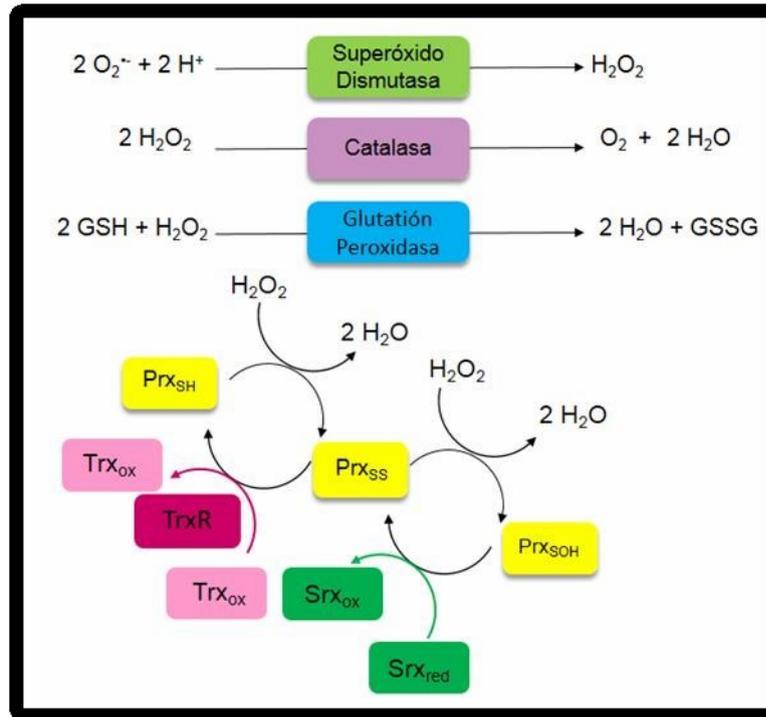


Figura 4 | Reacciones catalizadas por algunas enzimas antioxidantes encargadas de la eliminación de ROS. Prx: Peroxirredoxinas, Trx: Tiorredoxinas, SrX: Sulfirredoxinas.

1.3.1. Sistemas de reducción de enlaces tiol-disulfuro

En bacterias Gram negativas, las proteínas con enlaces de disulfuro se encuentran predominante en compartimentos extra citoplasmáticos (el periplasma). En estos compartimientos, los enlaces disulfuro pueden ser necesarios para el correcto plegamiento de una proteína, para mejorar su estabilidad o para la actividad de la proteína (Ritz, D. y col. 2001). Los principales sistemas enzimáticos responsables de mantener los residuos de Cys en forma de R-SH en proteínas citoplasmáticas son derivados del NADPH (el sistema tiorredoxina y el dependiente de GSH). El sistema tiorredoxina, está compuesto por una tiorredoxina reductasa (TrxR) y la tiorredoxina (Trx); mientras que el sistema dependiente de GSH incluye, glutatión reductasa, glutatión y glutarredoxinas (Ritz, D. y col. 2001; Holmgren, A. y col. 2005).

1.3.1.1. Sistema Tiorredoxina

1.3.1.1. A. Tiorredoxinas

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas pequeñas, de aproximadamente 12 kDa, con un motivo conservado en su sitio activo CGPC (Holmgren, A. y col. 2005). Las Trx son ubicuas, están distribuidas desde Archea, bacterias, hasta el hombre. Presentan una

estructura globular, compuesta de un núcleo interno formado por cinco láminas- β rodeadas por cuatro α -hélices (**Figura 5**). El sitio activo está localizado en la superficie de la proteína en un corto segmento en el extremo N-terminal de la α -hélice 2 (Banerjee, R. 2008; Lu, J. y col. 2014) (**Figura 5**). El dominio estructural Trx está presente en muchas proteínas redox, entre ellas las glutarredoxinas (Grx), proteína disulfuro isomerasa (PDI), peroxirredoxinas (Prx), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión-S-transferasa (GST) (Lillig, C.H. y col. 2007; Lu, J. y col. 2013).

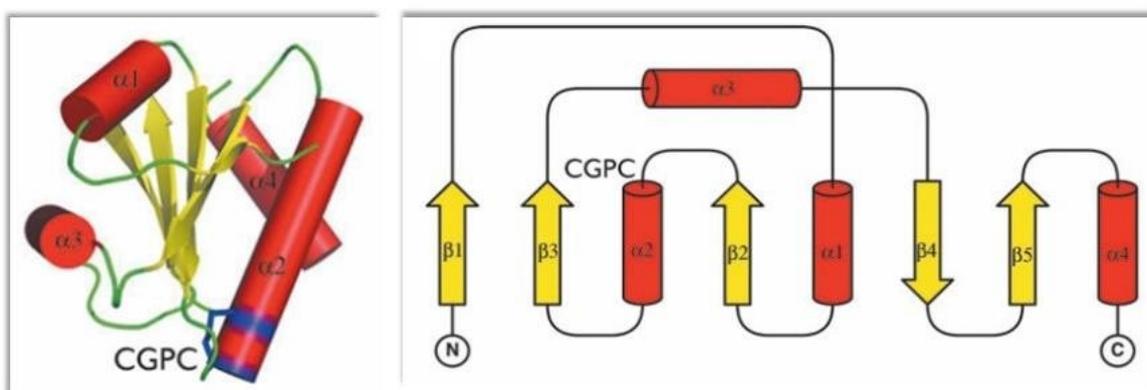


Figura 5| Estructura secundaria y tridimensional de la Trx. La estructura consiste de 4 α -hélices rodeando un núcleo central de 5 láminas- β . El motivo conservado CXXC se localiza en el extremo N-terminal de la hélice- $\alpha 2$. Las hélices- α están en rojo, las láminas- β en amarillo y el puente disulfuro en azul. Imagen adaptada de Collet, J.F. y col. (2010)

La Trx puede existir en su forma reducida como ditiol Trx-(SH)₂ y en su forma oxidada como disulfuro Trx-S₂. El bajo potencial de reducción de estas proteínas ($E'_0 = -270$ mV, valor promedio), las hace reductores eficientes de puentes disulfuro tanto *in vivo* como *in vitro* (Ritz, D. y col. 2001). La capacidad redox de catalizar la reducción de puentes disulfuro depende en gran medida de la naturaleza de los dos aminoácidos entre las Cys del sitio activo (Ritz, D. y col. 2001). Diferencias en estas dos posiciones resultan en cambios en el potencial de reducción de la proteína y en el pKa de la Cys reactiva nucleofílica N-terminal (Ritz, D. y col. 2001). En general, cuanto mayor sea el pKa de esta Cys, más estable será la forma oxidada de la proteína, haciendo que la forma reducida de la proteína sea una excelente reductasa de enlaces disulfuro (Ritz, D. y col. 2001). La Trx-(SH)₂ reduce directamente enlaces disulfuros de proteínas sustratos, inicialmente a través de interacciones hidrofóbicas superficiales y por formación de puentes de hidrógeno. Esto es seguido por un ataque nucleofílico del tiolato N-terminal del sitio activo sobre el puente disulfuro blanco,

resultando en un intermediario disulfuro proteína-proteína transiente. Subsecuentemente, el ataque intramolecular del tiolato C-terminal resulta en la ruptura del disulfuro mixto proteína-proteína, con la concomitante formación de Trx-S₂ y la generación de la proteína blanco en la forma de ditiol (o forma reducida, **Figura 6**).

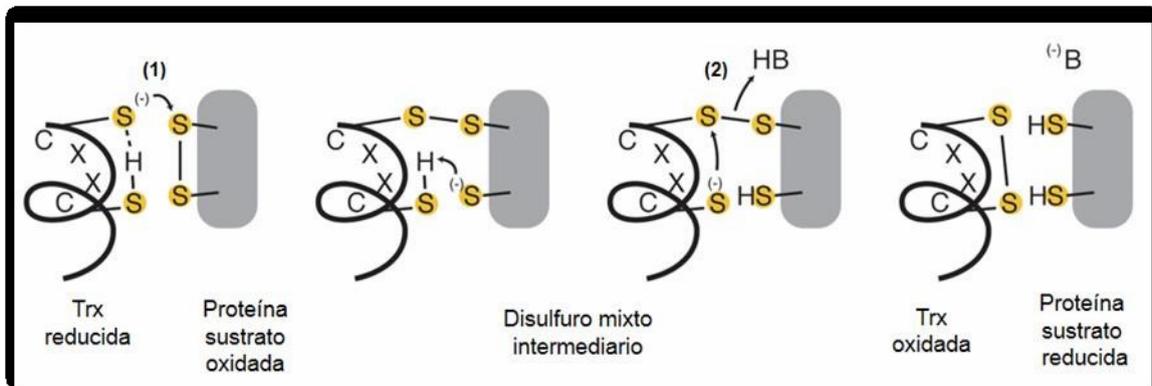


Figura 6 | Representación esquemática del mecanismo de reacción de reducción de disulfuros por la Trx. (1) La reacción comienza con el ataque nucleofílico de la Cys N-terminal, del conservado motivo CGPC, hacia el disulfuro de la proteína blanco. El tiolato de la Cys nucleofílica es mantenido por uniones de hidrógeno con el NH de la glicina y el SH de la Cys C-terminal. Como resultado, se forma un disulfuro mixto entre la Trx y la proteína sustrato, el cual es reducido por el ataque nucleofílico de la Cys C-terminal del motivo CGPC (2).

Además de mantener un ambiente reductor en el citoplasma de las células, las Trx protegen a las proteínas de la inactivación mediada por ER de oxígeno y nitrógeno. En adición, son sustratos reductores de enzimas antioxidantes como Msrs y Prx, así como también actúan como dador de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa, la cual es esencial para la síntesis de ADN. Adicionalmente, la Trx participa en la regulación de la muerte celular programada llevando a cabo una reacción diferente a la anteriormente descrita, nitrosilando proteínas blanco (Arner, E.S. y col. 2000; Nordberg, J. y col. 2001; Forman, H.J. y col. 2004; Holmgren, A. y col. 2005).

1.3.1.1. B. Tiorredoxina reductasa

La tiorredoxina reductasa (TrxR), es una flavoenzima homodimérica que cataliza específicamente la reducción de Trx-S₂ a expensas de NAD(P)H (Holmgren, A. y col. 2005). Cada monómero posee una molécula de FAD como grupo prostético, un sitio de unión de NADPH y un sitio activo conformado por un disulfuro redox activo. Dos clases de TrxR han sido caracterizadas, ambos tipos son miembros de la familia de flavoproteínas: piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasas. Sin embargo, la

secuencia de aminoácidos y mecanismo catalítico de los dos tipos de TrxR son diferentes. Un tipo, el de las TrxR de alto peso molecular (~55 kDa, designada H-TrxR), ha sido caracterizado en animales incluyendo mamíferos, *Drosophila melanogaster* y en protozoos parásitos como *Plasmodium falciparum*. El otro tipo, que incluye a las TrxR de bajo peso molecular (~35 kDa, designado L-TrxR), ha sido encontrado en Archea, Bacteria, Eukarya, incluyendo hongos filamentosos, levaduras, plantas y protozoos parásitos como *Trichomona vaginalis* y *Giardia duodenalis*. Las H-TrxR están relacionadas a otras enzimas como GR, tripanotión reductasa (TR), mercúrico reductasa (MerR) y lipoamida deshidrogenasa (LipD); mientras que las L-TrxR se encuentran relacionadas a la alquil hidroperóxido reductasa F (AhpF). Existe solo, aproximadamente, 20% de identidad de secuencia entre las L-TrxR y las H-TrxR, en las regiones donde pueden ser alineadas (Holmgren, A. 1977; Jacquot, J.P. y col. 1994; Williams, C.H. y col. 2000; Hirt, R.P. y col. 2002; Rahlfs, S. y col. 2002). En las L-TrxR los electrones son transferidos desde el NADPH hacia el FAD y luego al disulfuro redox activo (generalmente el motivo CATC, ubicado en el dominio de unión a NADPH). La reducción del sitio activo origina la rotación del dominio en donde se ubica, exponiéndolo hacia la superficie para poder interactuar con sus sustratos. Una característica importante de las H-TrxR es que las enzimas de mamíferos son selenoproteínas, en donde un residuo de Cys del sitio activo es reemplazado por uno de selenocisteína. Para poder acceder a los sustratos, el mecanismo de las H-TrxR involucra, la transferencia de electrones desde el NADPH al disulfuro redox activo N-terminal, vía FAD. Luego, los electrones se transfieren hacia un sitio activo localizado en el C-terminal de la subunidad opuesta (donde un Sec-Cys, un puente selenilsulfuro es reducido a selenotiol, en la enzima de mamíferos). Este sitio activo C-terminal es donde son reducidas las Trxs y otros sustratos son reducidas las Trxs y otros sustratos son reducidas las Trxs y otros sustratos (**Figura 7**). La selenocisteína en la enzima de mamíferos permite acomodar un gran espectro de sustratos y la mutación de dicho aminoácido por Cys genera una enzima con 100 veces menos actividad. Esto se debe, principalmente, a la diferencia de reactividad entre selenotiol y el tiol, debido por ejemplo, al bajo pKa del selenotiol (Zhong, L. y col. 2000; Nordberg, J. y col. 2001).

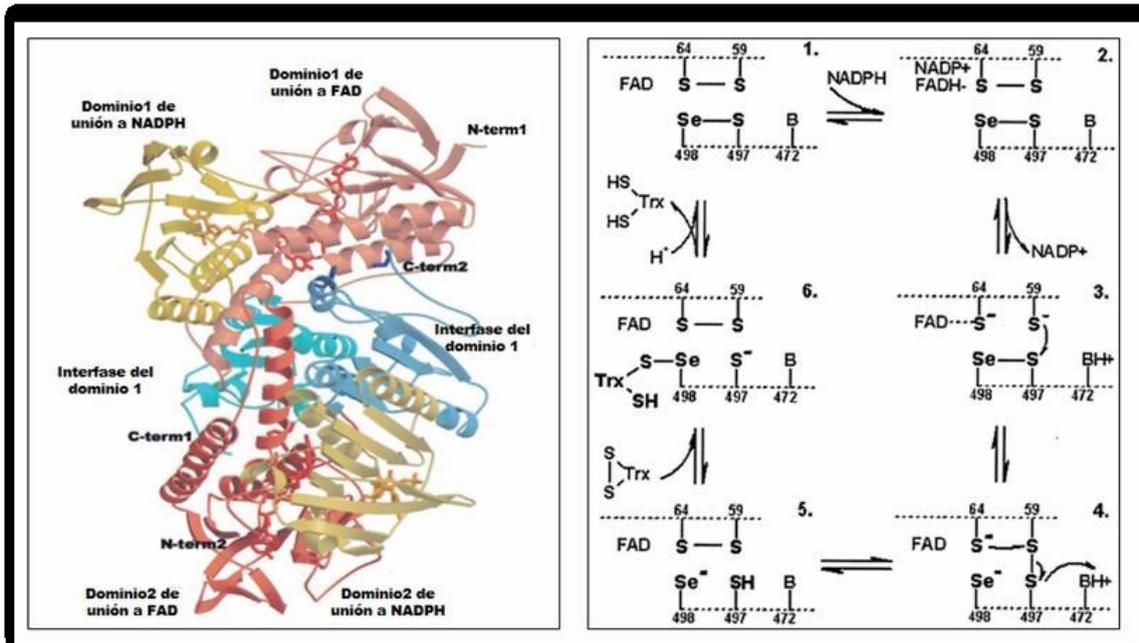


Figura 7 | Estructura y mecanismo de reacción de TrxR de mamíferos (rata). Imagen adaptada de Sandalova, T. y col. (2001)

1.3.1.1. C. Sistema dependiente de glutatión

3.3.1.1. C.1. Glutatión

El glutatión reducido (GSH) es sintetizado *de novo* mediante una reacción de dos etapas ATP dependientes. En la primera etapa, catalizada por la glutamato cisteína ligasa (GCL), se forma γ -glutamilcisteína (γ -GC) a partir de glutamato y Cys. Luego se añade glicina por acción de la glutatión sintetasa (GS) para así formar el tripéptido GSH (γ -glutamilcisteínaglicina). En general, ambas proteínas están codificadas por dos genes independientes, *gshA* codifica para GCL y *gshB* codifica GS. Sin embargo, existen unos pocos organismos en los cuales un solo gen *gshF* codifica para una enzima bifuncional. Los factores limitantes para la síntesis de glutatión son la disponibilidad de Cys y la actividad de GCL (Apontoweil, P. y col. 1975a; Zhang, H. y col. 2012) (**Figura 8**). Por el contrario en algunas bacterias Gram positivas, el GSH no es sintetizado *de novo* y sin embargo, se lo ha involucrado en una variedad de funciones, por ejemplo como suplemento en el medio de crecimiento de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*; como un agente protector frente al estrés oxidativo, ácido y osmótico en *L. lactis* y *S. mutans* y como un factor molecular que contribuye a la virulencia de *Listeria monocytogenes*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. En éstos organismos se ha descrito un transportador para importar GSH del medio, lo mismo ocurre en

algunos organismos Gram negativos, tales como *Hemophilus*, en los cuales se encontró una proteína de unión a soluto (SBP), que es capaz de unir GSH, y conducir su importación a través del sistema de transporte ABC (*ATP-binding cassette*). Algunos organismos como *S. mutans* pueden sintetizar GSH tanto *de novo* como incorporarlo del medio externo (Vergauwen, B. y col. 2010; Vergauwen, B. y col. 2013) (Figura 8).

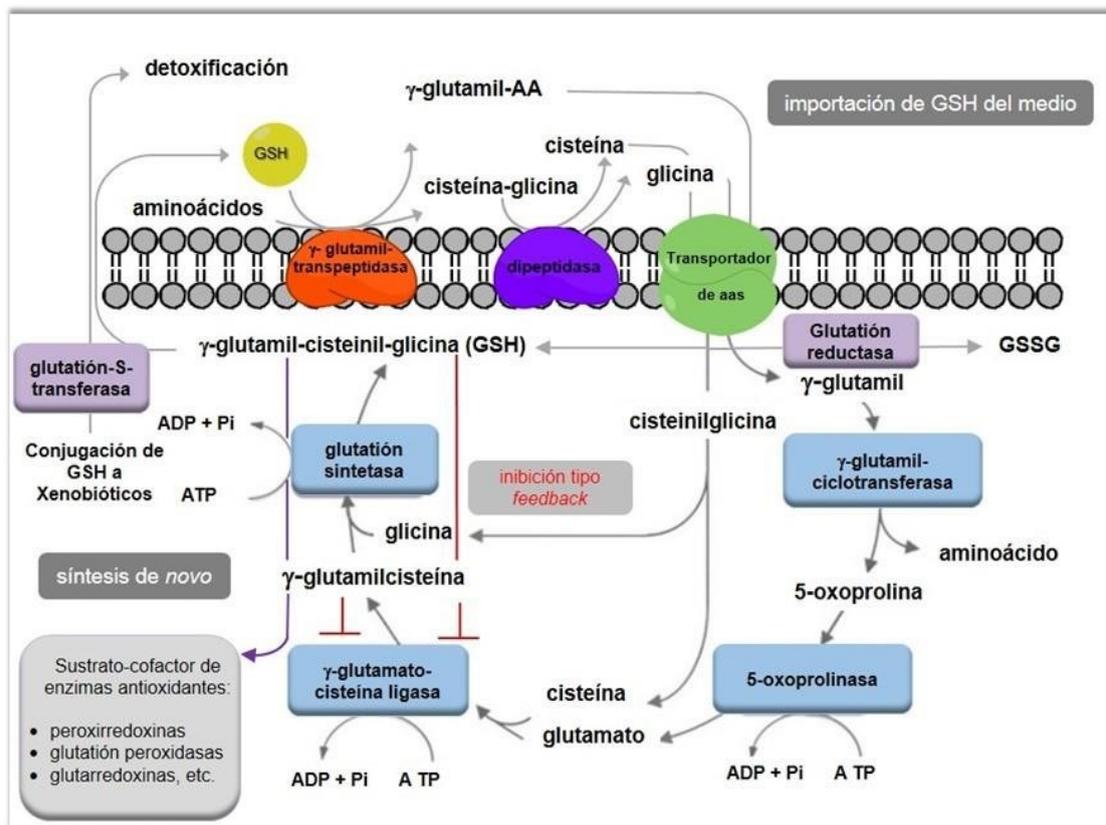


Figura 8 | Esquema de síntesis *de novo* e importación de GSH del medio, así como también su interacción con sistemas antioxidantes.

El GSH está involucrado en numerosos procesos biológicos, como almacenamiento de Cys, mantenimiento de la estructura y función de proteínas, regulación de la actividad de enzimas mediante la reducción de enlaces disulfuro o por glutatiónilación (formación de disulfuros mixtos entre tioles de proteínas y GSH), etc. Sin embargo, como se menciona arriba, su función primaria es la de mantener la homeostasis redox intracelular, mediante reducción directa de especies reactivas, o bien de un modo indirecto oxidándose a glutatión disulfuro (GSSG), el cual actúa como sustrato de otras proteínas responsables de la detoxificación de especies reactivas, tales como GST y GPx (Forman, H.J. y col. 2003; Hurd, T.R. y col. 2005; Gallogly, M.M. y col.

2007; Banerjee, R. 2008). Las glutatión-S-transferasas (GST) pueden convertir peróxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes y agua, y generar GSSG. Sin embargo, la función primaria de estas enzimas es catalizar la conjugación de GSH a sustratos electrofílicos, disminuyendo la reactividad de los mismos aunque aumentando su solubilidad. La glutatión reductasa (GR) es una flavoproteína miembro de la familia de las piridina nucleótido disulfuro oxidoreductasas, encargada de mantener el *pool* celular de GSH. Esta reduce el GSSG a GSH a expensas del NADPH, y presenta una estructura homodimérica. Cada monómero presenta cuatro dominios bien conservados, uno de unión a FAD, uno de unión a NADPH, uno de unión a GSSG y uno de interfase entre las subunidades (Carlberg, I. y col. 1985; Dringen, R. y col. 2002; Banerjee, R. 2008).

La mayoría de los organismos vivos contienen altas concentraciones de tioles de baja masa molecular que sirven como *buffers* redox para proteger las células contra una gran variedad de especies químicas reactivas, como EROs, ERNs, entre otras. El GSH es el más ubicuo de los tioles de baja masa molecular, pero ciertas células contienen altas concentraciones de otros compuestos de azufre tales como Cys (en todos los organismos), γ -glutamilcisteína (en bacterias lácticas y halobacterias), bacilotioliol (en bacterias del género *Bacillus*), micotioliol (en *Actinomycetes*), tripanotioliol (en tripanosomátidos), ovotioliol (en invertebrados marinos y *Leshmania*), coenzima A (en todos los organismos) y ergotionina (Fungi y Mycobacteria), los cuales están encargados de mantener el balance redox celular (**Figura 9**). Existen además muchos organismos cuyo tiol de baja masa molecular que actúa como *buffer* redox no ha sido identificado aún (Van Laer, K. y col. 2013).

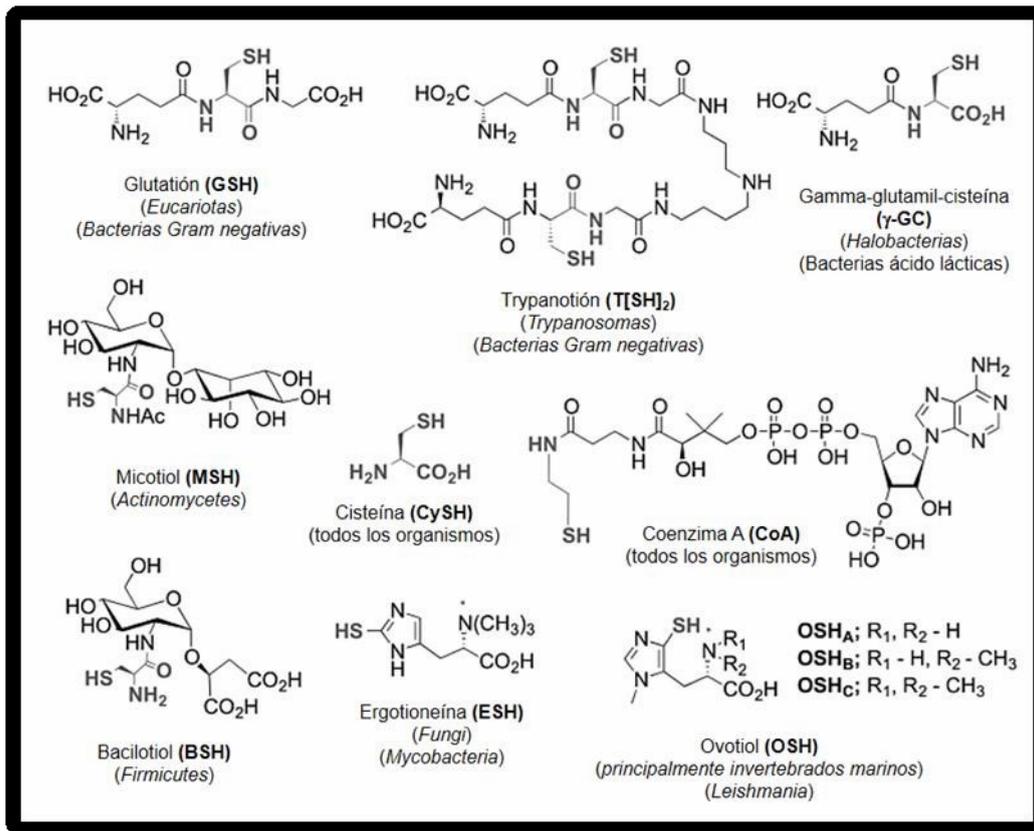


Figura 9 | Tioles de baja masa molecular presentes en diferentes organismos. Los motivos tiol de todos esos *buffer* redox se originan a partir de cisteína (negrita). Imagen tomada de Van Laer, K. y col. (2013)

1.3.1.1. C.2. Glutamato cisteína ligasa

La glutamato cisteína ligasa (GCL) cataliza la primera etapa en la síntesis de GSH, la cual es el paso limitante para su síntesis. La enzima exhibe requerimiento absoluto de Mg^{2+} o Mn^{2+} para catalizar esa reacción. Según lo reportado, la especificidad de sustrato para la GCL de *Escherichia coli* (*E. coli*) depende de los iones metálicos divalentes presentes, sugiriendo que los mismos tienen un papel importante en la unión de aminoácidos sustratos e inhibidores, además de su función en el enlace con el ATP (Davis, J.S. y col. 1973; Kelly, B.S. y col. 2002). El mecanismo catalítico propuesto para la misma procede vía fosforilación del carboxilato- γ del glutamato por ATP. Luego, el grupo amino de la Cys ejerce un ataque nucleofílico hacia el γ -glutamil-fosfato intermediario para generar γ -glutamilcisteína (γ -GC).

El nivel celular de GSH es controlado a través de una inhibición tipo *feed-back* que éste ejerce sobre la GCL, esto podría tener un significado fisiológico consistente con el rol del GSH en la protección de las células frente a agentes tóxicos. La γ -GC es otro potente inhibidor de la GS, debido a la formación de la forma oxidada,

bis- γ -glutamilcisteína (Apontoweil, P. y col. 1975). Por otro lado, si bien el GSH inhibe a la GCL, no presenta efecto inhibitorio sobre la GS, contrariamente el GSSG sí inhibe a ésta última. Por lo tanto, esto señala la posible implicancia del grupo sulfidrilo de ambos tioles de baja masa molecular en el mecanismo de inhibición de la GCL (Richman, P.G. y col. 1975; Apontoweil, P. y col. 1975a).

La GCL procariota es monomérica y posee una masa molecular de ~58 kDa, a diferencia de las eucariotas que son heterodiméricas, compuestas por una subunidad catalítica de ~70 kDa (GCLC) y una subunidad modificadora de ~30 kDa (GCLM) las cuales son expresadas a partir de genes diferentes. Pese a sus diferencias estructurales, la GCL de *E. coli* y la de riñón de rata no sólo tienen valores similares de K_m , números de *turnover* y especificidad de sustrato, sino que también ambas son inhibidas por GSH. Esto se debe a que ambas presentan conservados los sitios de unión a sustrato, así como también sus sitios de unión a metal (Hang, C.S. y col. 1987; Hibi, T. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2004; Franklin, C.C. y col. 2009). En eucariotas la actividad GCL ha sido regulada por modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, fosforilación, miristoilación, clivaje mediado por caspasa, y más drásticamente por estrés oxidativo. Los nucleótidos de piridina también modulan la actividad GCL en algunas especies (Davis, J.S. y col. 1973; Franklin, C.C. y col. 2009; Krejsa, C.M. y col. 2010).

Algunos organismos procariotas, tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida* emplean una enzima bifuncional, que posee ambas actividades, GS y GCL. Ésta es codificada por un único gen (*gshF*). La proteína presenta un dominio GCL hacia su extremo N-terminal, mientras que a su extremo C-terminal presenta un dominio ATP-grasp, el cual es homólogo a la D-Ala-Ala-ligasa de *E. coli*, pero posee baja identidad con la GS de *E. coli*. Sin embargo, este último dominio se considera el responsable en la síntesis de GSH. Este hecho ha sido puesto de manifiesto a partir de la generación de una mutante del mismo en *L. monocytogenes*, la cual perdió su capacidad de síntesis de GSH pero no de γ -GC. Tal como se mencionó previamente, el GSH es un potente inhibidor no alostérico de eucariotas y procariotas GCL monofuncionales pero por el contrario ejerce un efecto poco marcado sobre la enzima bifuncional (Gopal, S. y col. 2005; Janowiak, B.E. y col. 2005; Li, W. y col. 2011).

La bis- γ -glutamilcistina reductase (GCR) es una proteína que cataliza una reacción similar a la GR. Tal como se mencionó anteriormente, la γ -GC es el mayor tiorintracelular en halobacterias y para mantener éste en su estado reducido, algunos

organismos dentro del clado de *Halobacterium* requieren la GCR para tal función. Sin embargo, algunas halobacterias carecen de GCR, sugiriendo una diversidad con respecto a los mecanismos para mantener el estado redox del citoplasma y su protección contra el daño oxidativo (Kim, J. y col. 2013).

1.3.1.1. C.3. Glutarredoxinas

Las glutarredoxinas (Grxs) son proteínas pequeñas que fueron descubiertas en 1976 por Arne Holmgren. Son glutatión dependiente tiol-disulfuro oxidorreductasas y se hallan presentes en todos los organismos, desde bacterias hasta el hombre. Estas proteínas catalizan una variedad de reacciones de intercambio tiol-disulfuro, incluyendo la reducción de proteínas disulfuro, así como también la glutationilación y deglutationilación de proteínas. Estructuralmente pertenecen a la familia de las Trx y se caracterizan por un plegamiento de cuatro láminas β rodeadas por tres α -hélices. Hacia su extremo N-terminal, se encuentran los residuos aminoacídicos del sitio activo (CXXC o CXXS), en un *loop* que conecta la lámina- β 1 y la hélice- α 1 (Pan, J.L. y col. 2006; Lillig, C.H. y col. 2008; Collet, J.F. y col. 2010).

Según los residuos de Cys que componen su sitio activo, las Grxs se clasifican en monotiólicas (1CGrx, un residuo de Cys, CGFS) o ditiólicas (2CGrx, dos residuos de Cys, CPY/FC). Estas proteínas presentan en consecuencia, dos mecanismos catalíticos diferentes. En el mecanismo de reacción ditiólico, las Grxs, que funcionan de un modo similar a las Trx, en una primera instancia producen un ataque nucleofílico a través de la Cys N-terminal de su sitio activo al puente disulfuro de la proteína blanco. Posteriormente, el disulfuro intermediario es reducido por la segunda Cys del sitio activo. De esta manera la proteína blanco es reducida y como resultante se forma un puente disulfuro intramolecular entre las Cys del sitio catalítico. Finalmente, se requieren dos moléculas de GSH para regenerar la Grx a su forma reducida, y en este proceso se genera GSSG. A diferencia del mecanismo ditiólico, en el mecanismo monotiólico, las Grxs catalizan la reducción de proteínas generalmente glutationiladas. En el primer paso, la Cys de su sitio activo ataca el motivo GSH de la proteína glutationilada, liberándose la proteína reducida y un disulfuro mixto intermediario (formado entre la Grx y el GSH). Luego, al igual que en el mecanismo ditiólico una molécula de GSH actúa como dador de equivalentes de reducción, recuperándose la Grx reducida y liberándose el GSSG. Tanto en el mecanismo monotiólico como

ditiólico se regenera el GSH a expensas de NADPH, en una reacción catalizada en mayoría de los organismos, por la GR (Lillig, C.H. y col. 2008) (**Figura 10**).

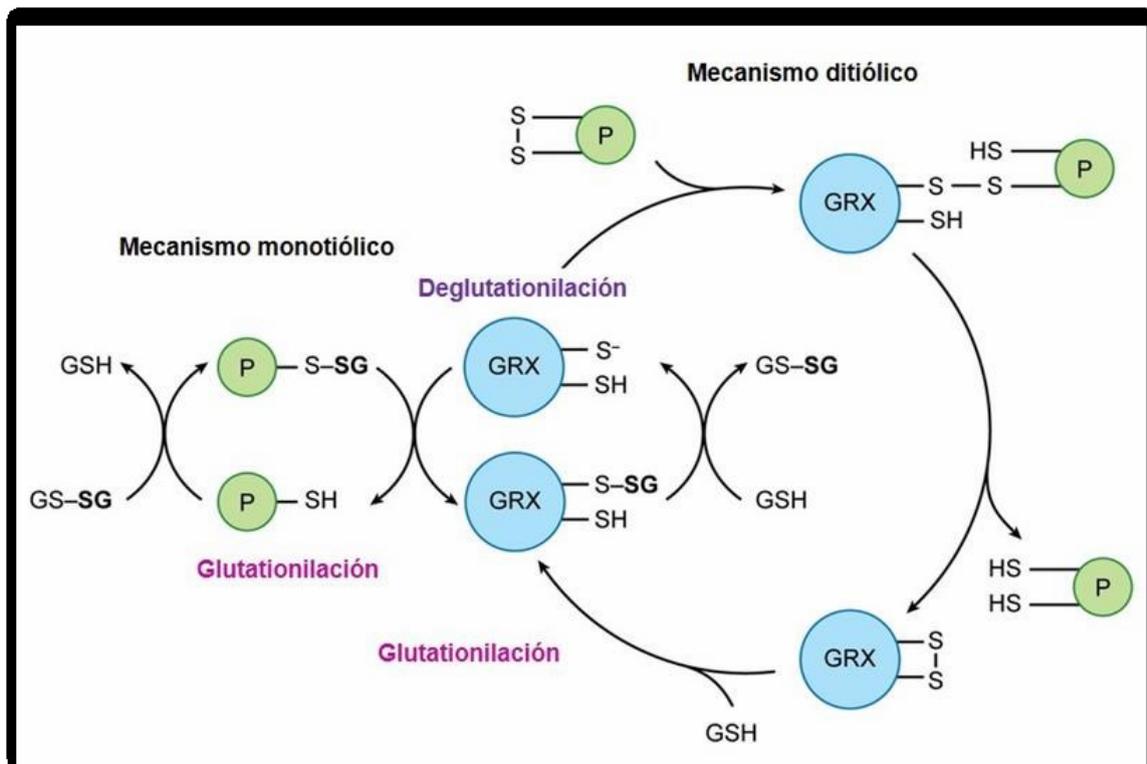


Figura 10 | Mecanismos catalíticos de las Grxs. La Grx puede reducir puentes disulfuros o aductos de la proteína con GSH en presencia de dos moléculas de GSH. Estas reacciones tienen diferentes mecanismos. En el mecanismo ditiólico, dos grupos tiol de las Grxs son necesarios y se forma un enlace disulfuro intramolecular entre las dos Cys de sitio activo, el cual posteriormente es reducido por el GSH. El mecanismo monotiólico involucra reacciones de deglutationilación, y sólo una Cys del sitio activo es generalmente necesaria para reducir el disulfuro mixto entre la proteína diana y el GSH. La forma glutationilada de la Grx es regenerada por otra molécula de GSH. Imagen adaptada de Rouhier, N. y col. (2008).

Las 1CGrx según el número de dominios que presenten se pueden clasificar en: i) 1CGrxs monodominio, que como su nombre lo indica contienen un solo dominio Grx, como por ejemplo Grx5 de *Sacharomyces cerevisiae*, y ii) las 1CGrx multidominio, las cuales poseen un dominio Trx hacia su extremo N-terminal, y uno a tres dominios Grx hacia su extremo C-terminal, a este arreglo de dominios se los denomina del tipo PICOT (*protein kinase C interacting cousin of thioredoxin*), tal es el caso de la Grx3 humana (Lillig, C.H. y col. 2005).

En general las Grxs monotiólicas (como las de E.coli, levaduras y vertebrados, incluyendo el hombre) no muestran actividad oxidoreductasa aunque cumplen funciones cruciales en la biogénesis de los centros de [Fe-S], y en la regulación de la

homeostasis del Fe. Recientemente, algunas Grx ditiólicas también han sido descritas como proteínas Fe-S, entre ellas la Grx2 de humanos (con un sitio activo CSTC). Por el contrario, otros miembros de la familia Trx que contienen en su sitio activo CXXC un residuo cis-prolina (como la Grx1 de humanos que presenta el sitio CPTC) no presentan capacidad de unir centros [Fe-S]. (Herrero, E. y col. 2007; Marquez, V.E. y col. 2014).

Además de su función en la homeostasis de Fe, otras funciones se le han asignado a las Grx, tales como, ceder electrones en la síntesis de desoxirribonucleótidos dependiente de GSH por acción de la enzima ribonucleótido reductasa; reparar proteínas dañadas por oxidación mediante la reducción de disulfuros o glutationilación de proteínas. Éste es un proceso que permite regular la actividad de proteínas importantes en diferentes vías metabólicas (Herrero, E. y col. 2007).

1.3.1.1. C.3.i. Funciones de los centros [Fe-S]

Como fue mencionado más arriba, en los comienzos de la vida en la Tierra las condiciones anaeróbicas proveían un ambiente reductor donde el Fe^{+2} y el S^0 se encontraban fácilmente disponibles para los organismos vivos. De esta manera, surgieron proteínas con estructuras Fe y S que catalizaban una variedad de reacciones celulares. Actualmente los centros [Fe-S] continúan jugando un papel importante como grupo prostético de amplio número de enzimas en todos los reinos biológicos (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013).

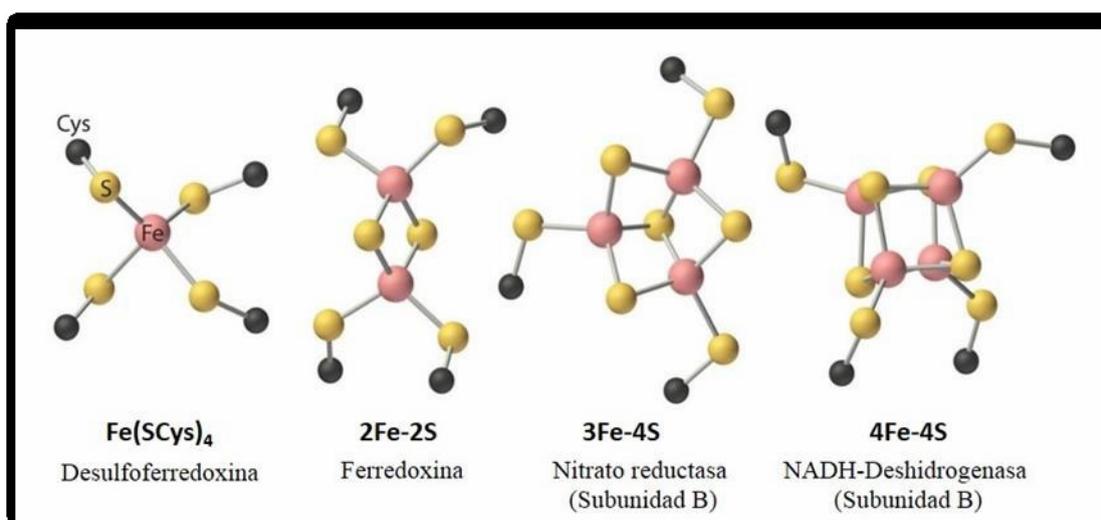


Figura 11 | Ejemplos de proteínas que presentan diferentes tipos de centros [Fe-S].

Las características fisicoquímicas únicas de los centros [Fe-S] les confiere a las proteínas la capacidad de intervenir en una diversidad de procesos celulares tanto en organismos procariontes como eucariotes. En primer lugar, los centros de [Fe-S] median la transferencia de electrones gracias a su capacidad de alcanzar una amplia variedad de estados de reducción (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013). Esta propiedad es muy utilizada en las cadenas de transporte de electrones de los complejos fotosintéticos o respiratorios (Jang, S. 2010). En segundo lugar, los centros [Fe-S] participan en la catálisis redox porque alcanzan potenciales de reducción muy bajos, aunque también pueden intervenir en la catálisis no redox actuando como ácido de Lewis. Algunas de las enzimas que actúan como ácidos de Lewis son las deshidratasas: aconitasa, fumarasa, isopropilmalto isomerasa y dihidroxiácido deshidratasa entre otras enzimas redox (Jang, S. 2010) (**Figura 11**). Por último, los centros [Fe-S] pueden actuar como sensores de las condiciones ambientales y además, pueden participar en la estabilización de estructuras proteicas. Como los centros [Fe-S] son susceptibles a la oxidación y a las limitaciones de Fe, proteínas con centros [Fe-S] en su estructura como IRP-1 de células de mamíferos utilizan esta propiedad para regular las concentraciones de Fe intracelular (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013).

1.3.1.1. C.3.ii. Sistemas de ensamblaje de los centros [Fe-S]

Hasta el momento, se lograron distinguir 4 tipos de maquinarias de ensamblado de los centros [Fe-S]: *nitrogen fixation* (NIF), *iron sulfur cluster* (ISC), *sulfur mobilization system* (SUF) y *cytosolic iron-sulphur cluster assembly* (CIA) (Bandyopadhyay, S. y col. 2013). El sistema NIF es específico para la maduración de proteínas Fe-S en organismos que fijan nitrógeno tales como *Azotobacter vinelandii*, aunque también se ha encontrado en los cloroplastos de las plantas. El sistema ISC es el sistema principal para biosíntesis de los centros [Fe-S] en bacterias tanto en *E. coli* y *A. vinelandii* (**Figura 12**) (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013). En organismos eucariotes la maquinaria mitocondrial de biosíntesis de centros [Fe-S] pertenece al sistema ISC con algunos componentes adicionales. Esto se atribuye a la hipótesis que el sistema mitocondrial ISC en células eucariotes es inherente al origen de las mitocondrias producto de la endosimbiosis de un ancestro bacteriano (Muhlenhoff, U. y col. 2010; Ali, V. y col. 2013). El tercer sistema de ensamblado de los centros [Fe-S] denominado SUF, juega un rol similar al ISC, pero opera en bajas concentraciones de Fe intracelular o estrés oxidativo (Lill, R. 2009; Ali, V. y col. 2013; Bandyopadhyay, S. y

col. 2013). Los encargados de regular y coordinar la expresión de los genes de los operones *isc* y *suf* son los represores transcripcionales IscR y Fur respectivamente (Bandyopadhyay, S. y col. 2013) (Jang, S. 2010). Por último, el sistema CIA está localizado en el núcleo y citoplasma de la mayoría de las células eucariotas y es requerido para la maduración de proteínas citoplasmáticas y nucleares con centros [Fe-S] (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013).

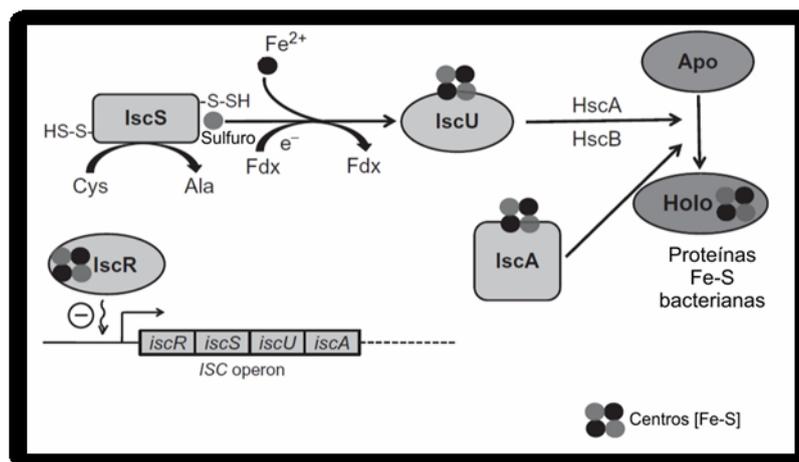


Figura 12 | Sistema de ensamblaje ISC bacteriano. IscS, desulfurasa; IscU y IscA, proteínas de andamio; Fdx, ferredoxina; HscA/HscB, chaperonas y IscR, represor del operón *iscRSUA-hscBA-fdx*. Imagen tomada de Ali, V. y col. (2013)

En cada uno de los sistemas de biogénesis de centros [Fe-S] prevalece un mecanismo que involucra una cisteína desulfurasa (NifS, IscS, SufS), una proteína andamio del Tipo U como por ejemplo: NifU, IscU o SufU, que actúa como plataforma donde se ensamblan las estructuras correspondientes a los centros [Fe-S] y su posterior transferencia de los mismos a las apoproteínas. Además existen otras proteínas accesorias tales como las 1CGrxs encargadas del ensamblado, almacenamiento o transferencia de los centros [Fe-S]. Cabe destacar que las desulfurasas en todos los sistemas de ensamblado están involucradas en la donación de S/sulfuro (S²⁻). Esta enzima cataliza la reacción de desulfuración de la Cys, obtiene S⁰ o S⁻² a partir de la L-Cys con la seguida producción de L-Ala y liberación de pirofosfato de piridoxal (Jang, S. 2010; Ali, V. y col. 2013).

1.3.1.1. C.3.iii. Rol de las Grxs en el metabolismo del Fe y su relación con los centros [Fe-S]

El Fe es un elemento esencial para la vida, formando parte de los centros [Fe-S] y hemoproteínas. Sin embargo, el Fe libre en las células cataliza la reacción de Fenton

generando radical hidroxilo a partir de peróxidos. Estas ERO, como se mencionó previamente, producen daños nivel celular, por lo tanto las células han desarrollado mecanismos de control y regulación de las concentraciones del Fe libre intracelular (Muhlenhoff, U. y col. 2010). Varios estudios desde el 2002 en adelante indican que las Grxs son capaces de unir centros de [Fe-S]. En general las 1CGrxs, no muestran actividad oxidorreductasa aunque si son capaces de unir centros [Fe-S] y están involucradas en procesos celulares relacionados a la homeostasis de Fe intracelular (Couturier, J. y col. 2015).

Hasta la actualidad sólo se logró obtener 5 estructuras cristalinas de las Grxs unidas a los centros [Fe-S], dos tipos 1CGrxs [glutarredoxina 5 de células humanas (*HsaGrx5*), glutarredoxina 4 de *E. coli* (*EcoGrx4*)] y 3 tipos de las 2CGrxs [glutarredoxina 1 de *Populus trichocarpa* (*PtrGrx-C1*), glutarredoxina 5 de *Arabidopsis thaliana* (*AthGrxC5*) y glutarredoxina 2 de células humanas (*HsGrx2*)]. En cualquiera de estas estructuras, el centro [2Fe-2S] tenía dos monómeros de Grxs y cada átomo de Fe es coordinado por 4 átomos de S, dos S inorgánicos del centro [Fe-S], un S de las Cys del sitio activo N-terminal de las Grx y por ultimo un S del tiol GSH, sin embargo, no todas las estructuras holoproteicas de las Grxs son dímeros (**Figura 13**) (Couturier, J. y col. 2015).

El análisis estructural demostró que la formación del holodímero de Grxs requiere un arreglo conformacional local afectado principalmente por los residuos en el sitio activo, además de una estructura flexible para la unión del centro [Fe-S] así como también una interacción con GSH. Finalmente, estos cambios y las diferentes orientaciones de las subunidades de las Grxs en el dímero holoproteico formado, favorece a que los centros [Fe-S] estén más expuestos al solvente en las 1CGrxs que en las 2CGrxs. De esta manera los centros [Fe-S] adquieren diferentes estabildades en las 1CGrxs y 2CGrxs, lo que puede explicar las diferentes funciones atribuidas a estas proteínas. Las 1CGrxs son encargadas principalmente en la transferencia de centros [Fe-S] mientras que las 2CGrxs actúan como señales de la degradación oxidativa por la destrucción u oxidación de los centros [Fe-S] contenidas en las mismas (Couturier, J. y col. 2015).

En los centros de [Fe-S] ensamblados en 2CGrxs, generalmente el residuo de Pro en los sitios activos convencionales (CPYC o CPFC) desfavorece la presencia del centro [Fe-S], mientras que la presencia de Gly o Ser es suficiente para la incorporación del centro de [Fe-S]. Aunque existen otros factores, se ha observado que la glutarredoxina

ditiólica 2 de *T. brucei* (*TbrGrx2*) y la glutarredoxina 2 del pez cebra (*ZfiGrx2*) son capaces de unir los centros [Fe-S] a pesar de que poseen el sitio activo CPYC. Estudios de mutagénesis sitio dirigida en 2CGrxs de plantas mostraron además la importancia de las posiciones -1 y +3 del sitio activo para unión del centro [Fe-S] (Couturier, J. y col. 2015).

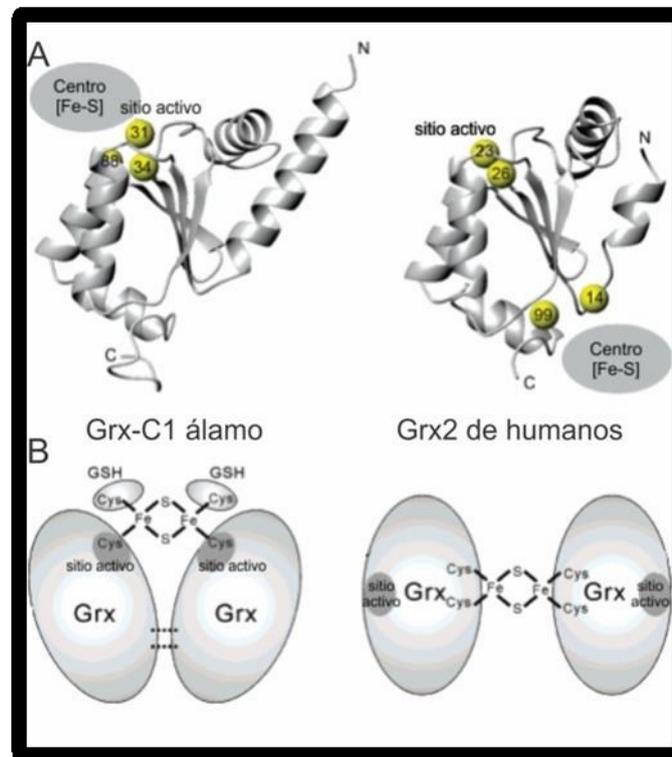


Figura 13 | Comparación de las holoformas de 1CGrx de álamo (*PtrGrxC1*) y Grx2 de células humanas (*HsaGrx2*). A. Localización de los centros [Fe-S] en *PtrGrxC1* y *HsaGrx2*. La estructura de Grx2 de humanos fue obtenida por modelado por homología. Los átomos de S de las Cys se muestran en esferas amarillas marcando el número del residuo. B. Ilustraciones de los patrones de coordinación de los centros de [Fe-S] de la holoproteína de *PtrGrxC1* y *HsaGrx2*. Imagen adaptada de Feng, Y. y col. (2006).

Las 2CGrxs se postulan como sensores redox, unos de los primeros casos fue el de la *HsaGrx2*, la cual en condiciones normales coordina en forma dimérica al centro [Fe-S] en presencia de GSH y en esta forma holoproteica su actividad oxidorreductasa se ve inhibida. Frente a condiciones de estrés oxidativo el centro [Fe-S] se destruye y ahora la apoproteína es activa (Couturier, J. y col. 2015). Estudios recientes sugieren el posible rol de las 1CGrxs en el proceso posterior a la síntesis de los centros [Fe-S], como proteínas *delivery* de estos centros a apoproteínas blanco. Por ejemplo, las mutantes en *SceGrx5* (1CGrx) son más sensibles al estrés oxidativo y tienden a acumular Fe intracelular; además ensayos de inmunoprecipitación usando ^{55}Fe marcado radiactivamente mostraron una acumulación de Fe en las IscU haciendo referencia al

papel de esta 1CGrxs monodominio en la transferencia de los centros [Fe-S] desde las proteínas andamio a las proteínas aceptoras. Las 1CGrxs monodominio se encuentran ampliamente distribuidas en todos los reinos tanto en eucariotas y procariotas, en mayoría de los casos son capaces de recuperar el fenotipo mutante $\Delta grx5$ en levaduras, sugiriendo una conservación funcional de las mismas. En resumen, la Grx5 es un miembro del sistema mitocondrial de ensamblado ISC y su delección afecta la transferencia de los centros [Fe-S] a ciertas proteínas como por ejemplo aconitasa, succinato deshidrogenasa, lipoato sintasa (Lillig, C.H. y col. 2008; Bandyopadhyay, S. y col. 2013; Couturier, J. y col. 2015). Otro rol propuesto para las 1CGrxs monodominio es en la reparación de centros [Fe-S], ya que se ha observado que la *SceGrx5* tiene la habilidad de incorporar centros [3Fe-4S] sólo cuando los extractos celulares se encuentran en condiciones aeróbicas, lo que sugiere la posibilidad que *SceGrx5* podría reciclar centros [Fe-S] a partir de proteínas dañadas. Esto es congruente con los efectos dañinos observados de la acumulación de Fe intracelular en las mutantes $\Delta grx5$ en levaduras. Alternativamente, las 1CGrxs multidominio tienen implicancias en el transporte de Fe y en la regulación de factores de transcripción asociados con la homeostasis celular de Fe (Aft1/2 y Yap5). Aft1/2 están involucrados en la respuesta déficit de Fe intracelular activando una serie de genes que codifican proteínas relacionados al consumo y metabolismo del Fe intracelular (Couturier, J. y col. 2015).

1.3.1.1. D. Los sistemas antioxidantes como mediadores en modificaciones post-traduccionales de proteínas.

1.3.1.1. D.1. S-tiolación

Durante la respiración aeróbica o la infección en el huésped, las bacterias encuentran una variedad de especies reactivas, las mismas causan diferentes modificaciones post-traduccionales en distintas macromoléculas, en este trabajo nos centraremos en aquellas que ocurren a nivel de proteínas. Entre estas modificaciones post-traduccionales, se encuentra la S-tiolación, la cual es el resultado de la formación de disulfuros mixtos entre los tioles de baja masa molecular y proteínas tioles (S-cisteinilación, S-glutationilación, S-micotiolación, S-bacilotiación). Éste es un mecanismo redox regulatorio que controla la actividad de factores de transcripción y protege proteínas-tioles de su oxidación irreversible a ácido sulfínico (R-SO₂H) y sulfónico (R-SO₃H) (Zaffagnini, M. y col. 2012). Esto último es particularmente importante para las proteínas esenciales y abundantes, cuya sobreoxidación conduciría

a la pérdida de la viabilidad celular y se requeriría de nueva síntesis de proteínas para reemplazar proteínas inactivadas (Jonsson, T.J. y col. 2005).

En eucariotas y bacterias Gram-negativas incluyendo, *E.coli*, *S. Typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, la S-glutationilación de proteínas es el mayor mecanismo redox regulatorio. Según lo reportado debe cumplir varios criterios para ello, además de ser inducido por ERs y proteger la función y actividad de proteínas, éste debe ser un proceso reversible y específico. La S-glutationilación de proteínas puede ser revertida vía reacciones de intercambio tiol-disulfuro mediadas enzimáticamente, una vez que el balance redox intracelular ha sido reestablecido. Entre las enzimas capaces de reducir proteínas S-glutationiladas (deglutationilar) se incluyen el sistema dependiente de GSH y Trx. Respecto a la especificidad, no todos los tioles en las proteínas son susceptibles a la oxidación. Varios son los factores implicados en la susceptibilidad, siendo los dos más importantes la accesibilidad al tiol y su reactividad, relacionada con el pKa y a su vez con los residuos circundantes a nivel de la estructura secundaria (Dalle-Donne, I. y col. 2007; Dalle-Donne, I. y col. 2009; Loi, V.V. y col. 2015).

1.3.1.1. D.2. S-nitrosilación

Tal como se indicó más arriba, la S-nitrosilación (o nitración) es el acoplamiento de un grupo de óxido nítrico (NO) al grupo tiol de la Cys, en un péptido o proteína, para formar un nitrosotiol (SNO). Este proceso puede llevarse a cabo mediante reacciones de transnitrosilación, o a través de reacciones catalizadas por metaloproteínas (por ejemplo, hemoglobina). En los últimos años se ha hecho evidente que la S-nitrosilación de residuos de Cys importantes en ciertas proteínas regula una multitud de procesos celulares, incluyendo señalización, metabolismo y las respuestas de estrés (Hess, D.T. y col. 2005). De modo similar a la S-tiolación, la S-nitrosilación, ha surgido como una importante modificación post-traduccional de proteínas, reversible y específica. En otras palabras, no todos los residuos de Cys serán susceptibles a nitrosilarse, sino aquellos que generan un entorno favorable para la interacción con la molécula donante de NO, y aquellos que tengan un pKa ácido. La reversibilidad, por otro lado, solidifica su importancia como mecanismo regulatorio, e implica la identificación de denitrosilasas específicas (capaces de eliminar NO de una proteína S-nitrosilada) o transnitrosilasas (capaces de donar NO a una proteína aceptora) (Anand, P. y col. 2012; Gould, N. y col. 2013). Se han identificado varios sistemas enzimáticos capaces de catabolizar (denitrosilar) S-nitrosotioles *in vitro*. Estos incluyen

a: xantina oxidasa, Trx, glutamil- transpeptidasa, GPx, superóxido dismutasa (SOD) y formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión o alcohol deshidrogenasa (Anand, P. y col. 2012).

1.3.2. Sistema de eliminación de EROs

1.3.2.1. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx, también llamadas tiorredoxin-peroxidasa o alquilhidroperóxido reductasas) son una familia ubicua de enzimas antioxidantes, que catalizan la reducción de H_2O_2 , hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y ONOO⁻. Además de esta función, están involucradas en vías de proliferación, diferenciación y apoptosis celular, participando como reguladoras de las ERO/ERN que operan como moléculas señalizadoras. Una o más isoformas son expresadas en altos niveles en muchos tipos celulares. Aunque son de localización citoplasmática en su mayoría, se las ha encontrado también en mitocondrias, peroxisomas, cloroplastos, asociados al núcleo y con membranas, y al menos en un caso, son exportadas (Wood, Z.A. y col. 2003a; Banerjee, R. 2008; Rhee, S.G. y col. 2011).

Todas las Prx catalizan de igual modo el primer paso en la reducción de peróxidos, en el cual la Cys peroxidática (Cys-S_PH) ataca el peróxido oxidándose a ácido sulfénico (Cys-S_POH). El segundo paso, el reciclado de esta Cys oxidada a su forma reducida es en lo que se diferencian los tres tipos de Prx existentes (2CysPrx típica, 2CysPrx atípica y 1CysPrx). La mayoría de las Prx poseen una segunda Cys reactiva, la Cys resolutive (Cys-S_RH), la cual forma un disulfuro intra/intersubunidad con el ácido sulfénico de la cisteína peroxidática (Cys-S_P-S_R-Cys) previo a la completa reducción. En las 2CysPrx típicas la Cys peroxidática y la Cys resolutive se encuentran en subunidades diferentes, con lo cual este tipo de proteína son homodímeros obligados en la generación de una molécula reactiva. Por el contrario, en las 2CysPrx atípicas tanto la Cys peroxidática y la Cys resolutive se encuentran en la misma subunidad, generando un enlace disulfuro intracatenario y, por lo general, estas proteínas se encuentran como monómeros activos. Finalmente, las 1CysPrx carecen de la Cys resolutive, y por lo tanto no parecería ser esencial la formación de un enlace disulfuro previa completa reducción. Todas las 2CysPrx parecen ser reducidas por proteínas tipo Trx o algún otra redoxina que presente el motivo CXXC tipo Trx (por ejemplo, AhpF en bacterias, triparedoxinas en tripanosomátidos, etc.) y una

flavoproteína piridina nucleótido disulfuro reductasa, que regenere a la anterior. El mecanismo preciso de regeneración de las 1CysPrx no se encuentra completamente claro aún (Wood, Z.A. y col. 2003a; Parsonage, D. y col. 2008; Aran, M. y col. 2009; Rhee, S.G. y col. 2011) (**Figura 14**).

Las 2CysPrx y las 1CysPrx pueden existir como dímeros o decámeros en solución y en estructuras cristalinas. Las propiedades oligoméricas de las Prx se ven influidas por factores como la fuerza iónica, pH, la presencia de Mg^{2+} o Ca^{2+} , y/o el estado redox. El estado de oligomerización en sí mismo puede actuar como un mecanismo de regulación de la propia actividad de la Prx. Estos oligómeros pueden presentar actividad chaperona, y prevenir en tanto el mal plegado o no plegado de proteínas bajo condiciones de estrés (Matsumura, T. y col. 2008; Kim, S.Y. y col. 2009).

Se ha demostrado que la actividad de las Prx puede ser regulada por fosforilación, por proteólisis, por glutationilación, por nitrosilación, pero principalmente por la hiperoxidación de la Cys peroxidática durante la primera etapa de reducción de peróxidos. Esta hiperoxidación, comúnmente en Prx eucariotas, da como resultado la generación de $R-S_P O_2 H$ el cual no puede ser resuelto por la Cys reolutiva (en el caso de las 2CysPrx) o reducirse por tioles de baja masa molecular o por proteínas que contienen el clásico motivo redox CXXC, por el contrario se han identificado unas proteínas llamadas sulfurredoxinas (Srx) (cuyas características se especificarán más adelante) y las sestrinas, las cuales catalizan la reducción dependiente de ATP del $R S_P O_2 H$, volviéndolo a $R-S_P OH$, siguiendo con el ciclo catalítico normal de las Prx. Se ha reportado que existen motivos estructurales responsables de esta sobreoxidación tanto en eucariotas como en algunas bacterias, entre ellas *L. interrogans*. El motivo GGLG en el centro de la secuencia aminoacídica y el motivo YF que forma parte de una hélice adicional hacia el extremo C-terminal, las cuales sería responsables de retrasar la formación del enlace disulfuro, permitiendo que el Cys- $S_P OH$ permanezca por más tiempo expuesto para actuar con una segunda molécula de peróxido (Jang, H.H. y col. 2004; Jang, H.H. y col. 2006; Aran, M. y col. 2008; Hall, A. y col. 2009).

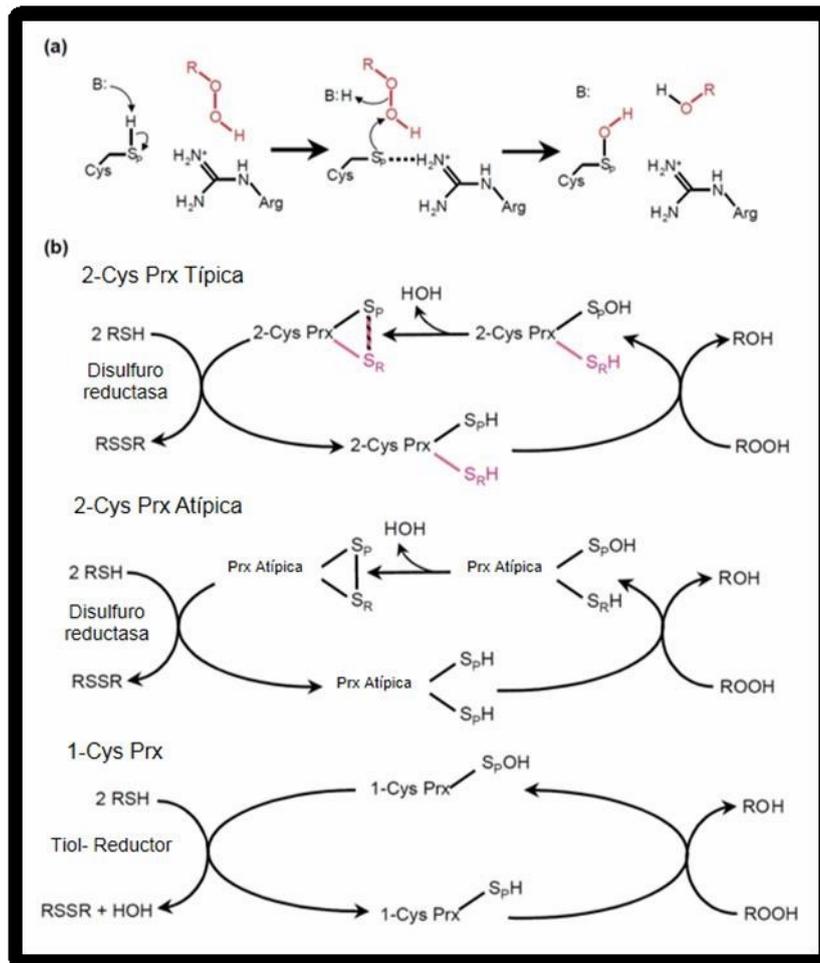


Figura 14 | Mecanismo de las Prxs. (a) El primer paso de reducción del peróxido involucra el ataque nucleofílico por la Cys peroxidática (S_P) y la formación de un ácido sulfénico intermedio ($S_P\text{OH}$), y es compartido por todas las Prxs. (b) Luego, tres mecanismos distinguen las clases de Prxs. En el caso de las 2-Cys Prx diméricas, la Cys peroxidática (S_P negra) y la Cys resolutive (S_R rosa), provenientes de diferentes subunidades se condensan para formar un puente disulfuro intermolecular (barra de rayas negro y rosa). La reducción de las 2-Cys Prx típica y atípica involucra una flavoproteína disulfuro reductasa y al menos una proteína adicional conteniendo el motivo CXXC, el cual es oxidado del estado de ditiol a disulfuro durante la reducción de la Prx (por ejemplo: tioredoxina reductasa y tioredoxina; AhpF, tripanotión reductasa, tripanotión y triparredoxina o Lipoamida deshidrogenasa, SucB y AhpD. Los reductores de la 1-Cys Prxs incluyen tioles de baja masa molecular, pero los *partners* fisiológicos no se han identificado aún (Wood, Z.A. y col. 2003a). Imagen tomada de Wood, Z.A. y col. (2003a).

1.3.2.2. Catalasa

La catalasa es una enzima que está ampliamente distribuida entre los organismos aerobios, principalmente en algunas bacterias, animales y plantas. La naturaleza de su cofactor permite clasificarlas en hemo y no-hemo (o manganeso) catalasa. Todas las hemo-catalasas catalizan la típica reacción de desproporción del H_2O_2 a O_2 y H_2O , mientras que algunas exhiben una actividad peroxidasa adicional, es decir reducen el H_2O_2 en presencia de un sustrato reductor. Por lo tanto, existen catalasas

monofuncionales (o simplemente, catalasa) y catalasas bifuncionales (o catalasas-peroxidasas). Estas últimas son menos abundantes y se hallan presentes por ejemplo en *Mycobacterium tuberculosis* y *Synechococcus*. (Forman, H.J. y col. 2004; Banerjee, R. 2008).

Para todas las hemo-catalasas el mecanismo de reacción incluye dos pasos. En el primer paso, el Fe^{3+} del grupo hemo reduce al H_2O_2 , liberando H_2O y formando un radical intermedio, el compuesto I (**Figura 15**). Dos electrones se eliminan del hemo en este proceso, uno del átomo de Fe^{3+} , que se oxida a Fe^{4+} , y el segundo del anillo porfirina del grupo hemo, que adquiere carácter de radical catiónico. En el segundo paso, el compuesto I oxida a una segunda molécula de H_2O_2 y la enzima vuelve a su estado original de Fe^{3+} (Metzler, D.E. y col. 2003; Mishra, S. y col. 2012). Las catalasas-peroxidasas presentan una baja actividad peroxidática (comparada con otras peroxidasas), estas requieren dadores de electrones exógenos. La reducción del compuesto I se realiza en dos pasos secuenciales de a un electrón por vez, y hacia el estado de Por- Fe^{3+} (Mishra, S. y col. 2012; Gasselhuber, B. y col. 2016).

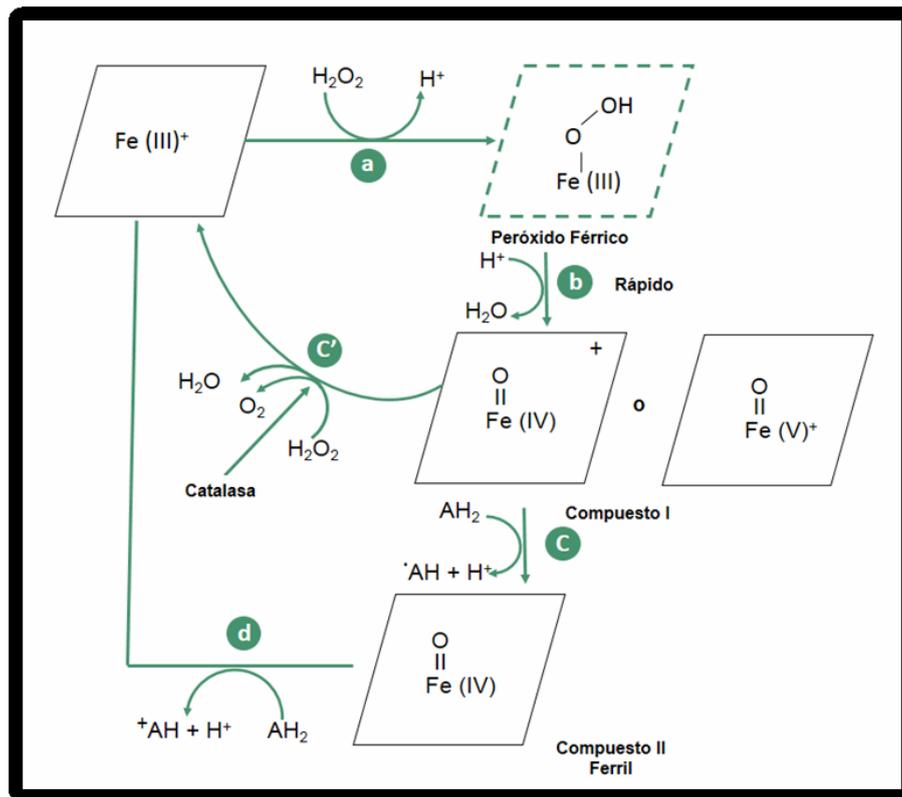
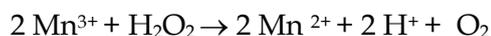
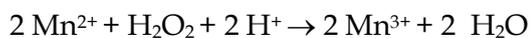


Figura 15| Ciclo catalítico de las hemoperoxidasas y catalasas. El principal ciclo de las peroxidasas es el que corresponde a los pasos a, b, c y d. El de las catalasas es más corto, e incluye los pasos a, b y c' (Metzler, D.E. y col. 2003).

Las manganeso catalasas (o pseudocatalasas) presentan dos átomos de manganeso por cada subunidad, son resistente a la azida y al cianuro. Esta isoenzima

se encuentra exclusivamente en bacterias, y es especialmente común entre cianobacterias. La reacción de la manganeso catalasa, al igual que la de las hemo catalasas se produce en dos pasos (Mishra, S. y col. 2012):



1.3.3. Sistemas de reparación

1.3.3.1. Metionina sulfóxido reductasa

Como se mencionó con anterioridad, ante la situación de estrés oxidativo la oxidación de residuos de Met puede causar daños estructurales y funcionales en las proteínas. La oxidación de Met genera una mezcla de racémica de Met-*R*-sulfóxido [Met(*R*)SO] y Met-*S*-sulfóxido [Met(*S*)SO] (Drazic, A. y col. 2014). En casi todos los organismos existen enzimas capaces de revertir este proceso, las Msrs. Estas enzimas son estereoespecíficas, por lo que actúan solo sobre uno de los isómeros. La MsrA reduce Met(*S*)SO, mientras que la MsrB reduce Met(*R*)SO, ya sea que los residuos de MetSO estén asociados a proteínas o libres (Drazic, A. y col. 2014) (**Figura 16**). En adición, existe un tercer tipo de Msr, la forma libre de Msr (*freeMsr*) la cual fue descubierta recientemente (Arias, D.G. y col. 2008) y cataliza la reducción de Met(*R*)SO libre (no peptídica) (**Figura 16**). Esta última sólo se encuentra presente en organismos unicelulares (Lee, B.C. y col. 2011). En la mayoría de los organismos la MsrA y la MsrB son dos proteínas independientes, mientras que en otros como *Neisseria gonorrhoeae* ambas se hayan presentes como dominios independientes fusionados en una misma proteína (Lowther, W.T. y col. 2002; Etienne, F. y col. 2003). El nivel de expresión de las MsrB es regulado por la concentración de hierro intracelular, mientras que la MsrA se expresa constitutivamente, actuando como “house keeper” a nivel celular. Estas proteínas son en su mayoría de localización citoplasmática, aunque en algunos organismos se las encontrado asociadas a membranas (como algunas bacterias) (Drazic, A. y col. 2014).

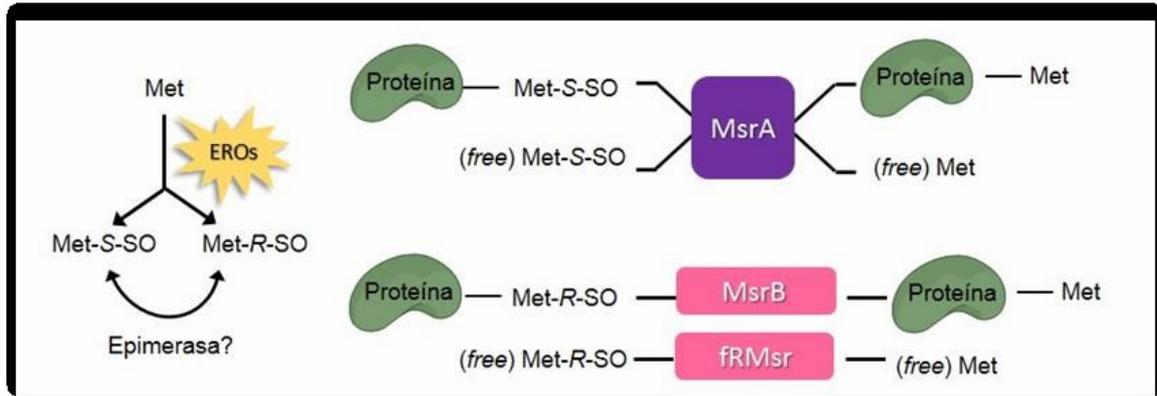


Figura 16 | Estereoespecificidades de las Msrs. La MsrA reduce estereoespecíficamente la Met(S)SO, tanto unida a proteínas como libre. La MsrB reduce estereoespecíficamente la Met(R)SO unida a proteínas. La *free* Met(R)SO puede ser reducida por la *free*Msr y por la MsrB, aunque con muy baja actividad enzimática. Se postula además, la existencia de una epimerasa capaz de convertir Met(S)SO en Met(R)SO y viceversa. Imagen tomada de Drazic, A. y col. (2014).

Las MsrA y MsrB son enzimas monoméricas no estructuralmente relacionadas, presentando diferencias en el plegado, siendo los sitios activos una imagen especular uno de otro. Las MsrB presentan un sitio de unión al metal formado por dos motivos CXXC. El sitio de unión al metal, generalmente Zn^{2+} , está en dirección opuesta al sitio activo y posee un rol estructural en estas proteínas (Moskovitz, J. y col. 2002).

A pesar que estas proteínas no poseen una relación estructural, comparten su mecanismo catalítico aunque con diferentes estereoselectividades. En la primera etapa de su catálisis el tiolato de la Cys catalítica ataca al sulfóxido, generando Met y formando un sulfénico intermediario. En la segunda etapa la Cys resolutive ataca el ácido sulfénico intermediario para formar un disulfuro intramolecular, entre la Cys catalítica y la Cys resolutive con pérdida de una molécula de agua, siendo éste el paso limitante de la velocidad de reacción. Finalmente, en la tercer y última etapa, el disulfuro es reducido por algún donador de electrones (Weissbach, H. y col. 2002; Boschi-Muller, S. y col. 2005; Ezraty, B. y col. 2005) (**Figura 17**). Las MsrA presentan una secuencia conservada GCFW (G/H) en la región N-terminal, en donde se haya la Cys catalítica (Cys-S_CH), en la región C-terminal se haya la Cys resolutive (Cys-S_RH) (Weissbach, H. y col. 2002; Boschi-Muller, S. y col. 2005; Ezraty, B. y col. 2005).

Las MsrA como las MsrB, se han clasificado de acuerdo al mecanismo empleado para la regeneración de la Cys-S_CH (Boschi-Muller, S. y col. 2005; Lee, E.H. y col. 2014), de acuerdo a esto, existen cuatro tipos de MsrA:

- MsrA de 3 Cys (1 Cys-S_CH y 2 Cys-S_RH) presente por ejemplo en *E. coli* y *Bos taurus*;
- MsrA de 2 Cys (1 Cys-S_CH y Cys-S_RH), en *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*;
- MsrA de 1 Cys (sin Cys-S_RH) en *Clostridium*, *Chlamydomonas*, *Synechocystis*;
- MsrA "like-Trx", la Cys-S_CH y Cys-S_RH están presentes en un motivo CFWC del tipo presente en Trx.

Por otro lado existen dos tipos de MsrB:

- MsrB de 2 Cys, de 1 Cys-S_CH hacia el extremo C-terminal y una Cys-S_RH en el extremo N-terminal o en el medio de la secuencia aminoacídica;
- MsrB de 1 Cys (sin Cys-S_RH), este tipo representa aproximadamente el 40% de las MsrB.

El principal reductor fisiológico de las Msrs son las Trx (a excepción de las MsrA de 1 Cys) y las Grx, teniendo estas últimas mayor eficiencia sobre las MsrA de 1 Cys que por las de 3 Cys (Vieira Dos Santos, C. y col. 2007; Kim, H.Y. 2012; Drazic, A. y col. 2014).

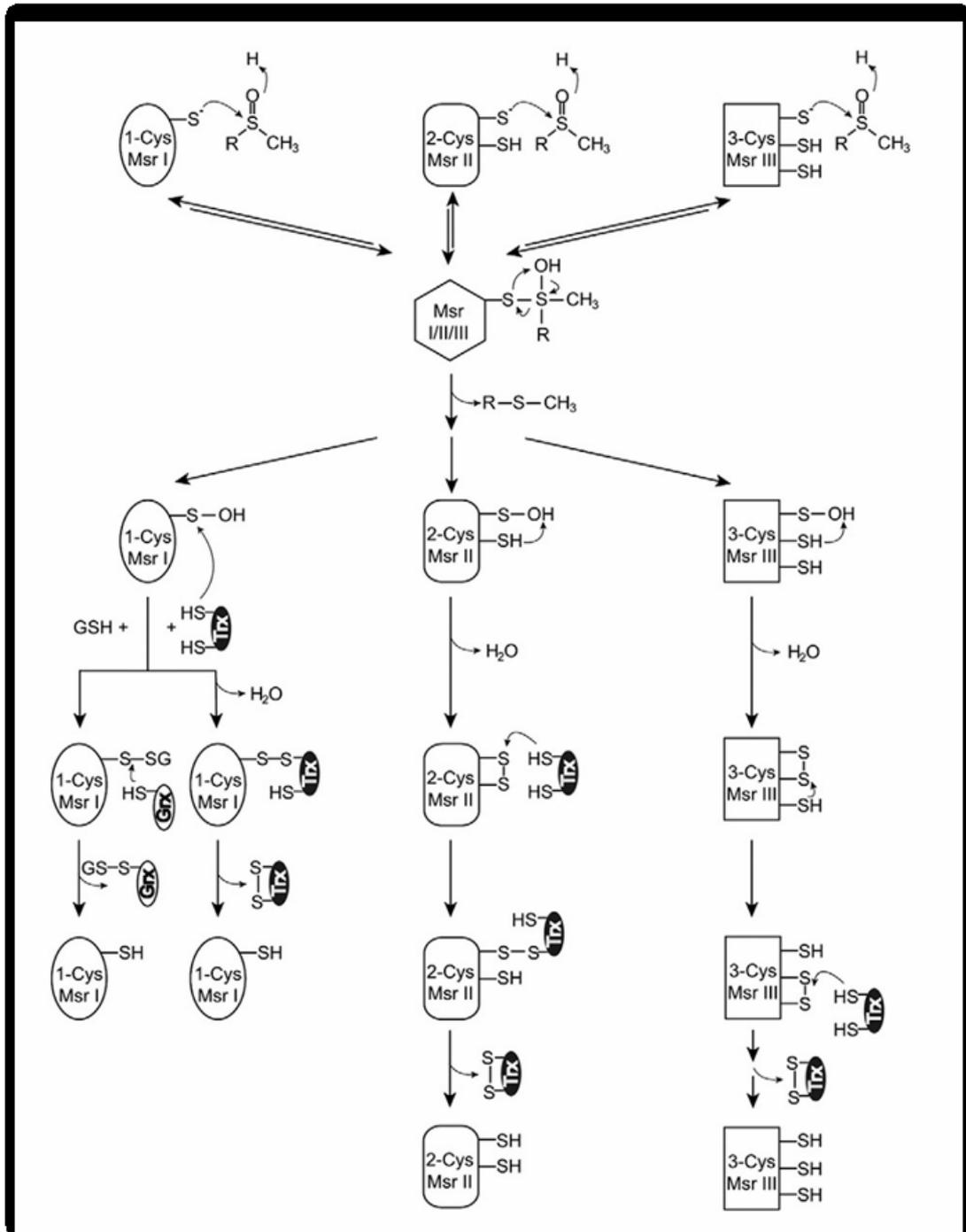


Figura 17 | Mecanismo catalítico y ciclo de regeneración de los tres tipos diferentes de Msrs. Trx, tioredoxina; Grx, glutaredoxina; GSH, glutatión reducido. Imagen tomada de Drazic, A. y col. (2014).

1.4. Leptospiras

1.4.1. Características generales

Las leptospiras son bacterias aerobias obligadas con movilidad similar a la de un sacacorchos y difieren de otras espiroquetas por la presencia de ganchos en los extremos. Tienen un diámetro promedio de 0,1 μm y una longitud de 6-20 μm

(Figura 18). Su pared celular es similar a la de las bacterias Gram negativas, con una membrana externa con los lipopolisacaridos hacia el lado externo, con una membrana interna sobre la cual se encuentra una delgada capa de peptidoglicano (lo que lo diferencia de otras bacterias Gram-negativas, que presentan la capa de peptidoglicano asociadas a su membrana interna), y entre estas membranas se haya el espacio periplasmático. La forma de su movilidad es debido a la presencia de endoflagelos, los cuales se extienden desde ambos polos hacia el periplasma (Figura 18).

Estas bacterias pertenecen al orden *Spirochetales*, familia *Leptospiaceae*, género *Leptospira*. Dentro de éste género se incluyen *Leptonema*, *Borrelia* y *Treponema*. *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum*, agentes patógenos causales de la enfermedad de Lyme y de la sífilis, respectivamente. (Canale-Parola, E. 1977; Levett, P.N. 2001; Cerqueira, G.M. y col. 2009).

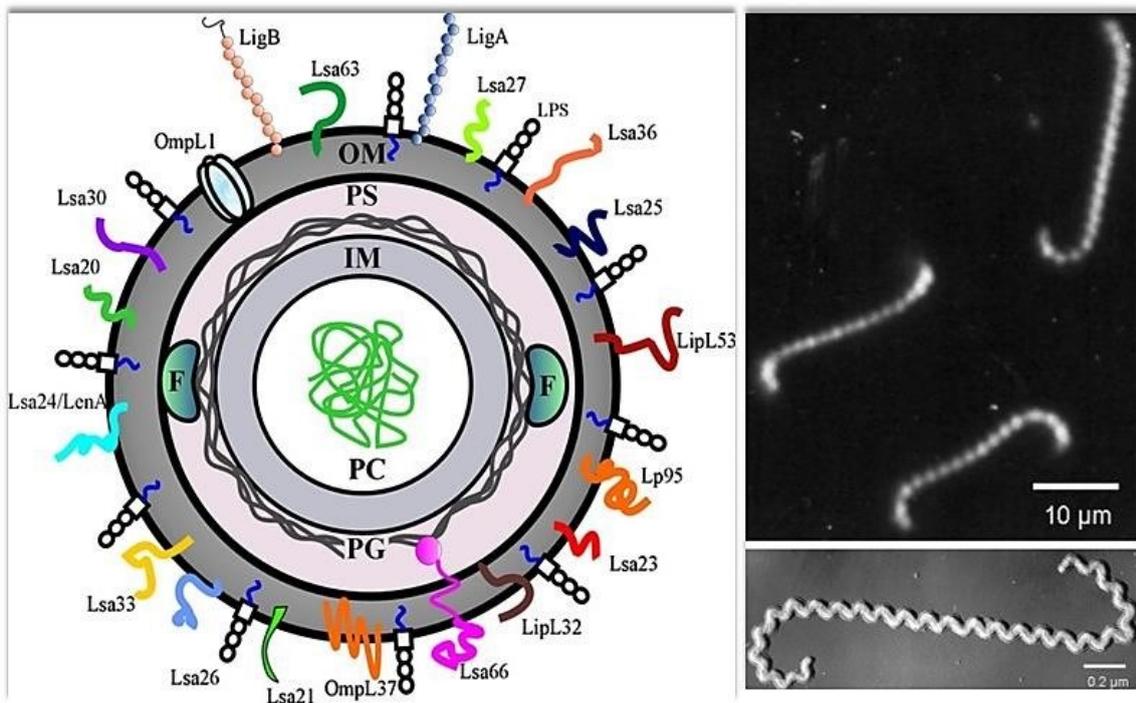


Figura 18 | Representación esquemática de la membrana celular de *Leptospira* spp. (a la izquierda). La membrana celular de *Leptospira* spp comparte características de ambas, bacterias Gram-positivas y Gram- negativas, respectivamente. OM representa *outer membrane* (membrana externa); IM *inter membrane* (membrana interna) y LPS *lipopolysaccharide* (lipopolisacáridos). En el PS (*periplasmic space* - espacio periplásmico) se encuentra el PG (peptideglycan-peptidoglicano) asociado con la IM. En este diagrama se muestran además, el PC (*protoplasmic cylinder*-cilindro protoplásmico), el F (*endoflagella*-endoflagelo) responsable de la movilidad, el cual se localiza en el PS. También se ilustran las adhesinas publicadas y caracterizadas. Imagen tomada de Vieira, M.L. y col. (2014). **Microfotografías de *Leptospiras* spp.** (a la derecha). En microscopio de campo oscuro (arriba) y electrónico (abajo). Imagen tomada de Alder, B. y col (2010).

1.4.2. Clasificación y nomenclatura

Las especies de leptospiras se clasifican filogenéticamente, analizando la secuencia de su ARN ribosomal 16 S en: patógenas, no patógenas (o saprófitas) e intermedias (**Figura 19B**). Las primeras son mantenidas en los túbulos renales de ciertos animales (huéspedes de mantenimiento) y presentan el potencial de causar enfermedad en humanos y animales que no son huéspedes de mantenimiento de esa especie de *Leptospira* patógena. Las segundas son de vida libre, se encuentran en diversos tipos de ambientes líquidos o húmedos, que comprenden desde aguas superficiales y suelos húmedos hasta el agua del grifo, mientras que las otras tienen propiedades intermedias entre estas dos, de ahí su nombre (Organization, W.H. y Society, I.L., 2003 ; Cinco, M. 2010).

Las leptospiras patógenas se distinguen serológicamente de acuerdo a sus similitudes y diferencias antigénicas en serovares. Cada serovar tiene una conformación antigénica característica; hasta el momento se han descrito 200 serovares patógenos, los cuales se han agrupado en 25 serogrupos en base a sus similitudes antigénicas (**Figura 19A**). Cada serovar de leptospiras tiende a estar asociado con un huésped natural de mantenimiento en particular, por ejemplo, el serovar Copenhageni está asociado con ratas, el serovar Canícola con perros, etc. Sin embargo, existen muchas excepciones a esta regla, lo cual significa que un serovar puede ser portado por muchos huéspedes y viceversa (Organization, W.H. y Society, I.L., 2003; Cinco, M. 2010; Adler, B. 2014).

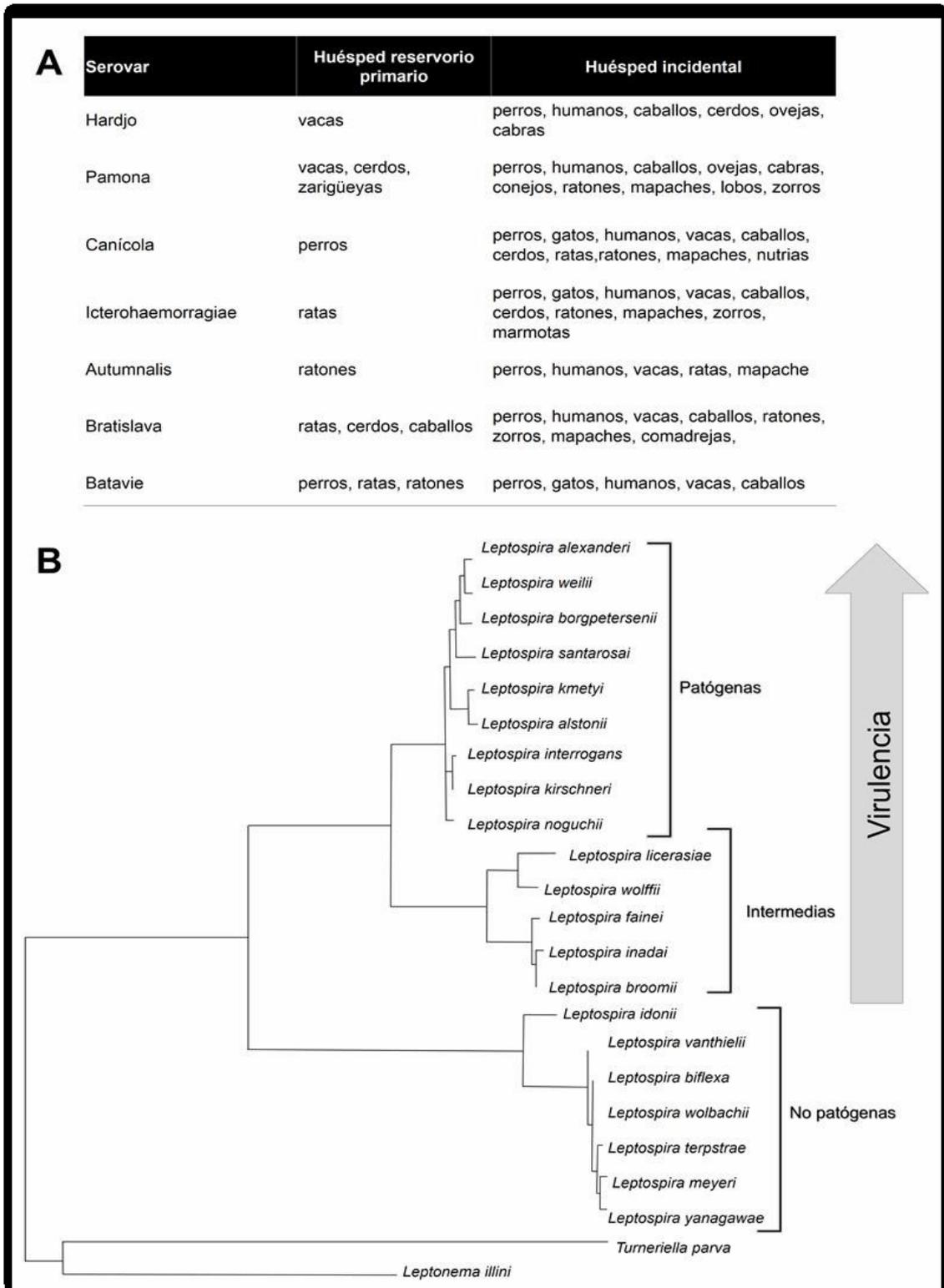


Figura 19 | A. Algunos serovares de *Leptospira interrogans* y sus respectivos hospedadores. Imagen tomada de Azócar-Aedo y col. (2014). B. Clasificación de especies de *Leptospiras* de acuerdo a su virulencia. Imagen adaptada de Adler, B. y col. (2010).

1.4.3. Organización genómica

Los genomas de bacterias del orden *Spirochetales* difieren en su tamaño y organización. *Leptospira spp.* tiene un contenido en GC del 35-41% y poseen dos cromosomas circulares de aproximadamente 4 Mb (Cromosoma I) y 300 kb (Cromosoma II), y un replicón adicional de 74 kb que ha sido identificado sólo en *L. biflexa* (Picardeau, M. y col. 2008). El genoma de *L. interrogans* (4,6 Mb) presenta la mayor información genética, necesaria para la supervivencia tanto en huéspedes mamíferos como en ambientes acuáticos, mientras que *L. biflexa* y *L. borgpetersenii* presentan genomas más pequeños (4 y 3,9 Mb) ya que están restringidas a los ambientes acuáticos o a los huéspedes mamíferos, respectivamente (Bulach, D.M. y col. 2006; Ren, S.X. y col. 2003). Por lo tanto, la identificación de genes comunes en especies patogénicas como *L. interrogans* y *L. borgpetersenii*, es consistente con el rol de esos genes en la patogénesis (Ren, S.X. y col. 2003; Bulach, D.M. y col. 2006). La comparación de los mapas genéticos de los cromosomas más grandes entre dos serotipos de *L. interrogans* (*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni y serovar Lai), puso en evidencia la existencia de una considerable heterogeneidad intraespecie (Zuerner, R.L. y col. 1993; Ren, S.X. y col. 2003; Nascimento, A.L. y col. 2004; Bulach, D.M. y col. 2006; Picardeau, M. y col. 2008; Ko, A.I. y col. 2009).

1.4.4. Fisiología y metabolismo

El genoma de ciertas especies de *Leptospira* codifica para la vía completa de síntesis *de novo* de aminoácidos y nucleótidos (y derivados) (Ren, S.X. y col. 2003). Los ácidos grasos de cadena larga (de más de 15 átomos de carbono) constituyen una fuente importante de energía como de carbono para estas bacterias. En adición, los ácidos grasos exógenos son requeridos como fuente para la síntesis de lípidos celulares debido a que las leptospiros no pueden sintetizar ácidos grasos *de novo*. De acuerdo a la información del proyecto genoma, *Leptospira* posee una vía de β -oxidación de ácidos grasos completa (Nascimento, A.L. y col. 2004). Además, poseen genes para el metabolismo del glicerol, incluyendo aquellos que codifican para un transportador de glicerol y glicerol-3-fosfato, glicerocinasa y una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Nascimento, A.L. y col. 2004). *In vivo*, *L. interrogans* obtiene los ácidos grasos y el glicerol a través de la degradación de las membranas celulares de las células huésped, por acción de fosfolipasas y esfingomielinasas (Carvalho, E. y col. 2010).

Sorprendentemente, la falta de utilización de glucosa como fuente primaria de energía es debido a la falta de sistemas de transporte de glucosa (Nascimento, A.L. y col. 2004; Ko, A.I. y col. 2009). El secuenciamiento del genoma de *L. interrogans*, reveló una vía glucolítica completa, aunque con dos notables diferencias: 1) hay una sustitución de la fosfofructoquinasa por una pirofosfato-fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa, y 2) un reemplazo de hexoquinasa por glucoquinasa, en el primer paso de la glucólisis (Nascimento, A.L. y col. 2004; Picardeau, M. y col. 2008; Srikrum, A. y col. 2011).

Estas bacterias crecen en ambientes aeróbicos o microaerofílicos, presentan además los genes codificantes para un ciclo del ácido tricarboxílico completo, así como también los codificantes para la cadena respiratoria de transporte de electrones. De acuerdo con esto, *Leptospira* genera ATP por fosforilación oxidativa, usando una ATPasa del tipo F1F0 (Ren, S.X. y col. 2003; Nascimento, A.L. y col. 2004), y emplea O₂ como aceptor final. Se ha propuesto que en algunos casos el H₂O₂ puede ser un alternativo aceptor final de su cadena respiratoria (Ren, S.X. y col. 2003; Nascimento, A.L. y col. 2004). Para su crecimiento las leptospiras requieren nitrógeno, el cual es suplementado en su cultivo *in vitro* en la forma de amonio (Canale-Parola, E. 1977). Se ha descrito que algunas especies patogénicas de leptospiras producen ureasa, la cual le permite sustituir el amonio por urea. Este hallazgo permite explicar la localización de las leptospiras en el riñón durante la leptopirosis (Canale-Parola, E. 1977). El crecimiento de las leptospiras es dependiente de la presencia de hierro. Este elemento en forma libre, es escaso *in vivo* debido a la rápida formación de formas oxidadas bajo condiciones fisiológicas y debido al secuestro de hierro por las proteínas fijadoras de hierro en el huésped, lo cual constituye un mecanismo de defensa frente a patógenos durante la infección (Wooldridge, K.G. y col. 1993). La mayor parte del hierro en el huésped mamífero (74%) está en forma de hemo en la hemoglobina (Wooldridge, K.G. y col. 1993), siendo estas cantidades suficientes para apoyar el crecimiento de las leptospiras (Guegan, R. y col. 2003). La hemoglobina (y por lo tanto el hierro) es obtenida por las leptospiras patógenas a través de la lisis de eritrocitos por la acción de hemolisinas (Nascimento, A.L. y col. 2004). Además existen numerosos sistemas de proteínas de transporte que le permiten importar hierro (Nascimento, A.L. y col. 2004).

1.4.5. Epidemiología y patogénesis

La leptopirosis es una enfermedad infecciosa causada por bacteria patógenas del género leptospiras que son transmitidas, directa o indirectamente, por contacto con

la orina de los animales infectados a los seres humanos siendo, por lo tanto, una zoonosis. La principal causa de infección en el hombre es la transmitida por las ratas, y es causada por la especie *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae o Copenhageni (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003). La leptospirosis afecta a países desarrollados y en vía de desarrollo, y se relaciona con ciertas actividades como pesca, deportes acuáticos, agricultores, etc., siendo las temperaturas de 20-30 °C, y una elevada humedad condiciones adecuadas para su desarrollo (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003) (**Figura 20**). Se estima que ocurren $\geq 500\ 000$ casos por año en todo el mundo. Es una enfermedad endémica. Tiene una distribución estacional, incrementándose con las lluvias y temperaturas. Las epidemias pueden estar asociadas con cambios en el comportamiento humano, contaminación de agua con animales o aguas residuales, cambios en la densidad de los reservorios animales, o a partir de un desastre natural como ciclones o inundaciones (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003; Cinco, M. 2010; Adler, B. 2014).

Las leptospiras ingresan al ser humano a través de cortaduras o abrasiones en la piel, a través de membranas mucosas intactas (nariz, boca, ojos), que se hayan en contacto con agua, vegetación o tierra humedecida que se encuentran contaminadas con la bacteria, o bien por contacto directo con la orina y/o tejidos de animales infectados. Una vez en el cuerpo, existe un período de incubación de 2-20 días, el cual es seguido de una enfermedad bifásica. La fase aguda o leptospirémica de aproximadamente 7 días con sintomatología similares a la de una gripe (fiebre, dolor de cabeza, mialgias, astralgias, náuseas, vómitos e ictericia) y finalmente se sigue de una fase inmuogénica, caracterizada por la producción de anticuerpos y la cual presenta sintomatología más severa: falla renal, falla hepática, meningitis aséptica y síndrome hemorrágico pulmonar o Enfermedad de Weils. Adolf Weils fue quien describió la leptospirosis como una enfermedad en el año 1886, y en su honor se sigue llamando de ese modo a la fase severa de la enfermedad (Cinco, M. 2010; Adler, B. 2014).

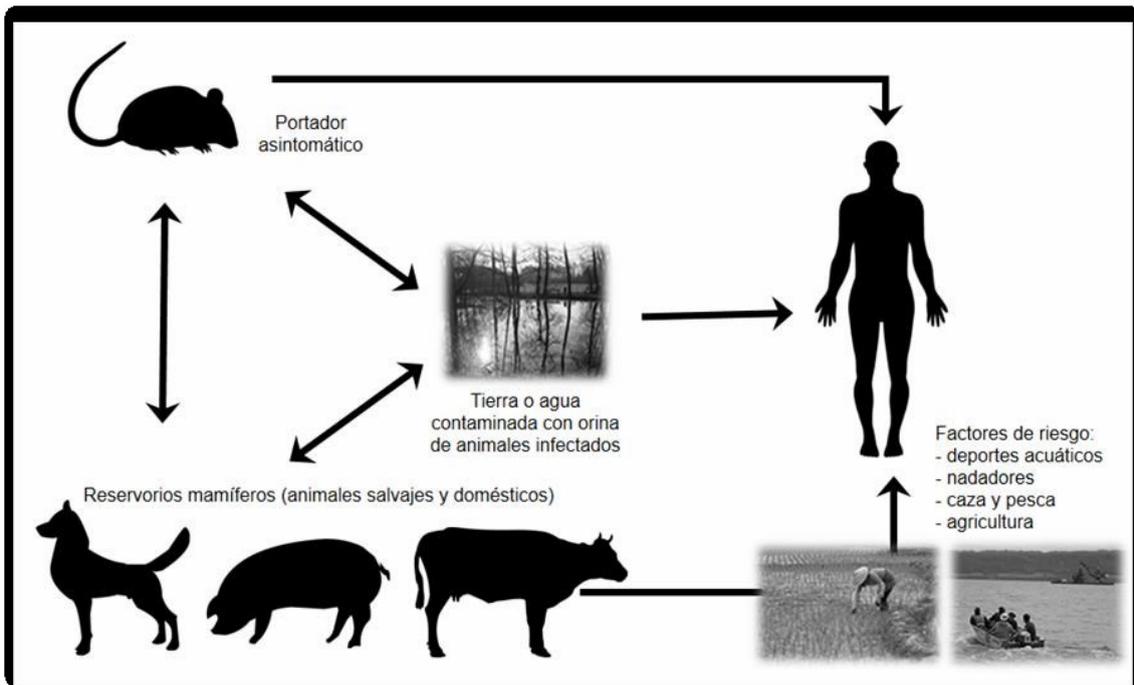


Figura 20 | Esquema de las formas de transmisión de la enfermedad, la sintomatología y factores de riesgo.

La colonización de tejidos del huésped es esencial para el establecimiento de la enfermedad. *L. interrogans* tiene adhesinas que pueden contribuir a los primeros pasos de la infección (LigA, LigB y LigC). Las manifestaciones clínicas de la leptospirosis son consecuencias del daño en el endotelio de pequeños vasos sanguíneos, que pueden contribuir a la isquemia y la disfunción de múltiples órganos (Adler, B. y col. 2010). El daño tisular generado mediante el proceso de infección es debido a la actividad de esfingomielinasas, fosfolipasa D y proteasas (colagenasa, metaloproteasas y termolisinas). Además de esto, se suman otros factores bacterianos como los lipopolisacárido (LPS) que tienen un fuerte efecto citotóxico (Nascimento, A.L. y col. 2004). La motilidad y quimiotaxis son mecanismos de virulencia que le permiten a las leptospiras patógenas un desplazamiento rápido a través de las monocapas de las células huésped y permiten su diseminación multiorgánica. La inflamación puede ser el resultado de una combinación del daño tisular, alteración de los mecanismos homeostáticos, y la interposición en la reparación de la herida. La inflamación también puede ser el resultado del daño tisular mediado por factores bacterianos como lípidos y proteínas) que tienen un fuerte efecto citotóxico (Adler, B. 2014). Cambios en los genes implicados en la biosíntesis de LPS se cree que es un mecanismo de adaptación a la nueva especie animal y de ahí la diversidad de serovares existentes de Leptospiras.

Muchos serotipos están adaptados para un determinado reservorio mamífero, el cual alberga los organismos en sus túbulos renales y los arrojan en su orina. Debido al amplio espectro de especies animales que sirven como reservorios, la leptospirosis se considera que es la enfermedad zoonótica más extendida (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003). La patología renal durante la leptospirosis está asociada a nefritis intersticial e infiltrados celulares conteniendo neutrófilos y monocitos, lo que sugiere un mecanismo inflamatorio. Extractos de proteínas de membrana, tales como la Lp32, desempeñan un papel importante en la estimulación de esta respuesta inflamatoria (Yang, C.W. y col. 2002; Yang, C.W. y col. 2006). El hallazgo de genes relacionados con la formación de *biofilms* es otro mecanismo que explica la colonización del epitelio tubular renal del huésped.

1.4.6. Tratamiento

El tratamiento antibiótico debe ser iniciado tan pronto como se sospeche de un diagnóstico de leptospirosis o preferiblemente antes del quinto día de aparición de la enfermedad. Los casos menos severos pueden ser tratados con antibióticos orales como amoxicilina, ampicilina, doxicilina o eritromicina. Además, el paciente debe consumir líquidos, realizar reposo y aliviar la sintomatología con atipiréticos (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003). En los casos más severos la penicilina G y ampicilina intravenosa (o la ceftriaxona para los pacientes alérgicos a la penicilina) son los antibióticos elegidos. Puede ser necesaria la hospitalización de los pacientes con falla renal y hepática. Sin embargo, dado que la aparición generalizada de resistencia bacteriana a los antibióticos actuales es un problema mundial en Salud Pública es que se ha acentuado la necesidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos dirigidos contra nuevos blancos moleculares (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003 ; Amineni, U. y col. 2010; Adler, B. 2014).

Por otro lado, las vacunas disponibles, en general son una suspensión de leptospiras muertas, y la protección es serovar específica, es decir los anticuerpos son producidos contra los serovares presentes en la vacuna, pudiendo en consecuencia desarrollar patología por otros serovares. Además, no inducen una respuesta a largo plazo contra la infección (Organization, W.H. y Society, I.L. 2003). El gran número de serovares patógenos (>200) y el costo de producir una vacuna multiserovar han sido las principales limitaciones. Se prevé por lo tanto el examen de nuevos inmunógenos

protectores para el desarrollo de una vacuna (Nascimento, A.L. y col. 2004; Amineni, U. y col. 2010; Suputtamongkol, Y. y col. 2010).

1.4.7. Metabolismo redox en leptospiras

Para un mejor entendimiento de la interacción entre leptospiras patogénicas y la respuesta inmune del huésped, fueron emplearon ensayos de microarreglos y un análisis comparativo a nivel genómico, los cuales mostraron que *L. interrogans* presenta actividad citocromo c oxidasa y catalasa (Corin, R.E. y col. 1978; Corin, R.E. y col. 1980; Austin, J.E. y col. 1981), siendo la última enzima necesaria para supervivencia de las leptospiras *in vivo*, por reducción de H₂O₂ (Eshghi, A. y col. 2012). Éste último puede generarse durante la respiración de estas bacterias aerobias (además de producirse como resultado de la respuesta inmune del huésped). Si bien las cepas patógenas y no patógenas de leptospiras presentan genes codificantes para catalasa en sus genomas, estos no son homólogos y pertenecen a grupos diferentes de enzimas. *L. interrogans* tiene un gen homólogo a *katE* que codificaría para una hemo-catalasa monofuncional (Loewen, P. 1996), mientras que *L. biflexa* tiene un gen homólogo a *katG* que codificaría para una hemo-catalasa bifuncional (con actividad catalasa/peroxidasa) (Loewen, P. 1996). Además se informó que mientras las cepas patógenas (como *L. interrogans*) presentan fuerte actividad catalasa y baja o nula actividad peroxidasa, las especies no patógenas (como *L. biflexa*) muestran fuerte actividad peroxidasa y débil actividad catalasa (Corin, R.E. y col. 1978). Esta diferencia entre ambas cepas, sugiere nuevamente que la catalasa juega un papel importante durante la infección. En apoyo a esta idea, se ha observado que *L. interrogans* puede sobrevivir en concentraciones 50 veces superiores de H₂O₂ a las toleradas por *L. biflexa*, lo cual es consistente con la mayor susceptibilidad de *L. biflexa* frente a este estresor. Esto indica que *L. interrogans* ha desarrollado un extenso sistema de detoxificación de H₂O₂, el cual está ausente en *L. biflexa* (Eshghi, A. y col. 2012). Por experimentos de fraccionamiento celular, se determinó que la catalasa es una enzima presente en el periplasma y sería utilizada principalmente para la detoxificación de H₂O₂ exógeno generado como consecuencia de la respuesta inmune del huésped (Eshghi, A. y col. 2012). Esto último se puso de manifiesto en ensayos *in vivo* con dos cepas patógenas de Leptospiras que presentan inactivación insercional de *katE*, las cuales mostraron una atenuación de su virulencia en un modelo de infección aguda (en hámster), demostrando que esta enzima es esencial para la virulencia de *L. interrogans* (Eshghi, A. y col. 2012).

Los análisis por microarreglos también han revelado que los genes codificantes para catalasa y genes implicados en el metabolismo del nitrógeno son *up* regulados bajo condiciones de estrés oxidativo, indicando que éstos pueden contribuir a la resistencia frente a este tipo de estrés. Además, se observó incremento a nivel de los transcriptos de *katE* cuando *L. interrogans* fue expuesta a condiciones similares a las *in vivo*, representadas por un crecimiento bacteriano en un medio con bajo contenido de hierro y con un 10% de suero fetal bovino. Por el contrario, los genes involucrados en la fosforilación oxidativa, el ciclo del ácido tricarboxílico y el metabolismo de los ácidos grasos, son *down* regulados luego de la interacción de células infectadas de origen murino y humanas, con macrófagos (Xue, F. y col. 2010).

Con la secuenciación del genoma de *L. interrogans* se ha podido identificar la existencia de genes codificantes para componentes del metabolismo redox, los cuales le permiten a esta bacteria (entre otras) sobrellevar el ataque de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas por el sistema inmune del huésped durante el proceso de infección. Recientemente en *L. interrogans* se ha descrito la presencia de una ferredoxina-NAD(P)H reductasa (FNR) del tipo plastídica funcional (Nascimento, A.S. y col. 2007; Catalano-Dupuy, D.L. y col. 2011). Esta FNR presentó actividad diaforasa, férrica reductasa, y citocromo c reductasa, empleando como sustrato ferredoxina de tipo [4Fe-4S] (y no del tipo [2Fe-2S]) presente en la bacteria y NADPH (no NADH) como dador de electrones (Nascimento, A.S. y col. 2007; Catalano-Dupuy, D.L. y col. 2011). Este proceso de intercambio de electrones entre una FNR plastídica y una Fd tipo bacteriano no se había evidenciado en la naturaleza con anterioridad. La FNR de *L. interrogans* no mostró ser una enzima promiscua respecto a sus proteínas sustratos, no siendo capaz de emplear ni ferredoxina ni flavodoxinas de otras fuentes (Catalano-Dupuy, D.L. y col. 2011). En adición, se ha caracterizado funcionalmente una hemo-oxigenasa de *L. interrogans*, la cual cataliza la conversión de hemo a hierro (Fe^{2+}), dióxido de carbono (CO_2) y biliverdina, empleando oxígeno, equivalentes de reducción provenientes del NADPH y FNR. Se ha propuesto a la hemo-oxigenasa de *L. interrogans* como una enzima esencial para la utilización del hierro del grupo hemo, el cual es requerido para la supervivencia de la patógeno y su infectividad (Soldano, A. y col. 2014).

1.5. Incumbencias del trabajo de Tesis

Los organismos patógenos poseen proteínas y moléculas no proteicas antioxidantes que constituyen los mecanismos de detoxificación de EROs y ERNs, así como también mecanismos de recuperación del daño producido en proteínas por oxidación. Estos mecanismos son de marcada importancia para el establecimiento de la infección. El presente trabajo de Tesis busca la obtención de resultados que permitan realizar una contribución al entendimiento del metabolismo redox en leptospiras. La caracterización de las componentes moleculares va a permitir establecer la importancia funcional relativa de cada uno de ellos en el escenario metabólico de óxido-reducción en estas bacterias. Este conocimiento permitirá identificar proteínas que cumplan una función clave para la fisiología y supervivencia de los microorganismos y así contribuir, no solo al conocimiento de la bioquímica y biología de estos organismos, sino también a la identificación y caracterización de posibles blancos moleculares potenciales para el desarrollo de nuevos agentes bactericidas contra las especies patógenas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Estudiar el metabolismo redox en bacterias del género *Leptospira*. Caracterizar funcionalmente distintos componentes de los sistemas antioxidantes y de reparación del daño oxidativo.

Objetivos Particulares

- Hacer una búsqueda en el proyecto genoma de *L. interrogans* serovar Copenhagenii (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>), y en la base de datos (<http://meta.microbesonline.org/>), la información genómica de *L. biflexa*, respectivamente. Identificar las secuencias de nucleótidos que codifican para probables proteínas componentes del metabolismo redox de las bacterias y diseñar oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR las secuencias codificantes seleccionadas (*L. biflexa thioredoxin reductases*, LEPBI_I2359 y LBF_2230; mientras que de *L. interrogans*, *thioredoxin reductase* LIC11470 ; *thioredoxin* LIC119788; *glutamate cysteine ligase* LIC11812; *methionine sulfoxide reductase A*, LIC10545 y LIC12978; *methionine sulfoxide reductase B* LIC290278, *catalase* LIC12032, *monothiol glutaredoxin* WP_002106269.1 y *dithiol glutaredoxin* WP_000780847.1).
- Clonar, expresar y purificar las diferentes proteínas en estudio para su posterior caracterización estructural y funcional. Estudiar las propiedades cinéticas de las distintas proteínas recombinantes.
- Determinar la abundancia relativa de las proteínas en estudio, tanto en condiciones basales como en situación de estrés oxidativo.
- Evaluar, sobre cultivos bacterianos, la viabilidad y resistencia al estrés oxidativo, de *L. interrogans*, conjuntamente con la cepa no patógena.

2. MATERIALES

Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados para los procedimientos de biología molecular, purificación de proteínas, ensayos enzimáticos, etc., fueron suministrados por los representantes en Argentina de las firmas Invitrogen, Promega, Fermentas, GE-Healthcare, Sigma-Aldrich, Merck. Los insumos utilizados para la preparación de medios de cultivo fueron adquiridos de la firma Britania (Argentina) o a través de los representantes en Argentina de las firmas Gibco y Becton, Dickinson y Compañía (BD).

3.2. Cepas microbianas, procedimientos de cultivos, preservación de los microorganismos y plásmidos utilizados

3.2.1. Cepas de *Leptospira* spp y procedimientos de cultivo

Se utilizaron las cepas *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni y *Leptospira biflexa* serovar PATOC, patógena y no patógena, respectivamente. Las bacterias fueron cedidas gentilmente por la Bioquímica Silvia Fusco (Laboratorio Central del Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe-Argentina). Las bacterias se crecieron y mantuvieron en el medio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Ellinghausen, H.C. y col. 1965), cuya composición se detalla a continuación y fueron cultivadas en forma estática durante 5 a 7 días a 28 °C. La densidad celular fue determinada por la lectura de absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro S-26 (Boeco-Germany). La densidad de bacterias fue estimada de acuerdo a la relación establecida por Lovuel, H. y col. (2007) , donde una $DO_{420nm} = 0,3-0,4$ representa $6-9 \cdot 10^8$ bacterias.ml⁻¹.

° Medio Ellinghausen-Mccullough-Johnson-Harris (EMJH):

-Medio Base

Difco™ Leptospira Medium Base EMJH (BD) 2,3 g. l⁻¹

- Suplemento

Albúmina	12,5 g. l ⁻¹
ZnSO ₄	12,5 mg. l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	93, 75 mg. l ⁻¹

CaCl ₂	68,75 mg. l ⁻¹
Vitamina B12	1,25 mg. l ⁻¹
Tween 80	0,14% (p/v)
FeSO ₄	62,5 mg. l ⁻¹
pH	7,4

3.2.2. Cepas de *Escherichia coli* y procedimientos de cultivo

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* para el clonado y expresión de las proteínas recombinantes, el genotipo de las mismas se detalla a continuación:

- *E. coli* **TOP 10 F' (Invitrogen)**. Genotipo: [lacI_q Tn10 (Tetr^R)] mcr A Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.
- *E. coli* **BL21 (DE3) (Novagen)**. Genotipo: F- ompT gal dcm lon hsdSB (rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]).

Las células de *E. coli* TOP10 F' fueron utilizadas para mantenimiento y replicación de plásmidos. Las cepas *E. coli* BL21 (DE3) se emplearon para la expresión de las proteínas recombinantes. Las células fueron cultivadas a 37 °C en medio LB, LB-Glc o TB (a continuación se detalla la composición), según el experimento realizado, con agitación a 180 rpm. Para la selección de bacterias transformadas con diferentes plásmidos, los medios se suplementaron con los antibióticos ampicilina (100 μg ml⁻¹) o kanamicina (50 μg ml⁻¹), según el caso. Para el almacenamiento a corto plazo, las bacterias transformadas se conservaron en placas con medio LB-agar a 4 °C por un mes. Para tiempos mayores, a cultivos líquidos saturados se les adicionó glicerol en una proporción final de 25% (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

La composición de los medios de cultivo empleados se detalla a continuación:

° Medio *Lysogeny Broth* (LB):

Tripteína bacteriológica	10 g. l ⁻¹
Extracto de levadura	5 g. l ⁻¹
NaCl	10 g. l ⁻¹
pH	7,0

- ° *LB-Glucosa (LB-Glc)*: medio LB adicionado con glucosa al 2% (p/v).
- ° *LB-Agar*: medio LB más agar a una concentración final de 2% (p/v).
- ° *Medio Terrific Broth (TB)*:

Peptona de carne	12 g. l ⁻¹
Extracto de levadura	24 g. l ⁻¹
Glicerol	4 ml. l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO ₄	72 mM
pH	7,0

- ° *Medio M9-suplementado*

Na ₂ HPO ₄	12,8 g. l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,3 g l ⁻¹
NaCl	0,5 g. l ⁻¹
NH ₄ Cl	1 g. l ⁻¹
Glucosa	0,4% (p/v)
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	100 μM
ZnCl ₂ , CoCl ₂ o FeCl ₃	100 μM
pH	7,4

3.2.3. Cepas de levaduras y procedimientos de cultivo

Para la realización de los estudios de funcionalidad *in vivo* de la glutarredoxina monotiólica de *L. interrogans* se emplearon las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: CML235, MML19 y MML39 que fueron gentilmente cedidas por el Dr. Enrique Herrero (Universidad de Lleida, Lleida, España) (Rodríguez-Manzaneque, M.T. y col. 1999). Todas las cepas de levaduras presentan auxotrofía por leucina, histidina y uracilo. La obtención se describe en Rodríguez-Manzaneque, M.T. y col.(1999). El genotipo de cada cepa se detalla a continuación:

- *S. cerevisiae* **MML19** (Δ grx5). Genotipo: MATa ura3-52 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 grx5::kanMX4.
- *S. cerevisiae* **MML39** (Δ grx5 Δ grx4). Genotipo: MATa ura3-52 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 grx4::kanMX4 grx5::kanMX4.
- *S. cerevisiae* **CML235 (cepa parental)**. Genotipo: MATa ura3-52 leu2 Δ 1 his3 Δ 200.

Para la realización de los estudios de funcionalidad *in vivo* de las metionina sulfóxido reductasas de *L. interrogans* se emplearon las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1B y GY202 cedidas por el Dr. Vadim Gladyshev (*University of Nebraska Lincoln*). Los genotipos de las cepas mencionadas se detallan a continuación:

- *S. cerevisiae* GY202 ($\Delta msrA\Delta msrB\Delta fRmsr$). Genotipo: MATa his3 leu2 met15 ura3 $\Delta msrA::URA3$ $\Delta msrB::KAN$ $\Delta fRmsr::HIS3$.
- *S. cerevisiae* W303-1B (cepa parental). Genotipo: MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15.

Medios de cultivos empleados:

° Medio Yeast Peptone Dextrose (YPD):

Peptona	20 g. l ⁻¹
Extracto de levadura	10 g. l ⁻¹
Glucosa	20 g. l ⁻¹

° Medio Yeast Peptone Glicerol (YPG):

Peptona	20 g. l ⁻¹
Extracto de levadura	10 g. l ⁻¹
Glicerol	30 g l ⁻¹

° Medio definido SD-glucosa

Yeast nitrogen base (BD)	17 g. l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g. l ⁻¹
Glucosa	20 g. l ⁻¹

° Medio definido SD-glicerol

Yeast nitrogen base (BD)	17 g. l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g. l ⁻¹
Glicerol	30 g. l ⁻¹

° Medios YPD/ YPG y SD-glucosa/ SD-glicerol agar

A cada uno de los medios correspondientes se le adicionó agar al 2% (p/v).

Para el mantenimiento de estas cepas, los cultivos se realizaron en medio YPD o YPD-agar. Las células transformadas con las diferentes construcciones del plásmido p425-GPD (el cual revierte la auxotrofia por leucina) se crecieron en medio definido SD-glucosa: YNB (BD - Yeast Nitrogen Base without Amino Acids & Ammonium Sulfate), suplementado con glucosa 2% (p/v); (NH₄)₂SO₄ 0,5% (p/v); uracilo 0,02 g. l⁻¹; adenina 0,02 g l⁻¹; triptófano 0,02 g l⁻¹; histidina 0,02 g l⁻¹ y metionina 100 µM. En los ensayos de

fermentación de fuentes de carbono se emplearon alternativamente los medio YPD, YPG, SD-glucosa o SD-glicerol. Para su conservación, los cultivos líquidos crecidos por 48 h, fueron adicionados con glicerol a una concentración final de 25% (v/v) y se almacenaron a -80 °C. Para almacenamiento a corto plazo, las levaduras transformadas se conservaron en placas con medio SD-glucosa a 4 °C por un mes.

3.3. Vectores plasmídicos utilizados

Para el desarrollo de este estudio se emplearon los plásmidos de clonado y expresión listados en la **Tabla 1**.

Tabla 1 | Características de los vectores empleados.

Plásmido	Características	Referencias
pGEM®-T- <i>Easy</i>	Vector de clonado (3 kb) para productos de PCR. α -complementación, resistencia a ampicilina.	Promega
pBluscript	Vector de clonado (2,9 kb), resistencia a ampicilina	Stratagen
pET-28c	Vector de expresión (5,4 kb) inducible por IPTG. Promotor T7, fusión a cola de histidina en N-terminal, resistencia a kanamicina.	Novagen
pET-22b	Vector de expresión (5,4 kb) inducible por IPTG. Promotor T7, fusión a cola de histidina en C-terminal, resistencia a ampicilina. Hacia el N-terminal lleva una secuencia señal (derivada de pelB) para traslocación a periplásmica.	Novagen
P425-GPD	Vector no integrativo para expresión constitutiva en levaduras. Ori 2 μ . Promotor <i>GDP</i> (<i>gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa</i>). Selección por reversión de auxotrofia a LEU2.	(Mumberg, D. y col. 1995)

3.4. Métodos de Biología Molecular

Varios de los métodos de biología molecular empleados en este trabajo fueron acorde a lo descrito por Maniatis y Sambrook (Maniatis, T. y col. 1982; Sambrook, J. y col. 2001).

3.4.1. Extracción de ADN genómico de *Leptospira* spp.

El ADN genómico de *L. interrogans* o *L. biflexa* se obtuvo a partir de cultivos bacterianos en fase exponencial, empleando el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

La minipreparación de ADN plasmídico se realizó a partir de cultivos bacterianos empleando el kit comercial *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3. Extracción de ARN total de *Leptospira* spp.

Para la extracción de ARN total de leptospiras se utilizaron 40 ml de cultivos de bacterias en fase exponencial. El ARN total de las leptospiras fue purificado mediante extracción fenólica y precipitación con etanol, como se detalla a continuación. El cultivo bacteriano se cosechó por centrifugación, se lavó 3 veces con PBS estéril 1X y luego se le agregó 1 ml de solución de lisis I fría (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 25 mM y EDTA 25 mM) y se mezcló vigorosamente con ayuda del vortex. Luego se agregaron 2 ml de la solución de lisis II (NaOH 0,2 M y SDS 1 % (p/v)) y 1,5 ml de la solución de lisis III [acetato de sodio 4 M 60 % (p/v) y ácido acético glacial 11, 5 % (v/v)] mezclando suavemente y por inversión, y se dejó incubar en hielo durante 20 min. Seguidamente se separó el precipitado formado por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se le agregaron 3 ml de la mezcla fenol: cloroformo 1:1. Luego de homogeneizar con la ayuda de un vortex, se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 2 min a 4 °C y se transfirió la capa superior a un nuevo tubo al cual se le agregaron 3 ml de isopropanol. Se mezcló y se dejó reposar durante 2 min a temperatura ambiente, momento en el que se observó la precipitación del ARN. A continuación se centrifugó a máxima velocidad 5 min, se recuperó el *pellet* y se lavó con 5 ml de etanol 70% (v/v). Una vez más se centrifugó a máxima velocidad por 2 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente para luego disolverlo en 50 µl de agua *milliQ* estéril. Posteriormente, para eliminar DNA genómico contaminante se realizó el tratamiento

con *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La pureza del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), y éste se cuantificó espectrofotométricamente a partir de su absorbancia a 260 nm.

3.4.4. Transcripción inversa del ARNm

La síntesis del ADNc se realizó mediante una reacción de retrotranscripción a partir del ARN total obtenido como se detalló en el inciso anterior, utilizando reactivos Promega y siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, se incubó un ARN con 3 pmol. μl^{-1} de *Primer reverse* (correspondiente a cada una de las secuencias de interés, ver adelante) a 70 °C durante 5 min en un volumen final de 15 μl . El objetivo de esta primera incubación es eliminar posibles estructuras secundarias formadas en el ARN. A continuación se enfrió la muestra en hielo y se agregó el *buffer* de reacción de M-MLV RT 1X, dNTPs 2 mM c/u, 4 U. μl^{-1} de enzima Transcriptasa Reversa M-MLV y agua *milliQ* estéril hasta completar los 25 μl de volumen final. En paralelo se realizó un control negativo de retrotranscripción que consistió en la misma mezcla de reacción antes mencionada exceptuando la enzima RT M-MLV. La reacción se llevó a cabo a 42 °C durante 60 min. El ADNc obtenido se guardó a -20 °C hasta su uso.

3.4.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los fragmentos de ADN codificantes para las proteínas de interés se obtuvieron y amplificaron por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos. Éstos se diseñaron en base a secuencias incluidas en la base de datos <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/> y <http://www.microbesonline.org/> adicionando sitios de restricción en sus extremos 5', según la estrategia de clonado elegida. La síntesis de oligonucleótidos (o *primers*) fue llevada a cabo por Sigma-Aldrich Co. o Genebiotech SRL. Las secuencias nucleotídicas de cada oligonucleótido se muestran en la **Tabla 2**.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a un volumen final de 50 μl utilizando reactivos comerciales de *Thermo Fisher Scientific*. Los reactivos fueron: *buffer* para Taq ADN polimerasa 1X, MgCl_2 3 mM, dNTPs 1 mM de cada uno, *Taq* ADN polimerasa 1 U. μl^{-1} . También se adicionaron los oligonucleótidos *forward* y *reverse* a una concentración de 2 pmol. μl^{-1} cada uno y agua *milliQ* estéril hasta completar el volumen de reacción. Como molde se utilizó ADN genómico, ADNc de *Leptospira* spp. o ADN

plasmídico, según el caso. Las reacciones se realizaron en un termociclador (BOECO, *Thermal cycler Biocycler TC-S, Alemania*).

El programa utilizado en cada reacción de PCR fue:

1. 95 °C durante 10 min
2. 95 °C durante 1 min
3. *T_m* durante 1 min
4. 72 °C durante 1 min
5. 72 °C durante 10 min

Los pasos 2 a 4 se reiteraron durante 30 ciclos. La *T_m* fue seleccionada acorde a los oligonucleótidos empleados y se especifican en la **Tabla 2**.

Tabla 2 | Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos de ADN de interés. En negrita se muestran los sitios de restricción específicos.

Primers	Secuencias nucleotídicas	Sítios de restricción	T _m (°C)
<i>LintrxAFw</i>	GCTAGCGGATCCATGGCATTGGCAGAAGTCAA	<i>NheI-BamHI</i>	77,8
<i>LintrxARv</i>	AAGCTTTTATTTATGTCTTTCTATAA	<i>HindIII</i>	55,0
<i>LintrxBFw</i>	GCTAGCGGATCCATGGCCATAAAATAGTCAT	<i>NheI-BamHI</i>	72,3
<i>LintrxBRv</i>	CTCGAGTTATTCTTCTTCICIGGACT	<i>XhoI</i>	63,1
<i>LbitrxBFw</i>	GCTAGCGGATCCATGAACCACAAAGTTGTCATCAT	<i>NheI-BamHI</i>	75,5
<i>LbitrxBRv</i>	CTCGAGCTAATGGCCTTCGAGCCATCG	<i>NheI-XhoI</i>	64,3
<i>lbitrxB1Fw</i>	GCTAGCGGATCCATGGAATCTCTTCAAAAAGCA	<i>NheI- BamHI</i>	74,1
<i>lbitrxB1Rv</i>	CTCGAGTTAAGACAAAATCATCGATCG	<i>XhoI</i>	56,7
<i>lingshAFw</i>	CATATGTTGAAAACAAAAGAACTTACT	<i>NdeI</i>	50,6
<i>lingshARv</i>	CTCGAGTCAATGATTGCATAGTTTAAC	<i>XhoI</i>	55,2
<i>lin1CgrxFw</i>	GGATCCCATATGAACAATGACTTAAAACAAAAAATAG	<i>BamHI-NdeI</i>	58,9
<i>lin1CgrxRv</i>	CTCGAGTCATCCTGCGCTTAAGATCCCTGCT	<i>XhoI</i>	65,7
<i>lin2CgrxFw</i>	GGATCCCATATGAAGTTATATCACTTTCAATCCTGTC	<i>BamHI- NdeI</i>	62,2
<i>lin2CgsxRv</i>	CTCGAGTTAAAATTTTTTTTAAAGTTTTACG	<i>XhoI</i>	52,5
<i>linmsrA1Fw</i>	CATATGGCGACTCCTAAAACAGAAAAAGC	<i>NdeI</i>	58,7
<i>linmsrA1Rv</i>	CTCGAGTTAATTGTGCTTTTGACTTT	<i>XhoI</i>	53,7
<i>linmsrA2Fw</i>	CATATGGAACAAGCAACATTAGCGGCG	<i>NdeI</i>	61,4
<i>linmsrA2Rv</i>	CTCGAGTTAACGTTGCTACACATTTT	<i>XhoI</i>	56,7
<i>linmsrBFw</i>	CATATGAATTACGAAGTCAACAAA	<i>NdeI</i>	48,8
<i>linmsrBRv</i>	CTCGAGTTCTTTCTGAAACTTTAAGGA	<i>XhoI</i>	55,2

3.4.6. Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de fragmentos de ADN obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis horizontal sumergida en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (Tris- HCl 40 mM; ácido acético 40 mM y EDTA 1mM, pH 8,0). Para la tinción de los fragmentos resueltos, previamente se adicionó a los geles de agarosa el fluoróforo *Gel Green Biotium*® a una concentración final de 0,3 µg. ml⁻¹. Cada muestra se sembró en el gel adicionando previamente *buffer* de siembra de ADN [azul de bromofenol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v)]. Los geles se corrieron en el *buffer* TAE a 100 V utilizando el sistema Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad). La visualización de cada fragmento de ADN retenido en el gel se realizó bajo luz azul pura (310 nm) con un transiluminador DR-46B (*Clare Chemical Research Dark Reader*). En todos los casos, las muestras se corrieron junto a un marcador de masa molecular de referencia (Productos Bio-Lógicos, Argentina).

3.4.7. Purificación de ADN en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos a partir de las reacciones de PCR o de las digestiones enzimáticas se corrieron en geles de agarosa al 1 - 1,5%, como se explicó en el inciso anterior. Una vez identificado cada segmento de interés, se purificó con el sistema comercial *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.8. Precipitación de ADN

Para precipitar el ADN se agregó a las soluciones que lo contenían 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 4,8). Las muestras se incubaron a -20 °C durante 30 min y se centrifugaron a 15000 rpm a 4 °C durante 15 min. A continuación se descartó el sobrenadante y el ADN precipitado se resuspendió en agua *milliQ* estéril.

3.4.9. Secuenciación de ADN

La secuenciación nucleotídica automática del ADN fue llevada a cabo por la empresa MacroGen (Corea del Sur).

3.4.10. Digestiones enzimáticas del ADN

Las reacciones de digestión del ADN se realizaron a 37 °C, durante 3 h y en un volumen final de 50 µl utilizando enzimas de restricción comerciales (Promega o Fermentas), según las indicaciones del fabricante. Los productos obtenidos se resolvieron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) y se identificaron por comparación con un marcador de masa molecular de referencia y se purificaron a partir del gel como se describió previamente.

3.4.11. Ligación de los fragmentos de ADN a vectores plasmídicos

Para realizar las reacciones de ligación se mezclaron volúmenes de inserto y vector de forma tal de alcanzar una relación molar de 3:1, respectivamente. Cada mezcla se incubó a 60 °C durante 5 min y luego en hielo. Enfriada la mezcla, se agregó el *buffer* de reacción correspondiente y 2 U de la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas, Argentina), en un volumen de reacción final de 15 µl. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 16 h. Para los controles de vector religado se realizó el mismo procedimiento reemplazando el volumen de inserto con agua *milliQ* estéril.

3.4.12. Transformación de *E. coli* por el método de CaCl₂

Las células de *E. coli* TOP 10 F' o BL21 (DE3), dependiendo el caso, se hicieron crecer en medio LB, a 37 °C y con agitación de 180 rpm durante toda la noche. Luego, el cultivo fue diluido 1/100 en medio LB fresco y se incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una DO_{600nm} ~0,5-0,6 característica de la fase de crecimiento logarítmica. De este cultivo se tomaron alícuotas de 1 ml y se cosecharon a 5000 rpm durante 5 min. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 500 µl de solución ST1 (MOPS 100 mM y KCl 10 mM; pH 7,0). El paso de centrifugación y resuspensión se repitió utilizando la solución ST2 (MOPS 100 mM; KCl 10 mM y CaCl₂ 50 mM; pH 6,5) y luego se incubaron las muestras en hielo por un período de 15 min. Transcurrido ese tiempo, nuevamente se cosecharon las células, se resuspendieron en 100 µl de ST2 y se les adicionó una muestra de cada mezcla de ligación. Las suspensiones bacterianas se incubaron en hielo por 60 min. Seguidamente, se realizó un *shock* térmico incubando a 42 °C durante 40 s, y nuevamente se incubaron por 2 min en hielo. Inmediatamente se adicionó 1 ml de medio LB-glucosa a cada suspensión y se incubó por 60 min a 37 °C. Finalmente, las células se cosecharon a 4500 rpm durante

5 min, se resuspendieron en 100 μ l de medio LB y se sembraron en placas de Petri que contenían LB-agar con el agregado del antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C hasta la visualización de colonias. En cada proceso de transformación se realizó un control negativo (en el cual se obvió la adición de la mezcla de ligación), un control positivo (mediante el agregado de ADN plasmídico conocido) y un control de vector religado.

3.4.13. Transformación de las levaduras

Se empleó un protocolo adaptado a partir del método químico descrito por Gietz y col. (2007). Brevemente, las levaduras competentes fueron obtenidas a partir de un cultivo en fase exponencial de las mismas en 50 ml de medio YPD ($DO_{600\text{nm}} \sim 1$). El cultivo obtenido fue centrifugado a 2000 rpm durante 5 min. El *pellet* celular fue suspendido en 10 ml de agua destilada estéril y centrifugado nuevamente. El *pellet* resultante fue suavemente suspendido en 5 ml de solución de transformación I (acetato de litio 100 mM; EDTA 1 mM y Tris-HCl 100 mM; pH 7,0). Esta suspensión fue centrifugada a 2000 rpm durante 5 min. Finalmente, el *pellet* fue suspendido en 0,25 ml de la solución de transformación I. Por cada evento de transformación se tomó una alícuota de 50 μ l de esa suspensión, y se agregó a cada alícuota la construcción recombinante correspondiente. En estos eventos de transformación se incluyó la transformación con la construcción de interés (vector conteniendo el gen a estudiar), un experimento incluyendo el vector sin inserto (control positivo) y un experimento sin vector (control negativo). Luego de homogeneizar cada suspensión se agregaron 0,3 ml de la solución de transformación II [PEG 40% (p/v); acetato de litio 100 mM; EDTA 1 mM; Tris-HCl 100 mM; pH 7,0] y se incubaron los tubos durante 30 min a 30 °C. Luego se realizó una incubación a 42 °C durante 15 min. Finalmente, de cada suspensión se sembraron aproximadamente 100 μ l en placas conteniendo medio SD-glucosa (en ausencia de leucina). Las placas inoculadas fueron incubadas a 28 °C hasta la visualización de colonias.

3.5. Métodos Bioquímicos

3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli, U.K. (1970) utilizando

como soporte geles discontinuos de poliacrilamida al 10-15% (p/v) y el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM en Tris-HCl 50 mM pH 6,8 y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. En caso de realizar SDS-PAGE no reductor, se omite la presencia del agente reductor y el calentamiento en el tratamiento de la muestra. La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas fue realizado omitiendo el agregado de SDS en los geles y en la muestra empleando geles de poliacrilamida continuos al 7-10% (p/v). Terminada la corrida, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con *Coomassie brilliant blue* R-250. En ciertos casos particulares se realizó la coloración argéntica del gel. Brevemente, el gel obtenido luego de la corrida electroforética se incubó durante 1 h en agitación lenta en solución de fijación [ácido acético 12% (v/v); etanol 50% (v/v) y formaldehído 0,0185% (p/v)]. A continuación se realizaron 3 lavados con solución de lavado [etanol 50% (v/v)] de 5, 10 y 15 min de duración. Posteriormente se realizó un enjuague con solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g l⁻¹, y se lavó brevemente con agua *milliQ* con tres cambios sucesivos. El gel se incubó 20 min con solución de plata [AgNO_3 2 g l⁻¹; formaldehído 0,027% (p/v)]. Se realizaron a continuación tres lavados con agua *milliQ*. Se incubó con una solución de revelado [Na_2CO_3 3% (p/v); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 mg l⁻¹ y formaldehído 0,0185% (p/v)], hasta visualizar las bandas. Se realizó a continuación una incubación en solución de fijación durante 5 min, y luego un lavado con solución de lavado. El gel se conservó en una solución de etanol 25% (v/v) y glicerol 3% (p/v).

3.5.2. Preparación de antisueros

Los sueros inmunes contra las proteínas de interés fueron preparados por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina), mediante la inmunización de conejos con proteínas purificadas acorde a lo descripto por Vaitukaitis y col (1971).

3.5.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Después de realizar un SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia de las proteínas resueltas en el gel hacia una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Ésta se llevó a cabo durante 35 min aplicando 5 mA por cada cm² de gel, en un equipo

Semi-Dry Fastblot B43 (Biometra) que contenía el gel y la membrana entre papeles de filtro embebidos previamente en solución de transferencia [Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% (v/v); pH 8,3]. Una vez finalizada, la transferencia efectiva se verificó la presencia de proteína mediante la tinción reversible de las membranas con una solución de *Rojo Ponceau* 0,25 % (p/v) en ácido acético 1% (v/v). La membrana conteniendo las proteínas electrotransferidas, fue bloqueada por incubación en una solución de leche descremada en polvo al 5 % (p/v) preparada en PBS (KH_2PO_4 2 mM; Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,5), durante 1 h. Luego se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente (o alternativamente, durante 16 h a 4°C), en agitación, con una solución del anticuerpo primario realizado contra las proteínas de interés (en una dilución acorde al título del suero). Transcurrido ese tiempo, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG totales de conejo, preparado en cabra, conjugado con la peroxidasa de rabanito picante (Pierce), en una dilución final de 1/10000. Entre cada paso de incubación se realizaron lavados con solución de PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v). Las diluciones de los sueros y anticuerpos fueron realizadas con solución PBS 1X suplementada de leche descremada al 1% (p/v). La reacción de revelado se llevó a cabo empleando el reactivo de detección *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.4. Concentración de soluciones de proteínas

Para la concentración de soluciones proteicas, se emplearon dispositivos de ultrafiltración Amicon (Millipore), con un tamaño de poro (MWCO) apropiado para cada proteína a concentrar, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

3.5.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteínas totales se realizó mediante la técnica de *Bradford* (Bradford, M.M. 1976), utilizando patrones de BSA (Sigma). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm, en un espectrofotómetro UV-Vis Boeco Germany S26.

Para las proteínas pequeñas o soluciones con alta concentración de detergentes, la cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido

bicinconínico (BCA), utilizando el kit comercial *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), según las indicaciones del fabricante.

3.6. Expresión y Purificación de proteínas recombinantes

3.6.1. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes

Las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción de interés se hicieron crecer en medio LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) o kanamicina ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$), dependiendo del caso, toda la noche a 37°C y con agitación de 180 rpm. Posteriormente, se realizó una dilución de 1/100 del cultivo saturado obtenido en medio LB fresco con antibiótico y se lo incubó en iguales condiciones hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,5 - 0,6$. En estas condiciones se realizó la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes con el agregado de IPTG $0,1 - 0,5 \text{ mM}$ y se volvió a incubar durante 4-16 h, a $25-30^\circ\text{C}$ y con agitación de 180 rpm. El tiempo de inducción se ajustó de forma de optimizar la expresión de la proteína recombinante. Finalmente las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardaron los paquetes celulares a -20°C para su posterior uso.

3.6.2. Disrupción celular y preparación de extractos crudos

Los paquetes celulares fueron resuspendidos en 1/10 del volumen del cultivo original con la solución apropiada para purificación u otras finalidades. La ruptura celular fue llevada a cabo usando un procesador ultrasónico de alta intensidad Vibra-cell TM VCX-600 (*Sonics & Materials Inc.*) con pulsos de 30 s durante una sesión de 3-10 min en baño de hielo. Los lisados celulares se centrifugaron a 4°C y 18000 rpm durante 15-30 min, con el fin de separar fracciones soluble e insoluble. El sobrenadante obtenido fue utilizado para la purificación de la proteína de interés, o almacenado a -20°C para posteriores análisis.

3.6.3. Cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC)

Para purificar proteínas recombinantes que fueron fusionadas a etiquetas de polihistidina (*His-tag*), se realizó una cromatografía de afinidad utilizando una columna de IDA-*Sepharose* HisTrap HP (*GE Healthcare*) de 1 ml cargada con Ni^{2+} y equilibrada con solución A (Tris-HCl 20 mM; NaCl 400 mM; imidazol 10 mM; pH 7,5).

Las células fueron resuspendidas y lisadas en la solución A. Luego de la siembra, la columna se lavó con 15 volúmenes de columna de solución A. La elución se realizó mediante un gradiente lineal de 10 a 300 mM de imidazol (solución B: Tris-HCl 20 mM; NaCl 400 mM; imidazol 300 mM; pH 7,5), recolectando fracciones de 2 ml. Las fracciones que contenían la proteína se recuperaron y se concentraron por ultrafiltración. Posteriormente, las proteínas se examinaron mediante SDS-PAGE y se almacenaron a -80 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v).

3.6.4. Cromatografía de afinidad por unión a amilosa

Para purificar las proteínas recombinantes que fueron fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP, del inglés *Maltose-Binding Protein*), se realizó una cromatografía de afinidad empleando una matriz amilosa-agarosa (New England Biolabs) de 1 ml equilibrada con solución A (Tris-HCl 20 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0). El paquete celular fue resuspendido con solución A y seguidamente lisado. El extracto proteico soluble obtenido se sembró en la columna previamente equilibrada. A continuación ésta se lavó con solución A (10 volúmenes de columna). La elución de la proteína recombinante se realizó mediante el agregado de solución B (Tris-HCl 20 mM; NaCl 300 mM; pH 8,0 y maltosa 10 mM). Posteriormente, la calidad de las fracciones obtenidas se examinaron mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenía a la proteína de interés se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración para su posterior almacenamiento a -80 °C en presencia de glicerol al 15% (v/v).

3.6.5. Digestión proteolítica de las proteínas de fusión

Las proteínas recombinantes fusionadas a *His-tag*, se trataron con trombina (Novagen) en una relación 1:100 o 2:100 (U:µg) de enzima a la proteína sustrato con *His-tag* a 8 °C por 16 h en un medio de reacción conteniendo: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM y CaCl₂ 2 mM. Alternativamente, las proteínas recombinantes fusionadas a MBP, se trataron con TEV-proteasa (obtenida en forma recombinante previamente en el laboratorio) en una relación 1:100 (µg:µg) de proteasa a proteína a digerir a 8 °C por 16 h en una mezcla de reacción compuesta por: Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; DTT 1 mM. En ambos casos y en forma paralela a la respectiva reacción de digestión, se realizó un control negativo en ausencia de proteasa.

3.7. Métodos analíticos

3.7.1. Cromatografía de filtración por gel

La masa molecular nativa relativa (M_r) de las proteínas recombinantes se determinó mediante cromatografía de filtración por gel, empleando una columna *Superdex 200 HR Tricorn* (GE- Healthcare), equilibrada con HEPES 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM y EDTA 0,1 mM. La cromatografía se realizó a 4 °C, utilizando un flujo de equilibrado de 0,4 ml. min⁻¹ y un flujo de elución de 0,2 ml. min⁻¹. La M_r de la proteína de interés fue determinada empleando una curva de calibrado, la cual se construyó graficando el logaritmo de las masas moleculares de proteínas estándares (log MM) *versus* los coeficientes de distribución obtenidos (K_{av}) para cada uno de ellos. Los estándares empleados fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa A (13.7 kDa) y aprotinina (6.5 kDa) (*Gel Filtration Calibration Kit* - GE Healthcare).

3.7.2. Determinación de flavinas

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de flavinas presentes en las proteínas recombinantes, primeramente se realizó la extracción de los grupos prostéticos mediante un tratamiento térmico. Puntualmente, las proteínas recombinantes purificadas se calentaron a 95 °C durante 10 min para liberar sus cofactores. Luego de centrifugar, se recuperó el sobrenadante de las proteínas desnaturizadas. Una alícuota del sobrenadante se sembró y resolvió mediante cromatografía en capa delgada (TLC) empleando placas de sílica soportadas sobre aluminio (Merck). El solvente de corrida consistió de butanol/ácido acético/ agua en una relación 12:3:5. Se utilizaron soluciones de FAD y FMN como estándares. Los *spots* fueron visualizados haciendo uso de su fluorescencia intrínseca, mediante un dispositivo *Typhoon scanner* (GE Healthcare) (Arias, D.G. y col. 2012; Regner, E.L. y col. 2014). Determinada la naturaleza del cofactor, su concentración fue cuantificada espectrofotométricamente a 450 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar 11,3 mM⁻¹. cm⁻¹.

3.7.3. Cuantificación de tioles totales

La determinación cuantitativa de los grupos tioles (-SH) en proteínas se realizó empleando el reactivo de Ellman [5,5'-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzoico), DTNB]. Éste reacciona con los grupos -SH liberando 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) el cual absorbe a 405 nm. La reacción se llevó a cabo incubando la proteína con DTNB 1 mM en Tris-HCl pH 7,5, durante 30 min a 25 °C y en oscuridad. Para el cálculo se empleó un coeficiente de extinción molar de 13,6 mM⁻¹. cm⁻¹ y se consideró que un mol de TNB generado representa un mol de -SH libre (Riener, C.K. y col. 2002).

3.7.4. Cuantificación de ácido sulfénico en residuos de Cys presentes en proteínas

La presencia de ácido sulfénico (-SOH) presente en proteínas se determinó por incubación de las mismas con 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-HCl), en relación 1:10 (proteína: reactivo) por 30 min a 30 °C. Finalizada la incubación, se realizó un barrido espectral de absorbancia desde 250 a 500 nm. El aducto formado con NBD y los grupos -SH y el -SOH, presenta un pico de absorción característico a 420 nm y 350 nm, respectivamente. Para el cálculo de las Cys en cualquiera de sus dos estados, se empleó un coeficiente de extinción molar de 13 mM⁻¹. cm⁻¹ (Turell, L. y col. 2008; Hugo, M. y col. 2009). Las reacciones se realizaron en *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0.

3.7.5. Determinación de cofactores metálicos presentes en proteínas

La cuantificación de átomos metálicos (principalmente Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺o Co²⁺) presentes en las proteínas recombinantes puras se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica utilizando un servicio a terceros (SECEGRIN - CCT CONICET Santa Fe). Con los resultados recopilados se procedió a la determinación de la ocupación: x mol metal/mol proteína (monómero).

3.7.6. Determinación del potencial de reducción estándar de TRX.

El potencial redox de la *LinTrx* fue determinado siguiendo cambios en la absorbancia a 340 nm y a 30 °C. Para esto, se adicionaron diferentes cantidades de la *LinTrx* oxidada (15-30 µM) a una mezcla de reacción conteniendo *buffer* fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0, EDTA 2 mM, *LinTrxR* 0,5 µM y NADPH 0,1 mM. Los

potenciales estándar de reducción fueron calculados por medio de la ecuación de Nernst, basado en la concentración de los reactantes en el equilibrio redox, tal como fue descrito previamente (Arias, D.G. y col. 2008). Como potencial de reducción estándar del NADPH a pH 7,0 se usó un valor de -320 mV.

3.7.7. Espectroscopia de absorbancia UV-visible de las proteínas recombinantes puras

Los espectros de absorbancia UV-visibles de las proteínas fueron determinados en un espectrofotómetro Boeco S-26 a 25 °C. La línea de referencia fue realizada con el *buffer* donde se encontraba disuelta la proteína.

3.7.8. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de las proteínas recombinantes puras

Para determinar los cambios de fluorescencia intrínseca de las proteínas recombinantes puras frente a distintos estados redox, estas fueron incubadas a concentración de 5 μ M en presencia de DTT 1 mM, GSSG 1 mM o GSH 1 mM, durante 10 min a 30 °C en un volumen final de 1 ml en *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0. Los espectros de emisión fueron evaluados utilizando un espectrofluorímetro Lambda 20 (PerkinElmer) usando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

3.7.9. Ensayos de auto-glutacionilación de las glutarredoxinas recombinantes

La glutacionilación de *Lin2CGrx*, *Lin1CGrx* o *LinTrx* fue evaluada usando el fluoróforo dieosina glutación disulfuro (Di-E-GSSG) (Cayman Chemical, USA) siguiendo el protocolo anteriormente descrito por Marquez, V.E. y col. (2014). Las proteínas recombinantes (1 μ M) se incubaron con Di-E-GSSG 10 μ M en *buffer* Tris-HCl 100 mM 7,5, durante 15 min a 30 °C. Finalizada la incubación, las muestras se resolvieron por SDS-PAGE no reductor. Las proteínas glutacioniladas se identificaron mediante el escaneo fluorescente (fluorescencia emitida por el isotiocianato de eosina, $\lambda_{\text{excitación}} = 518 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 545 \text{ nm}$) utilizando el equipo *Typhoon*® 9400 (GE Healthcare). Finalmente, el gel fue teñido utilizando tinción con plata para evaluar el contenido total de las proteínas resueltas.

3.7.10. Ensayos de nitrosilación de las redoxinas recombinantes

Una alícuota de 100 μl de las proteínas recombinantes concentradas, *LinTrx* y *Lin1CGrx*, se incubó sucesivamente en presencia de DTT (en exceso molar 1:100) y luego con GSNO (en exceso molar 1:5), durante 15 min y a 30 °C. Los excesos de ambos agentes se eliminaron mediante desalado con empleo de una matriz *Sephadex-G25*. Sobre una alícuota obtenida luego de cada uno de los tratamientos, fueron realizadas las siguientes determinaciones: (i) se efectuó un espectro UV-visible, (ii) se cuantificaron los tioles empleando para ello DTNB, y (iii) se midió actividad enzimática. Para determinar la concentración de -SNO se usó un $\epsilon_{335\text{nm}} = 0,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para estimar la concentración de proteína se empleó $\epsilon_{280 \text{ nm}}$, calculado en forma teórica a partir de la secuencia primaria mediante el empleo del *software* Vector NTI 10.0.

3.7.11. Determinación del contenido de GSH acomplejado al centro de Fe-S

Para evaluar el contenido de GSH que forma parte de los centros Fe-S, se empleó un método cinético (Rahman, I. y col. 2006). Para ello se procedió de la siguiente manera: la *Lin1CGrx* formando un complejo con Fe-S se incubó con EDTA 2 mM por 15 min a 100 °C. Luego, se colocó la mezcla de reacción en hielo por 5 min, posteriormente se centrifugó a 15000 rpm por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. El contenido de GSH de la muestra obtenida se determinó mediante el monitoreo de la oxidación de la reducción de DTNB espectrofotométricamente a 405 nm empleando una mezcla de reacción (50 μl de volumen final) conteniendo *buffer* fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; glutatión reductasa de *S. cerevisiae* comercial (Sigma) 0,05 U. ml⁻¹; EDTA 2 mM; DTNB 1 mM; NADPH 200 μM y 10 μl de la muestra de GSH incógnita. Para la estimación de la concentración de GSH total en la muestra incógnita se construyó una curva de calibrado (v_i vs [GSH]).

3.8. Ensayos enzimáticos

Los ensayos se realizaron a 30 °C, en un volumen final de 50 μl , empleando el equipo *Multiskan Ascent one-channel vertical light path filter photometer* (Thermo Electron Co.). Se definió la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima capaz de catalizar la conversión de 1 μmol de sustrato por min, bajo las condiciones especificadas en cada caso. Las curvas de saturación se efectuaron utilizando

concentraciones variables del sustrato en estudio y una concentración fija del cosustrato. Los datos cinéticos fueron graficados como la velocidad inicial ($\mu\text{M min}^{-1}$ o U. mg^{-1}) versus la concentración del sustrato (μM o mM). Los parámetros cinéticos se calcularon mediante regresión no lineal según el modelo de Michaelis-Menten, utilizando el programa Origin™ 8.0. Los parámetros cinéticos reportados representan el promedio de un mínimo de tres determinaciones independientes, reproducibles dentro de un rango de $\pm 10\%$. En el estudio de inhibidores, el parámetro IC_{50} refiere a la concentración de inhibidor que disminuye la actividad inicial al 50% (Copeland, R.A. 2005). A menos que se indique lo contrario, en los ensayos en donde se siguió la oxidación de NAD(P)H espectrofotométricamente a 340 nm, se empleó su coeficiente de extinción molar de $6,23 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la realización de los respectivos cálculos. Por otro lado, en los ensayos donde se siguió la reducción del DTNB espectrofotométricamente a 405 nm, para los cálculos de actividad se empleó un coeficiente de extinción molar de $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y se consideró la relación estequiométrica 1 mol de NADPH genera 2 moles de TNB (Holmgren, A. 1979).

3.8.1. Preparación de extractos proteicos a partir de cultivos de leptospiras para realizar determinaciones enzimáticas

Para la determinación de las diferentes actividades enzimáticas fue necesario realizar un *pool* de las biomásas provenientes de tres réplicas biológicas (cultivos en fase exponencial de *Leptospiras* spp. en medio EMJH). A ese paquete celular se le adicionó 1 ml de *buffer* correspondiente para cada determinación a realizar y EDTA 2 mM. La lisis celular se realizó mediante 3 ciclos de congelado (a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$) y descongelado (a $37 \text{ }^\circ\text{C}$), y esto se completó a través de sonicado empleando el procesador ultrasónico de alta intensidad *Vibra-cell*™ VCX-600 (*Sonics & Materials Inc.*). El lisado celular se centrifugó por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y a 15000 rpm. El extracto proteico soluble (sobrenadante) obtenido fue empleado para realizar las determinaciones.

3.8.2. Determinación de la capacidad de reducción de DTNB

La actividad DTNB reductasa fue ensayada por seguimiento de la producción de TNB, monitoreando la absorbancia a 405 nm. La mezcla de reacción estaba compuesta por *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μM , DTNB

1 mM y *LinTrx* 20 μ M. La reacción se inició por la adición de *LinTrxR* o *LbiTrxR1* en un rango de 3-1000 nM. Los estudios cinéticos se realizaron empleando NADPH en un rango de 3 a 200 μ M, *LinTrx* de 0,5 a 20 μ M y *LinTrxR* a una concentración final de 17 nM.

3.8.3. Estudios de inhibición de actividad DTNB reductasa

Los ensayos de inhibición de la actividad disulfuro reductasa de *LinTrxR* o *LbiTrxR1* se llevaron a cabo utilizando DTNB, siguiendo su reducción espectrofotométricamente a 405 nm. El medio de reacción se componía de *buffer* fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; DTNB 1 mM, *LinTrx* 1 μ M y diferentes concentraciones del inhibidor en estudio. La reacción se inició por la adición de la enzima a concentración final de 17 nM. En la **Tabla 3** se detallan los inhibidores evaluados en este estudio.

Tabla 3 | Inhibidores ensayados para la actividad DTNB reductasa de *LinTrxR* y *LbiTrxR1*.

Inhibidor	Concentración (μ M)
NADP ⁺	500-100
Co ²⁺	1,6-100
Zn ²⁺	1,6-100
Cu ²⁺	1,6-100
Hg ²⁺	0,2-10
Piocianina	1,6-100
Azul de metileno	0,009-6,25
Mercurocromo	0,05-3
Quercetina	1,6-100

3.8.4. Determinación de la actividad disulfuro reductasa del sistema Trx

La actividad disulfuro reductasa del sistema Trx fue determinada monitoreando la oxidación del NADPH espectrofotométricamente a 340 nm en una mezcla de reacción conteniendo *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; *LinTrxR* 1 μ M, *LinTrx* 0,25-16 μ M y GSSG 15-1000 μ M, Cys 15-1000 μ M, lipoamida 20-200 μ M, o bis- γ -glutamilcisteína 20-200 μ M (Arias, D.G. y col. 2008).

Una solución de bis- γ -glutamilcisteína de 10 mM se preparó en el laboratorio, a través de la mezcla de γ -glutamilcisteína 20 mM con H_2O_2 10 mM en *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8,0 por 1 h a temperatura ambiente. Para corroborar la oxidación completa del tior, se cuantificaron los tioles totales utilizando el procedimiento descrito previamente (Sección 3.7.3.).

3.8.5. Ensayo de reducción de S-nitrosotioles

La capacidad del sistema Trx de reducir S-nitrosotioles fue medida siguiendo la oxidación del NADPH espectrofotométricamente a 340 nm en una mezcla de reacción conteniendo *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; *LinTrxR* 1 μ M, *LinTrx* 2,5-32 μ M y S-nitrosocisteína (CysNO), S-nitrosoglutatión (GSNO), o S-nitroso- γ -glutamilcisteína (γ -GCSNO), a una concentración final de 0,125 a 1 mM. Los S-nitrosotioles fueron preparados de acuerdo a la metodología descrita por Arias, D.G. y col. (2012).

3.8.6. Ensayo de actividad diaforasa del sistema Trx

La actividad diaforasa del sistema Trx fue medida por monitoreo de la oxidación del NADPH espectrofotométricamente a 340 nm en una mezcla de reacción compuesta por *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; *LinTrxR* 17 nM y 2-metil benzoquinona (MBQ) 15-1000 μ M, ferricianuro de potasio 15-1000 μ M, 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), selenito de sodio 15-1000 μ M o 1,56-100 μ M de azul de metileno.

3.8.7. Reducción de hidroperóxidos por el sistema Trx

La capacidad del sistema Trx de reducir hidroperóxidos fue determinada siguiendo la oxidación del NADPH espectrofotométricamente a 340 nm, en una mezcla de reacción conformada por *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; *LinTrxR* 1 μ M, *LinTrx* 10 μ M, *LinAhpC* 0,06- 5 μ M, y H_2O_2 o *t*-BuOOH 100 μ M (Arias, D.G. y col. 2007).

3.8.8. Determinación de actividad catalasa

La actividad catalasa fue medida registrando el consumo de H_2O_2 espectrofotométricamente a 240 nm y a 25 °C. La mezcla de reacción estaba compuesta por *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; *Lincatalasa* 0,1-1 nM y H_2O_2 10 mM (Johnsson, K. y col. 1997). La enzima se obtuvo en forma recombinante a partir de la construcción cedida por la Dra. Caroline Cameron (*University of Victoria, Biochemistry/Microbiology Department, Canada Research Chair in Molecular Pathogenesis*) (Eshghi, A. y col. 2012).

3.8.9. Determinación de actividad peroxidasa de la *Lincatalasa*

Para evaluar la actividad peroxidasa de la *Lincatalasa*, se siguió la oxidación del 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS) espectrofotométricamente a 405 nm y a 30 °C, en una mezcla de reacción compuesta de *buffer* acetato de sodio pH 5,0, H_2O_2 o *t*-BuOOH 200 μM y en presencia de *Lincatalasa* 0,01-5 μM . Para los cálculos de actividad se empleó un coeficiente de extinción molar de 36,8 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Singh, R. y col. 2008).

3.8.10. Ensayo de inactivación de la catalasa por oxidantes

Para determinar la pérdida de actividad de la catalasa se pre-incubó la enzima a concentración 0,1 μM en presencia de diferentes cantidades de oxidante *t*-BuOOH, ácido hipocloroso (HClO) o CySNO 0; 0,1; 1 y 10 μM por 10 min a 30 °C. Luego, la enzima tratada se diluyó 1/1000 en el medio de reacción y se evaluó su actividad catalasa, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

3.8.11. Evaluación de la actividad glutamato cisteína ligasa

Para ensayar la actividad de la enzima se hizo uso de la reacción colorimétrica basada en la propiedad que tiene el Pi de formar el complejo de color fosfo-molibdato-Verde de Malaquita, el cual es cuantificable espectrofotométricamente a 630 nm (Fusari, C. y col. 2006). En todos los casos, las reacciones se desarrollaron durante 10 min a 37 °C, sin alcanzar un consumo de sustrato mayor al 10%. La reacción se detuvo con la adición de 375 μl del reactivo de color, seguido por el agregado de 50 μl de citrato de sodio 34% (p/v). Una alícuota de 250 μl de esta mezcla se dispensó en

policubetas de ELISA y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA *Thermo Fisher Microplate Photometer Multiskan Ascent* (Thermo Scientific). Paralelamente a la determinación, se estableció una curva de calibrado con testigos de Pi y se obtuvo el factor de conversión de DO a nmoles. El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de *Verde de Malaquita* (Sigma) al 0,045% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5 N. Luego de homogeneizar durante 20 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 µl de Tween 20 al 2% (v/v). Se utilizó un medio de reacción que contenía: Tris-HCl 100 mM pH 8,0, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, Cys 1 mM, ácido glutámico 1 mM y 11 µg. ml⁻¹ de enzima. Alternativamente, se evaluó la capacidad de la *LinGCL* de emplear otros sustratos alternativos: GTP, serina, ácido aspártico, γ -glutamil cisteína (γ -GC) o glicina, todos a concentración final de 1 mM. Además, se evaluó la capacidad de la enzima de utilizar Mn²⁺ en lugar de Mg²⁺, reemplazándose el MgCl₂ por la misma concentración de MnCl₂ (10 mM). Alternativamente, se ensayó el efecto inhibitorio de diferentes compuestos sobre la actividad enzimática: ADP, cistina, GSH, GSSG, γ -GC y Bis- γ -GC, a concentración final de 1 mM.

3.8.12. Ensayo de reducción de la insulina bovina

La evaluación de la capacidad de la *LinTrx* o las *LinGrxs* recombinantes de reducir disulfuros proteicos se llevó a cabo mediante el ensayo de reducción de insulina (Holmgren, A. 1979). La mezcla de reacción contenía EDTA 2 mM, *buffer* fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), 100 µM de insulina, 0,5 mM de DTT y 1, 10 y 100 µM de las proteínas recombinantes, en un volumen final de 100 µl. Todos los componentes de la reacción, excepto la insulina, fueron incubados a 25 °C durante 10 min. Luego, se adicionó la insulina y el incremento de la turbidez fue seguido a 630 nm en un lector de placas *Multiskan Ascent one-channel vertical light path filter photometer* (Thermo Electron Co.). Como control negativo, en la reacción se omitió la adición de las proteínas recombinantes.

3.8.13. Ensayo de reducción de hidroxietildisulfuro mediada Grxs

La reducción de 2-hidroxietil disulfuro (HED) se evaluó siguiendo la oxidación de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm, según lo descrito en Marquez V.E. y col. (2010). La mezcla de reacción contenía *buffer* fosfato de potasio

100 mM, pH 7,0; EDTA 2 mM; GSH 3 mM; NADPH 200 μ M; glutatión reductasa de *S. cerevisiae* comercial (Sigma) 1 U ml⁻¹ y *Lin1CGrx* 0,1-200 μ M o *Lin2CGrx* 0,1-1,8 μ M. La reacción se inició con la adición de HED a concentración final de 1 mM.

3.8.14. Determinación de actividad dehidroascórbico reductasa de Grxs

La reducción de dehidroascorbato (DHA) mediada por la *Lin2CGrx*, dependiente de GSH, fue ensayada empleando una metodología descrita en Arias, D.G. y col. (2013). La mezcla de reacción se componía por *buffer* fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0; GSH 3 mM; glutatión reductasa de *S. cerevisiae* comercial (Sigma) 1 U. ml⁻¹; DHA 1 mM y *Lin2CGrx* 0,1-0,4 μ M.

3.8.15. Determinación de la actividad MetSO reductasa

La actividad MetSO reductasa de la *LinMsrB* Δ 35N y de la *LinMsrA2* fue medida por seguimiento de la oxidación de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm a 30 °C. Como dador de electrones para ambas Msrs se evaluó la Trx o la 2CGrx. La mezcla de reacción contenía *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; EDTA 2 mM; NADPH 200 μ M; *LinTrxR* 2 μ M o glutatión reductasa de *S. cerevisiae* comercial (Sigma) 1 U ml⁻¹; *LinTrx* 20 μ M o *Lin2CGrx* 10 μ M (en presencia de GSH 3 mM); y *LinMsrA2* entre 0,01 a 0,8 μ M o *LinMsrB* Δ 35N entre 0,1 a 100 μ M. Las reacciones se iniciaron por adición de L-MetSO a una concentración final de 5 mM. Los estudios cinéticos en estado estacionario se realizaron utilizando L-MetSO 0,1-5 mM, N-AcMetSO 0,1-5 mM, *LinTrx* 0,1-15 μ M o *Lin2CGrx* 0,1-20 μ M. En forma paralela, se evaluó la capacidad de reducción de MetSO y sus isómeros individuales por acción de la *LinMsrA* o de las diferentes versiones de la *LinMsrB*. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo las siguientes concentraciones: *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; DTT 10 mM, MetSO (mezcla racémica), Met(S)SO o Met(R)SO 1 mM y 100 μ M de cada una de las proteínas recombinantes. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente se sembraron 6 μ l de cada mezcla de reacción en una placa de TLC (sílica soportada en aluminio, Merck). El solvente de corrida fue butanol/ácido acético/agua (60:15:25). La placa se reveló mediante espray de una solución de ninhidrina (Hibi, T. y col. 2004).

3.8.16. Reducción de *LinMsrBA35N-SO* por 2-nitro-5-tio-benzoato como reductor

La reducción de *LinMsrBA35N-SO* (forma de sulfenato), se midió siguiendo la disminución de la concentración de 2-nitro-5-tio-benzoato (TNB) espectrofotométricamente a 405 nm a 30 °C. La mezcla de reacción estaba constituida por Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, TNB 200 μ M, *LinMsrBA35N* en diferentes concentraciones 0; 25; 50 y 100 μ M. La reacción se inició con MetSO 5 mM.

Para la síntesis y purificación del TNB se procedió del siguiente modo: a una solución de DTNB 5 mM, disuelto en Tris-HCl 100 mM pH 8,0, se le adicionan 100 mM de β -mercaptoetanol, esta mezcla se incubó por 30 min a 30 °C. Luego de ese tiempo, se eliminó el exceso de β -mercaptoetanol realizando una cromatografía de intercambio iónico en una columna de *Q-Sepharose* (GE Healthcare). La matriz se equilibró y se lavó con Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Finalmente, el TNB se eluyó con HCl 50 mM. La cuantificación de TNB obtenido se determinó espectrofotométricamente a 412 nm empleando un coeficiente de extinción molar de 13,6 mM⁻¹. cm⁻¹ (Hugo, M. y col. 2009).

3.8.17. Determinación de actividad glutatión reductasa

Para evaluar actividad GR se siguió la oxidación de NADPH espectrofotométricamente a 340 nm y a 30 °C. La mezcla de reacción consistía de *buffer* fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; NAD(P)H 200 μ M, EDTA 2 mM y diferentes cantidades del extracto celular. La reacción se inició por el agregado de GSSG 1 mM. (Mannervik, B. 2001).

3.8.18. Determinación de actividad glutatión-S-transferasa

La determinar actividad glutatión-S-transferasa se realizó monitoreando el incremento de la absorbancia a 340 nm y a 30 °C. Ese aumento de la absorbancia es resultado de la conjugación del grupo tiol del glutatión al 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), y la cantidad del aducto es directamente proporcional a la absorbancia registrada. La mezcla de reacción estaba compuesta de fosfato de potasio 100 mM pH 7,0; CDNB 1 mM; EDTA 2 mM y diferentes cantidades del extracto celular. La reacción se inició con la adición de GSH 1 mM. Para los cálculos se empleó un coeficiente de extinción molar de 9,6 mM⁻¹. cm⁻¹ (Habig, W.H. y col. 1974).

3.8.19. Medida de actividad catalasa en gel

A un volumen final de 800 μ l de una suspensión de leptospiras (a $DO_{420nm} \sim 0,5$ en PBS estéril) se incubó a 28 °C por 15 o 30 min, en ausencia o presencia de *t*-BuOOH (25 o 50 μ M). Después de esto, los cultivos fueron cosechados a 15000 rpm por 10 min a 4 °C. El *pellet* celular fue recuperado y disgregado usando para ello, *BugBuster® Protein Extraction Reagent* (Merck Millipore). El lisado celular se centrifugó, se recuperó el sobrenadante y se determinó el contenido proteico con el método de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). Las proteínas se separaron utilizando PAGE nativo al 8% (p/v) y posteriormente se evaluó la actividad catalasa siguiendo el protocolo descrito por Weydert, C.J. y col.(2010), empleando como control catalasa comercial de *Aspergillus niger* (Sigma).

3.9. Ensayos sobre cultivos de *E. coli*

3.9.1. Ensayo de tolerancia al estrés

Para el ensayo de inhibición en disco, células de *E.coli* recombinantes (transformados con pET28c, pET28c/*LinTrxR*, pET28c/*LbiTrxR1* y pET28c/*LbiTrxR2*), fueron crecidas toda la noche a 37 °C en LB conteniendo kanamicina (50 μ g. ml⁻¹), luego fueron diluidas 1/50 en medio fresco y crecidas hasta una $DO_{630 nm} \sim 0,6$. Esas células se indujeron con IPTG 0,1 mM por 1 h. Posteriormente, 200 μ l de la suspensión celular (a $DO_{630 nm}$ normalizada de $\sim 0,1$), se adicionaron en LB-agar al 0,65% (p/v) fresco (*Top soft agar*) en presencia de IPTG 0,1 mM y kanamicina (50 μ g. ml⁻¹). Esta mezcla se colocó rápidamente sobre placas de LB-agar al 2 % (p/v). Finalmente, sobre el centro de las placas se colocó un disco de papel estéril de 6 mm de diámetro y sobre el mismo se adicionó 5 μ l de diferentes agentes: metil viológeno (MV) 1 M, diamida 500 mM, 2-metil-benzoquinona (MBQ) 100 mM, H₂O₂ 1 M o *t*-BuOOH 10 mM. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se les midió el halo de inhibición del crecimiento celular y los resultados obtenidos se procesaron con el programa Origin™ 8.0 empleando el *test-ANOVA* de una vía.

3.9.2. Titulación de tioles totales

Células de *E. coli* recombinantes transformados con pMAL-C-TEV y pMAL-C-TEV/*LinGCL* (vector cedido por *el Dr. Wulf Blankenfeldt del Helmholtz Centre*

for Infection Research, Alemania) en las cuales se indujo la expresión de la proteína de interés, tal como se describió en la sección anterior, fueron normalizadas de acuerdo a su $DO_{630\text{ nm}}$ y se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se guardaron los paquetes celulares a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior uso. Éstos, se resuspendieron en 800 μl de ácido tricloroacético 10% (v/v) y se centrifugaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min a 15000 rpm. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, al cual se lo neutralizó con *buffer* Tris-HCl 1M pH 8,0 (por cada 100 μl de sobrenadante acidificado se adicionó 200 μl de *buffer*) y sobre éste se procedió a la cuantificación de tioles totales (descrito en el punto 3.7.3.) y GSH. El número de tioles y/o GSH por bacterias se infirió teniendo en cuenta que una $DO_{630\text{ nm}} = 1$ equivale a $7 \cdot 10^8$ células de *E. coli* ml^{-1} .

3.10. Ensayos sobre cultivos de *S. cerevisiae*

3.10.1. Evaluación de la funcionalidad de las glutarredoxinas monotiólicas

Las cepas de *S. cerevisiae* MML19, MML39 y CML235 transformadas con distintas construcciones del plásmido p425-GPD, se cultivaron en diferentes condiciones para evaluar e inferir la funcionalidad de la 1CGrx en *L. interrogans*. Para esto, las diferentes cepas se utilizaron para inocular cultivos en medio SD-glucosa de modo de obtener una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0,2$. Los cultivos se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo suficiente para alcanzar una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0,8$. Posteriormente, las células fueron contadas en la cámara de Neubauer utilizando azul de metileno para determinar la proporción de células viables. Se prepararon suspensiones conteniendo $5 \cdot 10^6$ cel. ml^{-1} (células viables) y a partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas 1/5 en PBS (KH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4) estéril. De cada una de estas suspensiones se sembraron 5 μl en forma de *spots*, en placas con diferentes medios sólidos, a los fines de evaluar la capacidad de proliferación en medios conteniendo fuentes de carbono fermentable y no fermentable. Así, se sembraron en placas de YPD-agar y de YPG-agar suplementado con H_2O_2 0; 0,5; o 1 mM. También se sembraron placas de SD-glucosa y SD-glicerol, suplementado con H_2O_2 0; o 0,5 mM. Una vez sembradas, las placas fueron incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta observar desarrollo de las colonias de levaduras.

3.10.2. Medida de la respiración celular

La tasa de consumo de oxígeno se midió en las cepas de *S. cerevisiae* “parental” (CML235), mutante (MML19: *Δgrx5*) (el genotipo se detalla en 3.2.3), ambas transformadas con el [p425-GPD] y la mutante complementada con la construcción recombinante [p425-GPD/*Lin1CGrx*]. Las cepas de levaduras mencionadas fueron crecidas entre 24-48 h en medio SD líquido suplementado con los aminoácidos necesarios para revertir sus auxotrofías. Previo a las mediciones se normalizó la densidad celular de todas las cepas a una $DO_{600nm} = 0,6$ en el mismo medio empleado para crecerlas. Las mediciones fueron realizadas a 28°C empleando un electrodo para oxígeno tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK), siguiendo para ello las especificaciones del fabricante. Los valores fueron obtenidos en $nmol\ O_2 \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$, y luego fueron relativizados a la tasa de consumo de la cepa parental. Para cada muestra fueron realizadas al menos tres réplicas analíticas y dos réplicas biológicas.

3.10.3. Evaluación de la funcionalidad de las Msr

Se utilizaron células de *S. cerevisiae* GY202 y W303-1B transformadas con distintas construcciones del plásmido p425-GPD. Para evidenciar el proceso de complementación, se realizaron estrías de cada clon obtenido en una placa de Petri conteniendo SD-glucosa, pero en donde la Met fue reemplazada por MetSO 100 μM . Las placas se cultivaron a 28 °C hasta visualización de crecimiento de las levaduras.

Para los ensayos de estrés, suspensiones celulares conteniendo $5 \cdot 10^6$ cel. ml^{-1} , se incubaron a 28 °C por 1 h en presencia o ausencia de los agentes oxidantes, H_2O_2 0,1 y 1 mM o HClO 0,1 mM. Cumplido ese tiempo se realizaron diluciones seriadas 1/5 y finalmente, 5 μl de cada dilución se sembraron en YPD-agar se incubaron a 28 °C hasta observar desarrollo de las levaduras.

3.11. Ensayos sobre cultivos de *Leptospira* spp.

3.11.1. Evaluación de la sensibilidad a drogas

La toxicidad de diferentes drogas (piocianina, azul de metileno, mercurocromo, quercetina y ampicilina) sobre el crecimiento de *L. interrogans* fue evaluado usando bacterias en fase exponencial. La densidad celular fue normalizada a una $DO_{420nm} \sim 0,1$ en 1 ml de medio EMJH. Los cultivos bacterianos se expusieron a 0,1-100 μM de los

compuestos a evaluar por 5 días a 28 °C, y luego de ese tiempo se registró la densidad celular. La concentración que inhibe el 50% del crecimiento de las bacterias (IC₅₀) se determinó luego de aplicar regresión no lineal a los datos obtenidos.

3.11.2. Tolerancia al estrés oxidativo y detoxificación de peróxidos *in vivo*

La tolerancia a peróxidos exógenos de los cultivos de leptospiras se evaluó usando bacterias en fase exponencial de crecimiento, cuya densidad celular fue normalizada a una DO_{420nm} ~0,04 en PBS estéril. La suspensión bacteriana fue incubada a 28 °C por 4 h, con 0-10 mM H₂O₂ o *t*-BuOOH y *Alamar-Blue* (Thermo Scientific). Este último permitió determinar la viabilidad relativa, siguiendo para ello lo indicado por el fabricante.

Para evaluar la capacidad de detoxificar peróxidos que presentan las bacterias, a una suspensión de las mismas de DO_{420nm} ~0,04 en PBS estéril (provenientes de un cultivo en fase exponencial) fue incubada con 100 µM de H₂O₂ o *t*-BuOOH. Se tomaron muestras de los sobrenadantes a diferentes tiempos (a través de centrifugación a 15000 rpm por 10 min a 25 °C). La concentración de peróxido remanente en los sobrenadantes obtenidos fue determinado con el método de ferritocianato (Mihaljevic, B. y col. 1996).

3.11.3. Modulación de la expresión de proteínas de *Leptospira* spp. en situación de estrés oxidativo y/o nitrosativo

Los experimentos de modulación de la expresión de las proteínas objeto de estudio en presencia de oxidantes fueron realizados empleando cultivos en fase exponencial de *Leptospira* spp. Las células se cosecharon a 15000 rpm por 10 min a 25 °C, se lavaron dos veces con PBS estéril para eliminar los componentes residuales del medio. Luego, las células fueron incubadas en PBS estéril (volumen final de 1 ml y DO_{420nm} ~0,135) a 28 °C con diferentes oxidantes (*t*-BuOOH, H₂O₂, NaClO o CySNO) en las concentraciones y tiempos, establecidos para cada caso en particular. Posteriormente las células se cosecharon a 15000 rpm por 10 min a 25 °C y lisaron con *buffer* de muestra de SDS-PAGE. Los extractos proteicos fueron analizados por *western blot*, procediendo como se describe en el apartado 3.5.3.

3.11.4. Permeabilización de células de *L. interrogans* con digitonina

Se partió de un cultivo de *L. interrogans* en fase exponencial de ~30 ml y una $DO_{420nm} = 0,3$. Las células se lavaron con PBS 1X estéril 2 veces, se cosecharon, y resuspendieron en 1 ml de una solución de lisis que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM. A la suspensión bacteriana se le adicionó una solución de digitonina de $0,016 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se incubó a 28°C durante 10 min y se centrifugó a 15000 rpm a 4°C durante 15 min. Al *pellet* celular se lo resuspendió en 50 μl de *buffer* de muestra de SDS-PAGE reductor 1X. Esto representa a la fracción citoplasmática. Al sobrenadante previamente obtenido se le adicionó 3 volúmenes de acetona, se lo incubó 10 min en hielo, y se centrifugó nuevamente. Al *pellet* resultante se lo resuspendió en 50 μl con *buffer* de muestra de SDS-PAGE reductor 1X. Esto representa a la fracción periplasmática. Las dos fracciones obtenidas se hirvieron durante 5 min y se analizaron por *western blot* empleando los anticuerpos primarios anti-LinTrxR, anti-Lincatalasa y anti-LinMsrB Δ 35.

3.11.5. Identificación de proteínas sustratos de LinTrx a partir de extractos celulares de *L. interrogans* mediante el empleo de una cromatografía covalente

Se empleó una técnica similar al *biotin-switch* que es una técnica ampliamente utilizada para estudiar modificaciones redox en residuos de Cys en proteínas. Inicialmente, las proteínas que poseen tioles libres (no modificados) se eliminaron utilizando una cromatografía covalente. Posteriormente los residuos de Cys oxidados en las proteínas se reducen selectivamente con el sistema Trx, generando nuevos grupos tioles. Luego, estas proteínas con grupos tioles nacientes son aisladas (mediante cromatografía covalente). Un cultivo de *L. interrogans* (~40 ml) en fase exponencial de crecimiento ($DO_{420 \text{ nm}} \sim 0,4$) se lavó dos veces con PBS estéril. Luego, el *pellet* celular se resuspendió en 1 ml de PBS estéril y se incubó la suspensión celular con H_2O_2 2 mM por 30 min a 28°C . Después de la incubación se lavó nuevamente 2 veces con PBS estéril y se resuspendió el *pellet* celular en 1 ml de solución de lisis [NP-40 0,5% (v/v); Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; pH 8,0). Luego, se lisaron las células empleando el procesador ultrasónico de alta intensidad Vibra-cell TM VCX-600 (*Sonics & Materials Inc.*). El homogenato obtenido se centrifugó por 30 min a 4°C a 15000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Este último, fue incubó con 100 μl de *Activated Thiol Sepharose 4B* (GE Healthcare) durante 1 h a 25°C y en agitación (con el objeto de

eliminar proteínas que presenten tioles libres). Finalizada la incubación, se recupera la exclusión (sobrenadante ~900 μ l) y se separa en dos nuevas fracciones de ~450 μ l cada una. Posteriormente, cada fracción se incubó por 30 min a 30 °C con *LinTrxR* 0,5 μ M, *LinTrx* 1 μ M y NADPH 500 μ M o con *LinTrxR* 0,5 μ M, *LinTrx* 1 μ M en ausencia de NADPH (este último actúa como control negativo). Finalizada la incubación, y con el objeto de eliminar las proteínas recombinantes con His-Tag (*LinTrx* y *LinTrxR*), se le realizó una IMAC a cada una de las mezclas de reacción (ensayo incógnita y control negativo). A cada mezcla de reacción se le adicionó 600 μ l de solución de lisis y 20 μ l Ni^{2+} -IDA-*Sepharose*. Se incubaron por 15 min en agitación, luego se centrifugaron 15 min a 4 °C a 15000 rpm y se recuperó cada nuevo sobrenadante. Finalmente, estos se incubaron con 20 μ l de *Activated Thiol Sepharose 4B* (GE Healthcare) durante 1 h a 25 °C y en agitación, luego se lavó ocho veces con solución de lisis. La elusión de las proteínas se realizó por incubación de la resina con DTT 100 mM (en solución de lisis) a 37 °C por 15 min. Finalizada la incubación, se recuperaron los sobrenadantes y se procedió al análisis de las muestras. Se realizó un *pool* de tres réplicas biológicas tanto del experimento control negativo (en ausencia de NADPH) como del ensayo incógnita (en presencia de NADPH). Las muestras se analizaron mediante electroforesis bidimensional utilizando el equipo *Ettan IPGphor3™ Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare). Se empleó una *Immobiline DryStrip* de 7 cm y gradiente no lineal de pH (de 3-10). El acondicionamiento de las muestras se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de isoelectroenfocado fueron similares a las empleadas anteriormente (Pineyro, M.D. y col. 2011; Arias, D.G. y col. 2015). Para la segunda dimensión se realizó un SDS-PAGE 15%, el cual se reveló por tinción con plata. Los *spots* de interés se enviaron para su análisis mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas - Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay).

3. RESULTADOS

Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1: Sistemas enzimáticos antioxidantes en *Leptospira* spp.

4.1.1. Análisis de entidades enzimáticas con funciones antioxidantes en *Leptospira* spp.

Con la intención de comenzar a indagar sobre el escenario metabólico de óxido-reducción en estas bacterias, se determinó de manera exploratoria la actividad enzimática de diferentes enzimas en extractos proteicos provenientes de cultivos en fase exponencial de *L. biflexa* y *L. interrogans*. Las actividades enzimáticas se evaluaron siguiendo los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. Brevemente, extractos proteicos solubles fueron empleados en diferentes cantidades para realizar las determinaciones enzimáticas. La evaluación de la actividad catalasa, se realizó en *buffer* fosfato pH 7,0 a 30 °C, siguiendo la dismutación de H₂O₂ a 240 nm. Las medidas de las actividades tiorredoxina reductasa (TrxR), glutarredoxina (Grx), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) fueron realizadas en *buffer* fosfato pH 7,0 a 30 °C. Para tal fin se monitoreó la oxidación de NADPH (para TrxR, Grx y GR) o la conjugación de clorodinitrobenzeno (CDNB, para GST), ambos siguiendo la absorbancia a 340 nm. Por el contrario, las actividades glutatión sintetasa (GS) y γ -glutamyl-cisteína ligasa (GCL) se desarrollaron en un medio de reacción compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y se usó para ello la reacción colorimétrica basada en la propiedad que tiene el Pi de formar el complejo de color fosfo-molibdato/*Verde de Malaquita*, el cual es cuantificable a 630 nm espectrofotométricamente. Los resultados de las determinaciones se presentan en la **Figura 21**. Como conclusiones parciales de estas determinaciones, *L. interrogans* presenta mayores valores de actividades enzimáticas que *L. biflexa*; para catalasa, GCL, GR y GST. Las diferencias halladas entre estas especies bacterianas podrían estar relacionadas con el posible rol de esas enzimas en la patogénesis y/o virulencia, ya que es sabido que las mismas proveen defensa contra el daño oxidativo que, en otros organismos patógenos (Patel, M.P. y col. 1998; Lillig, C.H. y col. 2008; Lu, J. y col. 2014) es generado como resultado de la infección. Por otro lado, *L. interrogans* muestra actividades TrxR y Grx similares a la especie no patógena. La única entidad que exhibió mayor actividad en *L. biflexa* (en comparación con *L. interrogans*) fue la GS. Este resultado presume una discrepancia en cuanto al metabolismo del GSH entre ambas bacterias.

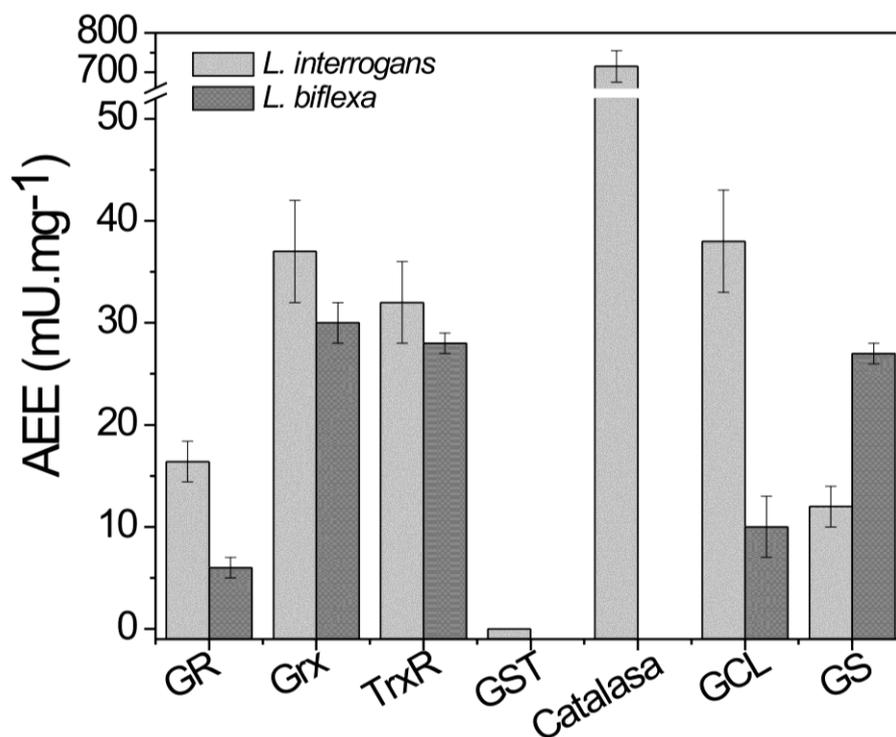


Figura 21| Medida de actividad de enzimas antioxidantes en extractos proteicos de *Leptospira* spp. Las actividades GR, Grx, TrxR, GST y catalasa se determinaron a 30 °C y *buffer* fosfato pH 7,0. Las actividades GCL y GS se determinaron a 37 °C y en *buffer* Tris-HCl pH8,0.

La elevada actividad catalasa detectada en los extractos bacterianos, concuerda con lo reportado previamente por diferentes autores (Corin, R.E. y col. 1978; Corin, R.E. y col. 1980; Austin, J.E. y col. 1981; Eshghi, A. y col. 2012). Además de esto, la informada importancia que significa la enzima para la patogenicidad de *L. interrogans*, motivó continuar su estudio, los resultados obtenidos se describen en este capítulo.

4.1.2. Obtención en forma recombinante de *Lincatalasa*

La *Lincatalasa* se obtuvo a partir de la purificación por IMAC de un sobrenadante de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) transformado con la construcción [pET28a/*Lincatalasa*]. La proteína expresada de este modo, posee una fusión a una cola de poli-His en el extremo N-terminal, adicionando aproximadamente 2 kDa a la masa de la proteína. A partir del análisis de la proteína recombinante purificada (>95%) por SDS-PAGE reductor y teñido con *Coomassie blue* puede observarse una banda correspondiente a una masa de ~41 kDa (Figura 22).

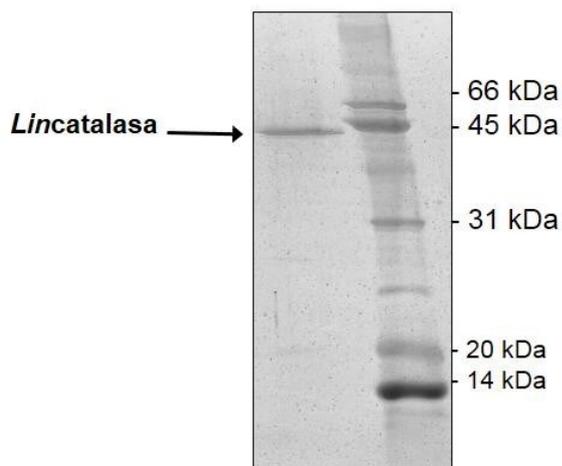


Figura 22 | Análisis electroforético de la Lincatalasa purificada. La proteína (2 μ g), obtenida luego de la purificación por IMAC fue resuelta en un SDS-PAGE reductor al 12 % y teñida con *Coomassie blue*.

4.1.3. Estudio de las propiedades cinéticas y estructurales de la *Lincatalasa*

4.1.3.1. Determinación de actividad catalasa y peroxidasa de la enzima recombinante

Tal como se mencionó previamente en la introducción, la catalasa de *L. interrogans*, es una proteína abundante y uno de los principales factores de virulencia, dado que es responsable de la viabilidad bacteriana ante la presencia de H_2O_2 (Rao, P.J. y col. 1964; Canale-Parola, E. 1977; Corin, R.E. y col. 1978; Corin, R.E. y col. 1980; Eshghi, A. y col. 2012). Si bien las cepas patógenas y no patógenas de leptospiras presentan genes codificantes para catalasa en sus genomas, estas no son proteínas homólogos y pertenecen a grupos diferentes de enzimas. *L. interrogans* tiene un gen homólogo a *katE* que codificaría para una hemo-catalasa monofuncional (Loewen, P. 1996), mientras que *L. biflexa* tiene un gen homólogo a *katG* que codificaría para una hemo-catalasa bifuncional (con actividad catalasa y peroxidasa) (Loewen, P. 1996). En relación a esto, se informó que mientras las especies patógenas (como *L. interrogans*) presentan fuerte actividad catalasa y baja o nula actividad peroxidasa, las especies no patógenas (como *L. biflexa*) muestran una fuerte actividad peroxidasa y débil actividad catalasa. Esta diferencia entre ambos tipos de especies, sugiere nuevamente que la catalasa juega un papel importante durante la infección en el huésped mamífero (Corin, R.E. y col. 1978; Corin, R.E. y col. 1980; Austin, J.E. y col. 1981).

En vista de la importancia que la *Lincatalasa* reviste para la supervivencia de la bacteria, en esta Tesis se han examinado diferentes propiedades bioquímicas de la misma. En primer lugar se buscó asignarle función de enzima mono o bifuncional

(catalasa o catalasa-peroxidasa), a la secuencia nucleotídica disponible en el proyecto genoma. Ambos tipos de enzimas exhiben alta actividad catalasa, y las bifuncionales exhiben además una actividad peroxidasa similar a la de las peroxidases convencionales (Chelikani, P. y col. 2004; Zamocky, M. y col. 2008). La actividad catalasa se cuantificó siguiendo el consumo de H_2O_2 , observándose una proporcionalidad entre la concentración de *Lincatalasa* y la velocidad de desaparición de H_2O_2 a pH 7,0. Por otro lado, la actividad peroxidasa se determinó utilizando una mezcla de reacción compuesta por ABTS, *Lincatalasa* y H_2O_2 o *t*-BuOOH, registrándose un incremento en la oxidación de ABTS a pH 5,0 o pH 7,0. Los resultados obtenidos indicaron que la actividad peroxidasa fue observada en presencia de H_2O_2 y a pH 5,0 (ver **Tabla 4**). Alternativamente, para eliminar el supuesto de que la falta de actividad peroxidasa en *buffer* fosfato pH 7,0, sea debido a una baja absorbancia del radical $ABTS^+$, se obtuvo este radical en forma aislada adicionando persulfato de amonio en una relación 10:1 a una solución acuosa de ABTS. A continuación se registró su absorbancia en las especies *buffers* en cuestión (*buffer* acetato de sodio pH 5,0 y *buffer* fosfato pH 7,0) y se obtuvo el mismo coeficiente de extinción molar en los diferentes medios de reacción. Esto muestra que la absorción del radical $ABTS^+$ no es dependiente del pH evaluado, esto mismo había sido informado por Re, R. y col. (1999). De un modo similar, se evaluó la actividad catalasa en *buffer* acetato de sodio pH 5,0, observándose una menor actividad de la misma en estas condiciones (**Tabla 4**). Esto posiblemente sea debido, a la protonación de la His distal, lo cual interferiría en la unión del H_2O_2 . Este fenómeno fue previamente descrito por Singh, R. y col. (2008). Los análisis *in silico* realizados (no mostrados), donde se compara su estructura primaria con la de catalasas (monofuncionales y bifuncionales) de otras fuentes indican que la *Lincatalasa* sería una enzima monofuncional. Este análisis sería coherente con los resultados de los ensayos *in vitro*, los cuales indican que la *Lincatalasa* presenta 1000 veces más actividad catalasa que peroxidasa. No obstante, el valor de actividad peroxidasa (con ABTS y H_2O_2) es similar al reportado para otras catalasas bifuncionales (Singh, R. y col. 2008). Finalmente, las características funcionales evaluadas indican que la *Lincatalasa* podría ser una enzima bifuncional aunque posee una estructura primaria similar al de otras catalasas monofuncionales. El caso aquí presentado para la *Lincatalasa* (junto a otros informados en la literatura) plantea una revisión de la clasificación de estas enzimas, dado que no se adecuaría correctamente al criterio de

clasificación funcional directamente a través de un análisis de la estructura primaria de estas proteínas.

Tabla 4| Actividad peroxidasa y catalasa de *Lincatalasa*. Las reacciones se realizaron a 30 °C. La actividad catalasa se evaluó siguiendo el consumo de H₂O₂ a 240 nm y para la actividad peroxidasa se determinó la reducción de ABTS a 405 nm. N.D. = no detectable.

	Catalasa	Peroxidasa		pH
		H ₂ O ₂	<i>t</i> -BuOOH	
AEE (U. mg ⁻¹)	30909	N.D.	N.D.	7,0
	2545	11,8	0,4	5,0

En segundo lugar, se evaluó la potencialidad de peróxidos orgánicos, como el *t*-BuOOH, así como también de especies reactivas de halógenos como el HClO, de inhibir la actividad catalasa de la enzima en estudio. Para ello, en una primera aproximación, la enzima se incubó a 30 °C y por 10 min, en presencia de diferentes proporciones de cada agente. Luego de ese tiempo, se diluyó 1000 veces la mezcla y se registró el consumo de H₂O₂ a 240 nm. Como se muestra en la **Figura 23**, el HClO produjo una inactivación mayor que el *t*-BuOOH sobre la actividad catalasa de la enzima, ya que con una relación 1:100 (enzima: *t*-BuOOH) la enzima retuvo un 50% de la actividad catalasa, mientras que con una relación 1:25 (enzima: HClO) solo un 25% de la *Lincatalasa* fue funcional. En relación a lo informado en la literatura, la inactivación por *t*-BuOOH se debería a la formación de una especie oxidada del hierro hémico, la cual impide la entrada de una molécula de H₂O₂ (o *t*-BuOOH) y por lo tanto detiene su ciclo de catálisis (Pichorner, H. y col. 1993). Por lo tanto, éste actuaría como un inhibidor irreversible de la actividad catalasa, ya que su efecto persiste pese a disminuir la concentración de *t*-BuOOH por dilución (**Figura 24**). Su capacidad de inactivación se indica con la relación $k_{\text{inact}} K_{\text{i}}^{-1} = 0,00174 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (parámetro aparente en presencia de H₂O₂ 10 mM, **Figura 24**).

En adición, y en vista de los resultados presentados en la **Figura 23**, se propone que el HClO ejerce un efecto inhibitorio irreversible sobre la *Lincatalasa*. Esto es debido a que, en forma similar a lo que ocurre con el *t*-BuOOH, el efecto persiste pese a disminuir su concentración por dilución. Se estimó una relación $k_{\text{inact}} K_{\text{i}}^{-1} = 0,0051 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (no mostrado).

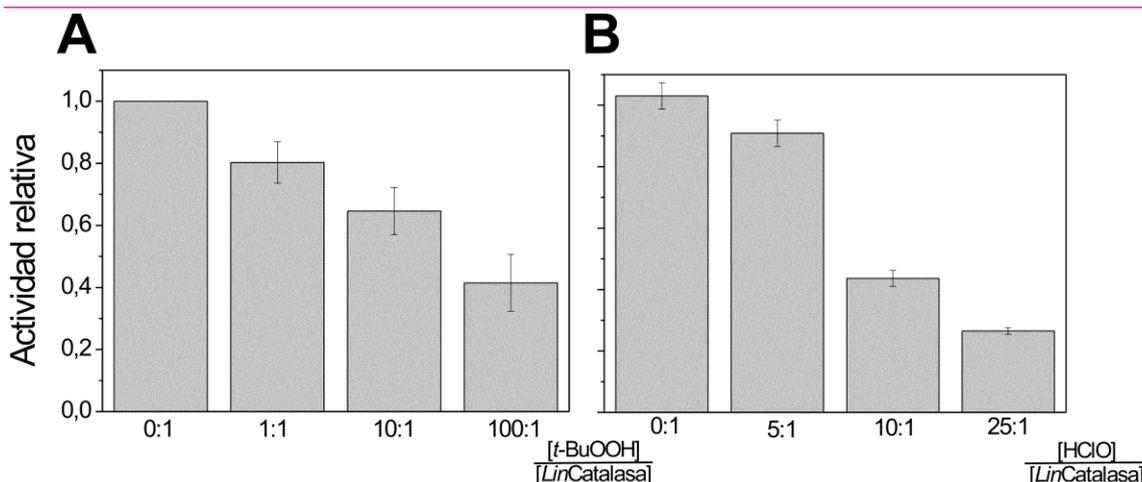


Figura 23 | Efecto causado por distintas proporciones oxidante: enzima sobre la actividad de la *Lincatalasa*. Los ensayos se realizaron a pH 7,0, incubando 1 μM de la *Lincatalasa* en presencia de $t\text{-BuOOH}$ y HClO en las proporciones indicadas en los gráficos (A y B, respectivamente), durante 10 min a 30 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido ese tiempo, se diluyeron 1000 veces las muestras y se evaluó la actividad catalasa empleando una concentración inicial de H_2O_2 de 10 mM, calculándose el porcentaje de actividad remanente respecto al control sin agente.

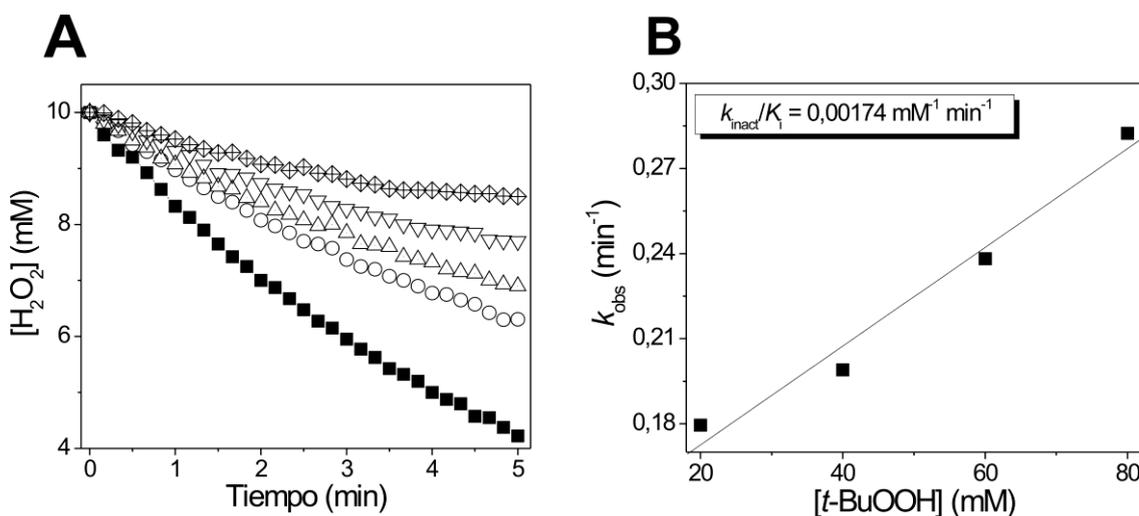


Figura 24 | Inactivación de la *Lincatalasa* en presencia de $t\text{-BuOOH}$ durante el *turnover*. A. Curvas de progresión de la reacción enzimática en presencia de concentraciones crecientes de $t\text{-BuOOH}$: (■) 0, (○) 20, (Δ) 40, (▽) 60 y (■) 80 mM. B. Análisis de la variación de las k_{obs} para las curvas de progresión en A en función de la concentración de $t\text{-BuOOH}$. Las mediciones se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$ y a pH 7,0 en presencia de 10 mM de H_2O_2 y 1 nM de *Lincatalasa*.

Como se indicó previamente, el espectro de absorción UV-Visible de la proteína presenta un máximo de absorción a 400 nm, característico entre las hemo-catalasas tanto monofuncionales como bifuncionales (Palcic, M. y col. 1979; Rafii, F. y col. 1999; Hayashi, K. y col. 2013). Si bien ambos compuestos podrían actuar a nivel del grupo hemo de la proteína, no se registraron cambios significativos en los espectros de absorción UV-Vis de la misma en presencia de esos agentes químicos (Figura 25). Este resultado podría señalar una menor sensibilidad de la catalasa de *L. interrogans*

respecto a catalasas de otras fuentes en cuanto a la estabilidad y coordinación del grupo hemo con la proteína (Pichorner, H. y col. 1993; Mahawar, M. y col. 2011).

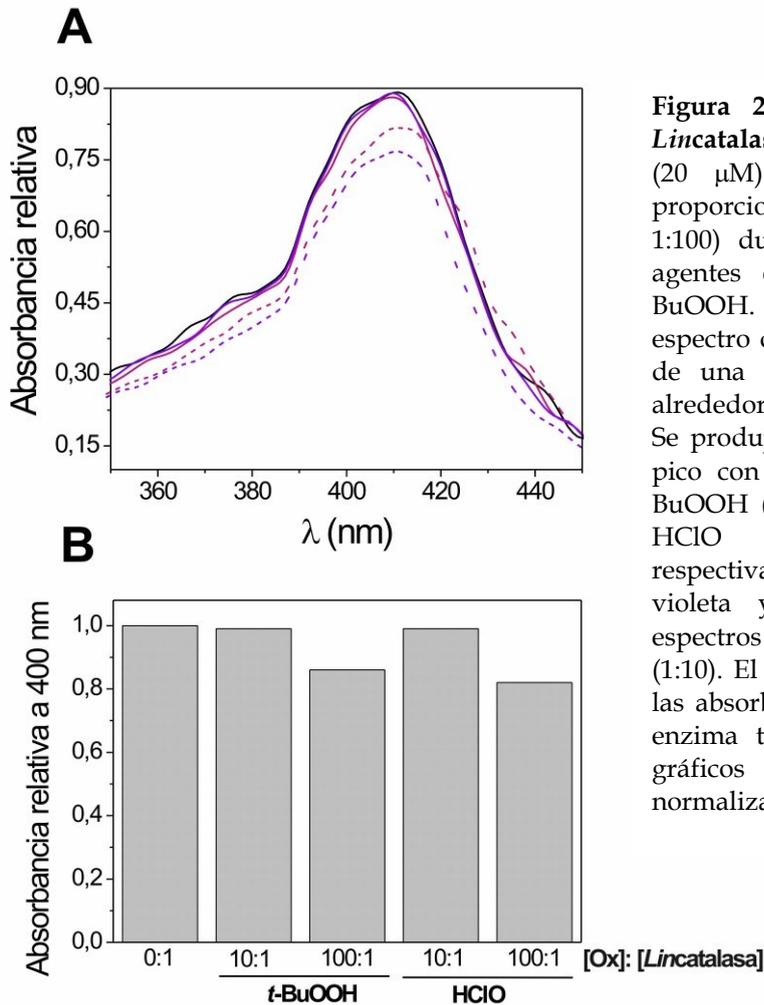


Figura 25 | Espectro UV-Visible de la Lincatalasa. A. La proteína recombinante (20 μ M) fue incubada con distintas proporciones enzima: agente (1:0, 1:10 y 1:100) durante 15 min y a 30 °C. Los agentes empleados fueron HClO y *t*-BuOOH. La Lincatalasa exhibió un espectro de absorción con el patrón típico de una hemoproteína con un máximo alrededor de 400 nm (línea negra sólida). Se produjo una leve disminución de este pico con las relaciones 1:100 enzima: *t*-BuOOH (línea violeta punteada) enzima: HClO (línea fucsia punteada), respectivamente. Las líneas continuas violeta y fucsia corresponden a los espectros de las relaciones enzima: agente (1:10). El gráfico de barras en B muestra las absorbancias relativas a 400 nm de la enzima tratada y sin tratar. En ambos gráficos las absorbancias fueron normalizadas con la absorbancia a 280 nm.

Pese a lo mencionado anteriormente, la inactivación observada de la *Lincatalasa* por HClO (o *t*-BuOOH) podrían relacionarse, además, con la oxidación de los residuos de Cys y/o Met de la misma (en su secuencia primaria se hallaron 6 residuos de Met y 3 residuos de Cys). La oxidación de estos residuos aminoacídicos podría causar cambios en la estructura terciaria (y en consecuencia en la estructura cuaternaria) de la proteína tal como se observó en la catalasa de *Helicobacter pylori* (Mahawar, M. y col. 2011). Para responder este interrogante, se realizó un análisis utilizando cromatografía de exclusión molecular (empleando una columna *Superdex* 200, GE-Healthcare) y SDS-PAGE no reductor (**Figura 26A y B**). Los perfiles de elución de la cromatografía indican que la proteína presentó una estructura homotetramérica con una M_r de ~164 kDa tanto en ausencia como en presencia de 100 veces más de *t*-BuOOH (no se muestra). Esta estructura oligomérica fue descrita para otras catalasas monofuncionales de subunidades pequeñas (Zamocky, M. y col. 2008; Diaz, A. y col. 2012). Por el contrario, la presencia de HClO (1:100) indujo a la formación oligómeros de elevada masa molecular. Esos complejos de la holoenzima también se observaron en un SDS-PAGE no reductor al tratar a la proteína con el mismo agente químico. En vista de que luego del tratamiento con DTT no se observaron los oligómeros, se podría inferir que el entrecruzamiento por puentes disulfuros podría ser uno de los factores responsables de la formación de estados de oligomerización de mayor masa molecular de la enzima. Si bien ambos compuestos actuarían a nivel del grupo hemo de la proteína, no se registraron cambios en los espectros de absorción UV-Visible de la misma con diferentes relaciones de los agentes (**Figura 25**). Este resultado podría señalar una mayor estabilidad de la catalasa de *L. interrogans* respecto a catalasas de otras fuentes (Pichorner, H. y col. 1993; Mahawar, M. y col. 2011), en cuanto a su coordinación del grupo hemo.

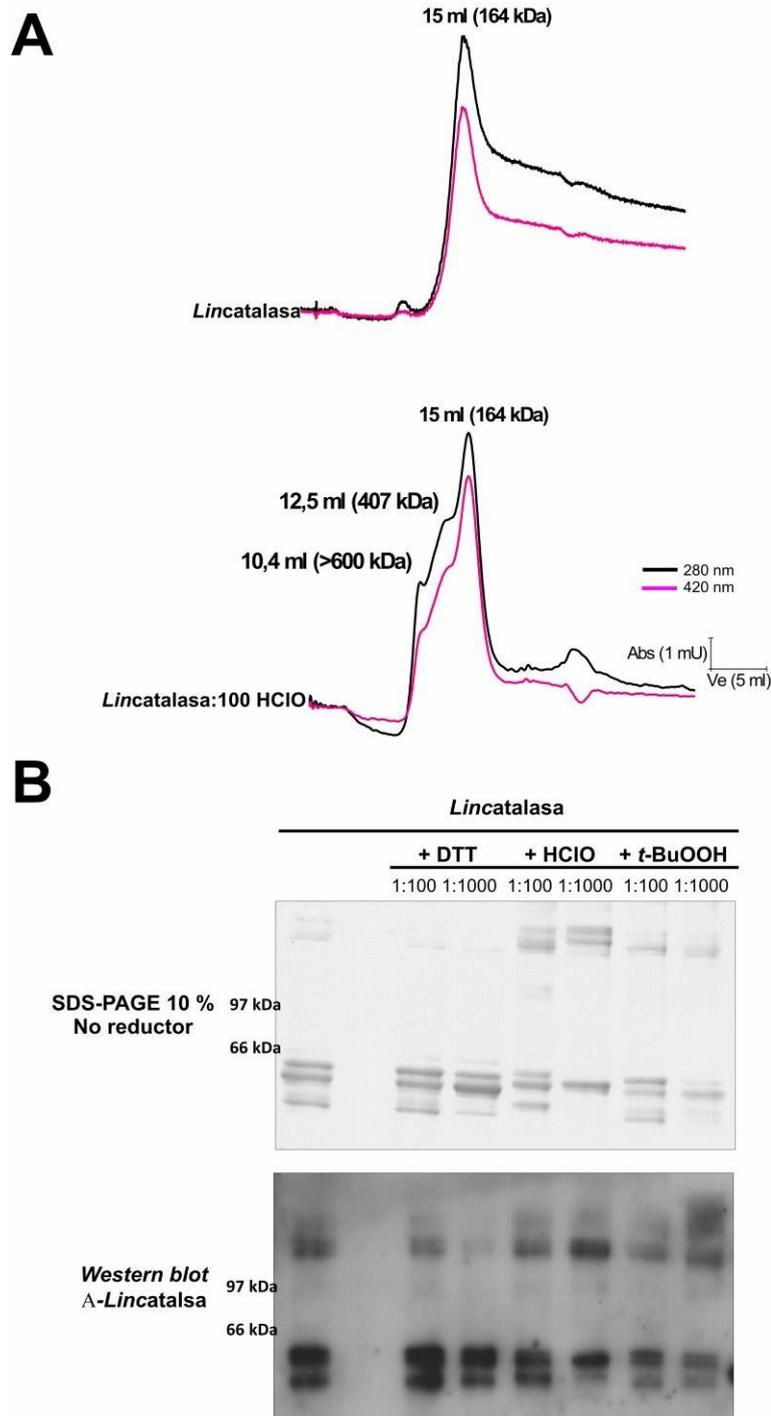


Figura 26 | A. Perfil de elución de la cromatografía de filtración por gel de la *Lincatalasa* sin tratar (arriba) y tratada con HClO (abajo). A una solución de 5 mg.ml⁻¹ de la enzima purificada se le realizó una cromatografía de exclusión molecular. Pevia a la siembra, la enzima sin tratar y tratada con HClO (enzima: HClO = 1:100), se incubaron por 10 min a 30 °C. Las masas fueron determinadas según una curva de patrones de masa molecular conocida (detallados en Materiales y Métodos). El trazo negro corresponde al perfil a 280 nm (contenido de proteína), mientras que el púrpura es el perfil a 420 nm (contenido de hemo). **B.** SDS-PAGE no reductor (arriba), seguido de electrotransferencia e inmunodetección con anticuerpos α -*Lincatalasa* (abajo). La *Lincatalasa* (18 μ M) fue incubada con distintas proporciones enzima: agente (1:0, 1:10 y 1:100) durante 15 min y a 30 °C. Los agentes empleados fueron: DTT, HClO y *t*-BuOOH.

Teniendo en cuenta las observaciones arriba descritas y los antecedentes presentados para la catalasa de *H. pylori* (Mahawar, M. y col. 2011; Kuhns, L.G. y col. 2013), se propuso como hipótesis que la inactivación observada en *Lincatalasa* al tratarla con HClO podría deberse a la oxidación de sus residuos de Met. Es por ello, y a modo de descartar el efecto de la formación de puentes disulfuros sobre la actividad catalasa, fue realizado un ensayo donde se evaluó la capacidad del DTT en revertir la inactivación de la enzima. Brevemente, la *Lincatalasa* fue incubada en presencia de HClO en una relación 1: 25 por 10 min y a 30°C. Luego, distintas alícuotas de la mezcla anterior se incubaron en presencia de DTT en relaciones 1:25 y 1:250, enzima: agente. El DTT es un agente reductor ampliamente utilizado para reducir puentes disulfuro que resultan de la oxidación de residuos de Cys. En paralelo, la *Lincatalasa* se sometió a los mismos tiempos y temperatura de incubación y a todas las muestras se le midió la actividad catalasa remanente evaluando el consumo de H₂O₂ a 240 nm. Como resultado de este ensayo se puede evidenciar en la **Figura 27** que ninguna de las relaciones de DTT empleadas revirtió el efecto de inactivación que el HClO ejerce sobre la enzima. Este resultado refuerza la hipótesis de que los cambios observados en la función de la proteína podrían deberse a la oxidación de residuos de Met.

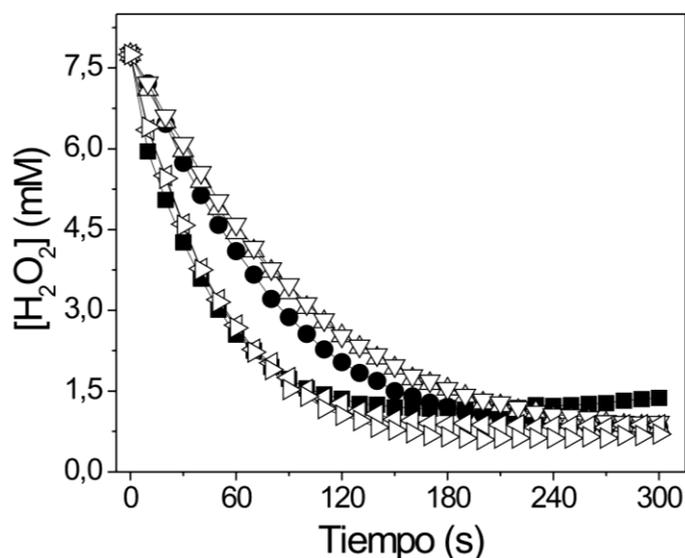


Figura 27 | Evaluación de la reversión de la inactivación de la *Lincatalasa* por HClO en presencia de DTT. La enzima recombinante (40 nM) se incubó 10 min a 30°C en presencia (●) y ausencia (■) de HClO, en una relación 1:250 (enzima: oxidante). Luego, una alícuota de cada una de las mezclas anteriores se incubaron junto a DTT en relaciones 1:250 y 1:2500 (enzima: DTT) en las mismas condiciones anteriores. A todas las muestras se le evaluó actividad catalasa monitoreando el consumo de H₂O₂ en el tiempo a 240 nm. Referencia de los perfiles: (△) enzima: 250 HClO: 250 DTT, (▽) enzima: 250 HClO: 2500 DTT, (◁) enzima: 250 DTT y (▷) enzima: 2500 DTT.

4.1.3.2. Evaluación del efecto de ERNs sobre *Lincatalasa*

Durante un proceso infeccioso se activan macrófagos y neutrófilos los cuales producen NO. Este agente oxidante (así como el H_2O_2) puede causar oxidación de proteínas (indirectamente) lo cual puede traer aparejado cambios conformacionales y, en algunos casos, pérdida de función (Friguet, B. 2006). Este tipo de especies puede inactivar a la catalasa, por reacciones de nitrosación, reacción del catión nitrosonio (NO^+) con el grupo tiol de un residuo de Cys, por nitrosilación, formación de un enlace entre el nitrito (NO_2^-) y el hierro hemínico (Fe^{3+}) (Titov, V.Y. y col. 2008) o por unión del NO al hierro hemínico en las formas de Fe^{2+} o Fe^{3+} (Brown, G.C. 1995; Cooper, C.E. 1999).

En vista de lo mencionado anteriormente y con el objeto de dilucidar el tipo de efecto que la nitrosocisteína (CySNO) causa sobre la catalasa de *L. interrogans*, se realizaron diferentes ensayos *in vitro*. En primer lugar, se incubó la *Lincatalasa* a 30 °C por 15 min con y sin CySNO, en una relación 1:100 (proteína: agente), luego de este tiempo, se desaló la muestra empleando para ello una columna de *Sephadex G-25* para así eliminar el exceso de CySNO. Posteriormente, con el eluato (la proteína tratada y desalada) se midió actividad, siguiendo para ello el consumo de H_2O_2 tal como se describe más arriba. En segundo lugar, se cuantificó el número de tioles totales de la proteína tratada y sin tratar, así como también se realizó un espectro de absorción UV-Visible. Como resultado de estos experimentos, se pudo observar que la proteína tratada no mostró cambios en su función, así como tampoco en el número de residuos de Cys en forma de tiol. Contrariamente mostró un ligero corrimiento en el pico de absorción, de 400 nm a 430 nm (**Figura 28A**). Además de esto se registró un hombro a 540 nm y un pico de absorción secundario de menor intensidad entre 575-580 nm. Es interesante destacar que el desplazamiento total del pico de absorción a 400 nm ocurrió a partir de una relación 1:1 (enzima: CySNO) (**Figura 28B**). Cambios espectroscópicos similares se informaron para la catalasa de eritrocitos humanos luego de la adición de azida o cianuro (Palcic, M. y col. 1979). En consecuencia de todo lo expuesto hasta el momento, puede informarse que la CySNO provoca la nitrosilación reversible del grupo hemo de la proteína, sin que esto cause cambios en su actividad catalasa (en presencia de H_2O_2). Tampoco se registraron cambios en la estructura oligomérica de la proteína, lo cual se infirió luego de comparar los perfiles de elución en la cromatografía de exclusión molecular de la proteína tratada con respecto a la sin tratar (**Figura 29**). Por otro lado, la formación de los complejos entre la proteína y la CySNO, presentaron

un incremento en la absorbancia a 430 nm, respecto a la señal aportada por la proteína no modificada (**Figura 29**).

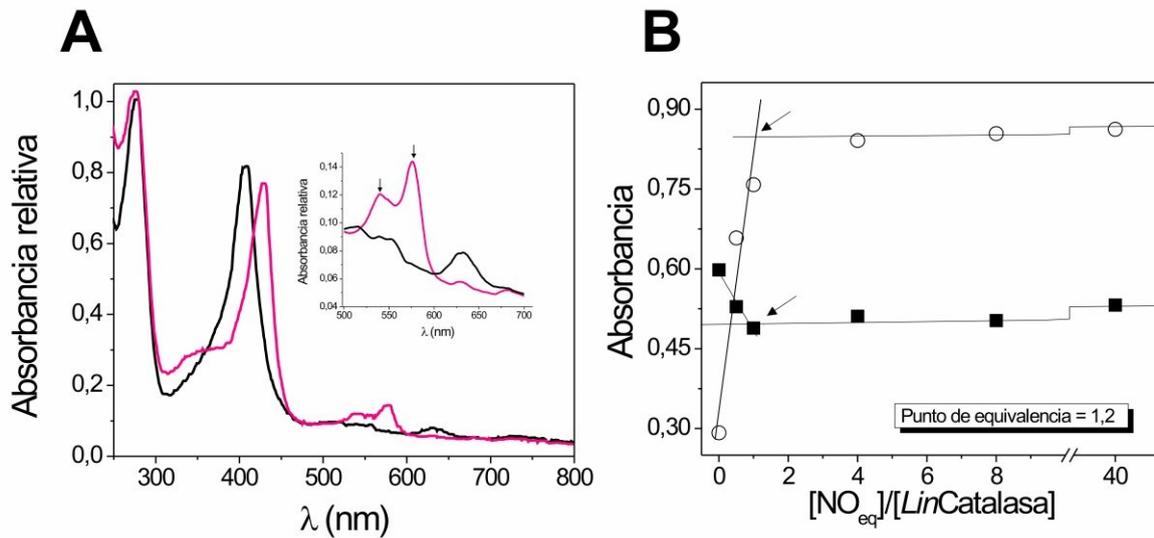


Figura 28 | A. Espectro de absorción UV-Visible de la Lincatalasa en presencia de CySNO. Se incubó la Lincatalasa (100 μ M) con y sin CySNO 10 mM, a 30 $^{\circ}$ C y por 15 min. Posteriormente se desalaron las muestras en *Sephadex* G-25 para eliminar el exceso de CySNO. El perfil espectroscópico de la Lincatalasa es el trazo negro y el de la Lincatalasa tratada con CySNO es el de trazo fucsia. **B. Titulación de la Lincatalasa con diferentes relaciones de CysNO (Enzima: CySNO).** Diferentes relaciones enzima: CySNO (1:0,125; 1:0, 25; 1:0,5; 1:1; 1:2,1:5; 1:10) se incubaron por 15 min a 30 $^{\circ}$ C. Luego de ese tiempo se registraron los valores de absorbancia a 400 nm (■) y 430 nm (○) y finalmente se determinó la cantidad de equivalentes de NO necesarios para causar el cambio espectroscópico registrado.

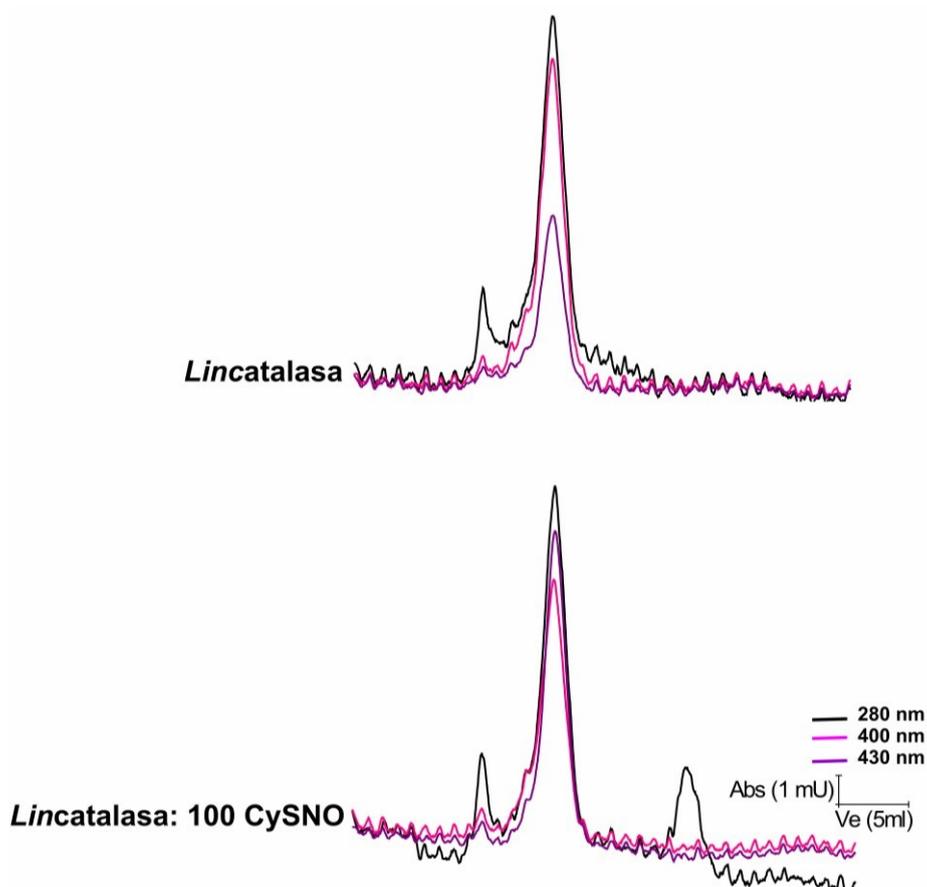


Figura 29 | Perfil de elución de la cromatografía de filtración por geles de la *Lincatalasa* sin tratar (arriba) y tratada con CySNO (abajo). A una solución de $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la enzima sin tratar y tratada con CySNO (enzima: CySNO = 1:100) se incubó por 10 min a 30°C previa a su siembra. Las masas fueron determinadas según una curva de patrones de masa molecular conocida (detallados en Materiales y Métodos). El trazo negro corresponde al perfil a 280 nm (contenido de proteína), el fucsia es el perfil a 400 nm (contenido de hemo) y el trazo violeta muestra el perfil a 430 nm (proteína nitrosilada).

4.1.4. Determinación de cambios en el nivel de *Lincatalasa* sobre extractos celulares

Con el objetivo de evaluar los niveles de esta enzima en células de *L. interrogans* se prosiguió a su detección empleando un anticuerpo policlonal α -*Lincatalasa*. Como control de carga para cada condición se empleó la detección de la proteína *LinLp32* (es una proteína de membrana de 32 kDa). Este anticuerpo policlonal se preparó previamente en el laboratorio a partir de la *LinLp32* recombinante. Con los anticuerpos mencionados se realizó un ensayo de *western blot* sobre extractos totales de leptospiras crecidas en fase exponencial a las cuales se incubaron por 30 min a 28°C en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de estresores. Como se puede apreciar en la **Figura 30**, el anticuerpo contra *Lincatalasa* permitió la detección de bandas en cada uno de los extractos obtenidos, a partir de bacterias sin tratar y tratadas. Las bandas

detectadas en todos los casos, se corresponden con una masa molecular de aproximadamente 41 kDa. Este tamaño se correlaciona con la masa molecular de la subunidad de la proteína recombinante. El contenido celular de la *Lincatalasa* no se vio afectado por incubación con *t*-BuOOH o H₂O₂. El tratamiento con HClO en concentraciones de 0,01 mM incrementó la abundancia de la *Lincatalasa*, mientras que concentraciones un orden de magnitud superiores del agente provocaron una proteólisis de la enzima y también una disminución de la proteína control (ver la calle con HClO 0,01 mM, **Figura 30**). Así mismo, se evidenció una leve reducción en el contenido de *Lincatalasa* luego del tratamiento con CysNO. Del análisis de este ensayo se puede concluir que existe una modulación del contenido celular de la *Lincatalasa*, y que además es un fenómeno que depende de la concentración y el tipo de estresor empleado. El incremento de la proteína podría relacionarse con un posible mecanismo de inducción mediado por factores de transcripción modulados por agentes redox (por ejemplo, Fur y PerR, (Lo, M. y col. 2010). Uno de ellos, el PerR, promueve la expresión de la enzima. Por el contrario, la disminución en el contenido de la enzima podría ser una consecuencia del daño oxidativo de la misma, lo cual llevaría a su degradación. Ante dicho escenario de desbalance redox, podría existir una inhibición de la traducción proteica en general.

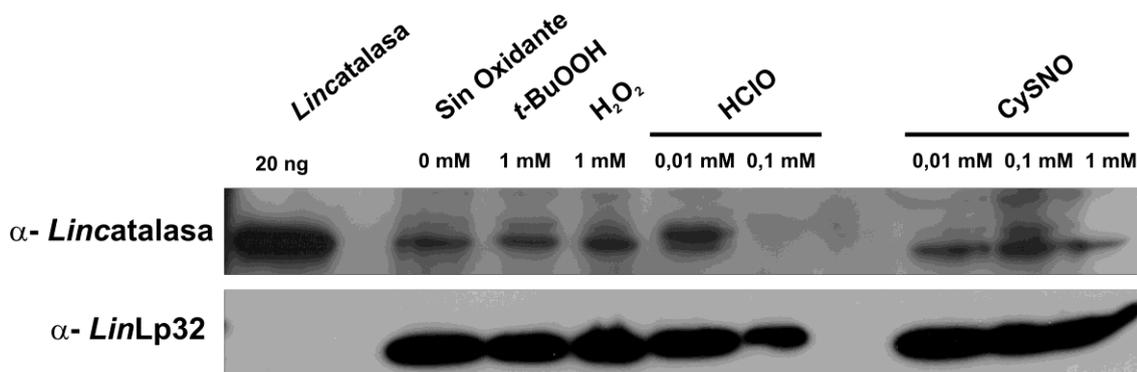


Figura 30 | Modulación del contenido de la *Lincatalasa* en extractos celulares de *L. interrogans*. Se incubaron suspensiones bacterianas (DO_{420 nm} ~0,135, 1 ml) en PBS, a 28 °C por 30 min en presencia de los estresores y cantidades indicadas en la imagen, o en su ausencia (ensayo control). Las muestras se lisaron por calentamiento en presencia de *buffer* de muestra para SDS-PAGE reductor 1X y se sembraron en un gel al 10%. Luego, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con α -*Lincatalasa* (1/1000) y α -*LinLp32* (1/5000). Como anticuerpo secundario se empleó una dilución 1/10000 de un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP comercial (Thermo Scientific). Finalmente, las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia y su identidad se determinó por comparación con un marcador de masa molecular.

4.1.5. Discusión

L. interrogans serovar Icterohaemorrhagiae o Copenhageni es el principal agente etiológico de leptospirosis en el hombre; severa zoonosis de distribución mundial. Esta bacteria tiene la misma capacidad de sobrevivir tanto en el huésped como en ambientes de climas tropicales (Levett, P.N. 2001). Por el contrario, *L. biflexa* serovar PATOC es una bacteria de vida libre (Levett, P.N. 2001). Existen numerosos antecedentes acerca de que la identificación de genes comunes entre las especies patógenas, pero ausentes en la especie no patógena, un hecho que resulta consistente con el rol que esos genes causan en la patogénesis y virulencia (Bulach, D.M. y col. 2006; Picardeau, M. y col. 2008; Lehmann, J.S. y col. 2014). Como se mencionó en la introducción, los patógenos presentan sistemas enzimáticos que le permiten hacer frente al estrés oxidativo y nitrosativo generado como consecuencia de la respuesta inmune del huésped durante un proceso infeccioso. Es por ello que en este primer capítulo se realizó un “bosquejo” del escenario metabólico redox en estas bacterias. Como primera aproximación, se determinó la actividad enzimática de diferentes enzimas antioxidantes. Para GCL, GR y GST, *L. interrogans* mostró mayor actividad que *L. biflexa*. También se puso de manifiesto la funcionalidad de la TrxR y Grx, siendo los valores hallados similares para ambas especies. Finalmente, la actividad GS detectada en la especie patógena fue menor respecto a la no patógena, esto podría deberse a diferencias en cuanto al metabolismo del GSH presente en ambas especies.

El análisis inicial de la información genética disponible (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/mundo/lic/> y <http://meta.microbesonline.org/operon/>) para ambas especies bacterianas reveló en *L. interrogans* secuencias codificantes para una catalasa (LIC12032), una TrxR (LIC11470), tres isoformas de GST (LIC1298, LIC11363 y LIC10807), una 2CGrx (LIC11810), una 1CGrx (LA_2109), y una GCL (LIC11812). En *L. biflexa* se encontraron los ortólogos correspondientes a los genes mencionados de *L. interrogans*, estos fueron: una catalasa (LBF_2421 *katG*), dos isoformas de TrxR (LEPBI_I2359 y LBF_2230), seis isoformas de GST (LEPBI_I0297, LBF_2202, LBF_1428, LBF_1853, LBF_2014 y LBF_0288), dos isoformas de 2CGrx (LBF_1856, LBF_3254) y dos isoformas de 1CGrx (LBF_1855 y LBF_2277), y una GCL (LEPBI_I1913), respectivamente. Cabe destacar, que si bien los extractos de *L. interrogans* presentaron actividad GR, en el genoma de la bacteria no se encontró ningún gen codificante para dicha proteína. Para realizar esta búsqueda, se empleó

como molde la secuencia consenso obtenida luego de realizar un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de GR de los organismos que se detallan a continuación: *Listeria monocytogenes* (NCBI_WP_014930414.1); *Pasteurella multocida* (NCBI_WP_010907087.1); *Rattus norvegicus* (NCBI_NP_446358.2); *Aeromonas hydrophila* (NCBI_WP_011704063.); *Homo sapiens* (NCBI_NP_001182031.1), *Saccharomyces cerevisiae* S288c (NCBI_NP_015234.1); *Klebsiella pneumoniae* (NCBI_ABR79253.1) y *Escherichia coli* (NCBI_WP_000160816.1).

En relación a los resultados obtenidos hasta el momento surgen varios interrogantes a ser respondidos: 1) ¿existe en ambas especies bacterianas una enzima con actividad GR a pesar de que no encontró un gen que la codifique?, 2) además de la catalasa, cuya relación con la virulencia de *L. interrogans* ya ha sido establecida, ¿la GCL y GST serán factores de virulencia y estarán relacionados con su patogenicidad?, 3) ¿qué importancia tiene la presencia de entidades con actividad TrxR o Grx detectadas en ambas especies bacterianas? Algunos de estos interrogantes se intentarán responder en los siguientes capítulos de esta Tesis.

Como se mencionó anteriormente, la catalasa de *L. interrogans*, es una proteína abundante y uno de los factores de virulencia, dado que es el principal responsable de la viabilidad bacteriana ante la presencia de H₂O₂ (Rao, P.J. y col. 1964; Corin, R.E. y col. 1978; Corin, R.E. y col. 1980; Rao, 1964 #288; Lo, M. y col. 2010; Eshghi, A. y col. 2012; Corin, 1978 #143). Las propiedades cinéticas revelan que la *Lincatalasa* podría ser una enzima bifuncional a pesar de que posee características estructurales similares a las enzimas monofuncionales. Esta enzima pertenecería al subgrupo de las de subunidades pequeñas, similar a otros organismos (Austin, J.E. y col. 1981; Jouve, H.M. y col. 1982; Wang, G. y col. 2004).

A modo de avanzar en la caracterización de la catalasa de *L. interrogans* se realizó un estudio sobre la inhibición de la actividad catalasa de la enzima. Los resultados de los ensayos han mostrado que la enzima es sensible a la presencia de *t*-BuOOH o HClO, no así a CysNO. Se ha descrito que el *t*-BuOOH causa inactivación de la catalasa debido a la consecuente liberación de hierro y destrucción del hemo (Pichorner, H. y col. 1993), lo cual se pone de manifiesto a través de cambios en los espectros UV-Visible y cambios en su estructura (Pichorner, H. y col. 1993; Mahawar, M. y col. 2011). Contrariamente, la *Lincatalasa* no presentó cambios relacionados con la coordinación del hemo (mediante espectros UV-Visible), indicando una mayor estabilidad del grupo hemo de la enzima frente a este agente químico.

Se ha propuesto que la inactivación por HClO podría revertirse en pocos minutos tras la adición simultánea de H₂O₂ tal como lo describió Mashino, T. y col. (1988). Según el autor, esto es debido a la unión axial del ClO⁻ al hierro del hemo, seguido por el clivaje heterolítico de la unión O-Cl. De esta manera el ClO⁻ unido sería desplazado por una molécula de H₂O₂, llevando a la formación del aducto Fe-OOH, el cual rápidamente libera OH⁻ y se convierte en el compuesto I (el cual es catalíticamente activo, **Figura 15** de Introducción) (Mashino, T. y col. 1988). Contrariamente a lo mencionado, los resultados obtenidos indicaron que el HClO actuaría como un inhibidor irreversible sobre la actividad catalasa de la *Lincatalasa*, ya que su efecto persiste pese a disminuir su concentración (por el efecto de dilución) y a la exposición al H₂O₂. En este sentido y a diferencia del comportamiento advertido por la enzima con respecto al *t*-BuOOH, la pérdida de función de la *Lincatalasa* por HClO, se puede relacionar con cambios en su estructura terciaria y en consecuencia a su estructura cuaternaria. El tratamiento de la enzima con HClO indujo a la formación de oligómeros de alta masa molecular (esto se pudo observar mediante SDS-PAGE no reductor y cromatografía de exclusión molecular). Estos resultados indican que el cambio en el estado de oligomerización de la enzima (y en consecuencia la pérdida de actividad enzimática) podría deberse parcialmente a la formación de puentes disulfuros por oxidación de residuos de Cys. Resultados similares han sido informados para la catalasa de *H. pylori* y para la catalasa de hígado bovino (Mashino, T. y col. 1988; Mahawar, M. y col. 2011; Diaz, A. y col. 2012). Esas modificaciones estructurales no se acompañaron con cambios en la coordinación del grupo hemo, de acuerdo a los perfiles de absorción UV-visible registrados, donde no se evidenciaron cambios en el pico de absorción del hemo a 400 nm, a diferencia de lo que ocurre con la catalasa de *H. pylori* (Mashino, T. y col. 1988; Mahawar, M. y col. 2011). Esto último nuevamente infiere una mayor estabilidad de *Lincatalasa* en lo que respecta a su coordinación del grupo hemo. En *H. pylori* se relacionó a la pérdida de función y estructura de la catalasa en presencia de HClO con la oxidación de residuos de Met dada a la alta reactividad de este agente con este residuo aminoacídico (Mahawar, M. y col. 2011). Este antecedente sumado a que el DTT no presentó efecto sobre la *Lincatalasa* inactivada por HClO, refuerza la idea sobre la sensibilidad de los residuos de Met de la *Lincatalasa* a la oxidación. Este análisis se continuará en el capítulo IV de esta Tesis, donde se desarrollará el estudio funcional de las Msrs de *L. interrogans*. La inactivación

y cambios estructurales de la *Lincatalasa* en presencia de HClO podrían indicar una menor capacidad de *L. interrogans* para detoxificar H₂O₂ en presencia de esta especie reactiva.

Contrariamente a la acción que produjeron el *t*-BuOOH y HClO, la CySNO afectó solamente la coordinación del grupo hemo, sin influir en la actividad y estructura. Los cambios espectroscópicos registrados fueron similares a los observados para la catalasa de eritrocitos humanos en presencia de azida o cianuro (Palcic, M. y col. 1979). Además de esto, el número de tioles de la enzima tratada con CySNO fue el mismo que el de la enzima sin tratar, señalando que las modificaciones no serían aparentemente por oxidación de Cys, sino por nitrosilación del grupo hemo en mayor proporción. Esto último, consiste en la formación de un enlace entre el NO y el hierro hemínico (Fe³⁺) según lo descrito por Titov, V.Y. y col. (2008).

La *Lincatalasa* fue detectada en extractos celulares bacterianos en condiciones basales. Su contenido relativo no se modificó en forma significativa en presencia de H₂O₂ ni *t*-BuOOH. No obstante se observó una sutil disminución provocada por el tratamiento de las bacterias con CySNO. Contrariamente a lo anterior, el tratamiento con bajas concentraciones de HClO indujeron un aumento en el contenido relativo de la proteína, mientras que una exposición a una mayor concentración del agente condujo a un detrimento marcado en su contenido a nivel celular. Una de las posibles explicaciones a los aumentos observados en el nivel de la proteína sería una posible regulación transcripcional, induciendo su expresión bajo condiciones de estrés oxidativo. En lo que respecta a esto, se informó que *L. interrogans* carece de los genes que codifican para OxyR y SorRS, no obstante han sido detectados cuatro genes homólogos a Fur (Nascimento, A.L. y col. 2004; Louvel, H. y col. 2006; Lo, M. y col. 2010). Uno de ellos, PerR, cumpliría funciones análogas a OxyR. En muchas bacterias, la expresión de *kat* y *ahpC* es regulada por OxyR en respuesta al estrés oxidativo (Dubbs, J.M. y col. 2012). Sin embargo, PerR regula la expresión de *kat*, pero no la de *ahpC* ni de genes homólogos a éste (Louvel, H. y col. 2006). Además, PerR regula la expresión de la catalasa en presencia de H₂O₂, y no causa modificación en su nivel en presencia de peróxidos orgánicos. De acuerdo a esto, se podría hipotetizar que cada uno de los cuatro genes homólogos a Fur (presente en *L. interrogans*), tienen una función importante en la regulación de la expresión de proteínas antioxidantes en esta bacteria. Adicionalmente, otros antecedentes podrían aportar una explicación suplementaria a la ausencia de señal observada en el ensayo de *western blot* (a partir de

las células bacterianas expuestas a HClO). Según Gray, M.J. y col. (2013), además de las metaloproteínas, uno de los principales blancos del HClO son los residuos de Cys y Met. La reacción de oxidación de Cys y Met por HClO puede llevar a formas irreversibles, sulfínico y sulfónico para la Cys, y sulfona para la Met. Esas modificaciones irreversibles de ambos residuos aminoacídicos pueden inducir al mal plegamiento y agregación de proteínas. Esto es motivo por el cual este tipo de estrés conduce, además, a la expresión de proteasas y chaperonas (Gray, M.J. y col. 2013), lo que en algunos casos, trae aparejado la degradación de las proteínas dañadas. En relación a estos antecedentes, la ausencia de señal observada en el ensayo de *western blot* (a partir de las células bacterianas expuestas a HClO), podría ser consecuencia del mal plegado de diversas proteínas con la consecuente activación de proteasas. Algún indicio de que ese agente redox ejerce cambios estructurales, fue observado en los ensayo de SDS-PAGE no reductor y en los perfiles de elución cromatográficos de la filtración por geles. A pesar de ello para confirmar que esos cambios podrían ser consecuencia del mal plegado de la proteína, podrían realizarse en un futuro, ensayos que evalúen parámetros estructurales de la proteína (como por ejemplo dicroísmo circular o resonancia magnética nuclear).

Finalmente, en este capítulo se presentan resultados que ponen en evidencia la existencia de sistemas redox, particularmente antioxidantes en leptospiras. Adicionalmente, se han realizado los primeros estudios (hasta el momento) sobre las propiedades cinéticas de la *Lincatalasa*. En conjunto, estos componentes antioxidantes constituirían un mecanismo metabólico crítico para la supervivencia (y virulencia) de las bacterias. Por lo tanto, la información aquí presentada constituye un punto de partida para profundizar los estudios e iniciar nuevas líneas de investigación sobre el metabolismo redox en estas bacterias.

CAPÍTULO 2: Caracterización del sistema tiorredoxina en *Leptospira* spp.

4.2.1. Obtención en forma recombinante de *LinTrx*, *LinTrxR*, *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2*

Se identificaron en el proyecto genoma de *L. interrogans* serovar Copenhagenii (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>) las secuencias nucleotídicas que codifican para una Trx (*trxA*, LIC119788) y una TrxR (*trxB*, LIC11470) putativas. Adicionalmente, la información genómica de *L. biflexa* (<http://meta.microbesonline.org/>) mostró la presencia de dos genes codificantes para TrxR (*trxB*, LEPBI_I2359 y *trxB-1*, LBF_2230) putativas, y solo un gen codificante para una Trx (LBF_2520). Los genes especificados fueron amplificados por PCR empleando el DNA genómico de las bacterias y *primers* específicamente diseñados (ver **Tabla 2**), a excepción del gen para la *LbiTrx* putativa. Luego, se clonaron en pGEM®-T-*Easy* y sus identidades se confirmaron por secuenciación del ADN.

El gen de la *trxA* de *L. interrogans* codifica una proteína de 105 aminoácidos (*LinTrx*), con una masa molecular teórica de 11,48 kDa. La *LinTrx* tiene un residuo adicional de Cys en la estructura primaria, éste se haya próximo del sitio redox activo (WCGPC) (**Figura 31**), a diferencia de Trxs de otras fuentes (Krnajski, Z. y col. 2001; Bao, R. y col. 2009). Los genes *trxB* de *L. interrogans* y *L. biflexa* (*trxB* y *trxB-1*, respectivamente), codifican para proteínas de 310 aminoácidos con masas moleculares teóricas de 34 kDa (*LinTrxR* y *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2*). La estructura primaria de *LinTrxR* y *LbiTrxR1* revela la presencia de un dominio de unión a NADPH, un dominio de unión a la flavina y un motivo redox activo. El gen de *L. biflexa trxB-1* codifica para una proteína (*LbiTrxR2*) con características similares a otras TrxRs, excepto que carece de algunos residuos en el dominio de unión al NADPH (**Figura 32**), cuya secuencia es altamente conservada entre las L-TrxRs (Krnajski, Z. y col. 2001; Bao, R. y col. 2009). Esta última característica sólo se ha reportado previamente para la TrxR de *Thermoplasma acidophilum* (Hernandez, H.H. y col. 2008).

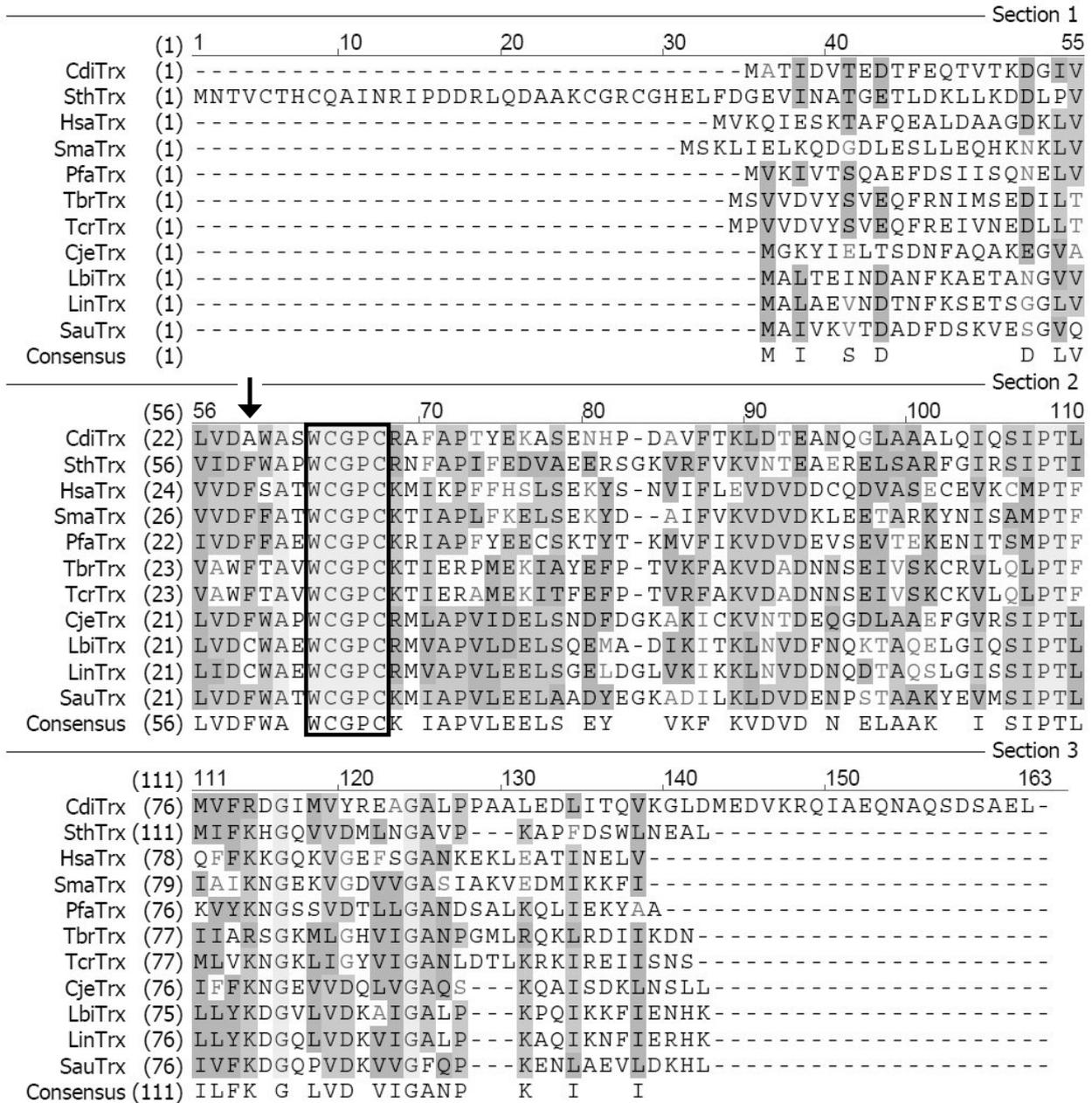


Figura 31 | Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la LinTrx con Trxs de otras fuentes. *Clostridium diphtheriae* (NCBI_WP_002851800.1), *Salmonella typhimurium* (NCBI_WP_001098732.1), *Homo sapiens* (NCBI_AAF87085.1), *Schistosoma mansoni* (NCBI_AAL79841.1), *Plasmodium falciparum* (NCBI_CAB90828.1), *Trypanosoma brucei* (NCBI_XP_803641.1), *Trypanosoma cruzi* (NCBI_AAT79533.1), *Leptospira biflexa* (ABZ94726.1), *Leptospira interrogans* LIC11978 (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>), *Campilobacter jejuni* (NCBI_WP_002851800.1) y *Staphylococcus aureus* MR52 (NCBI_WP_001018928.1). El recuadro muestra el motivo redox activo WCGPC y la flecha indica el residuo de Cys adicional (y próximo al sitio activo) presente en LinTrx y LbiTrx. El alineamiento se realizó empleando el programa Vector NTI 10.0.

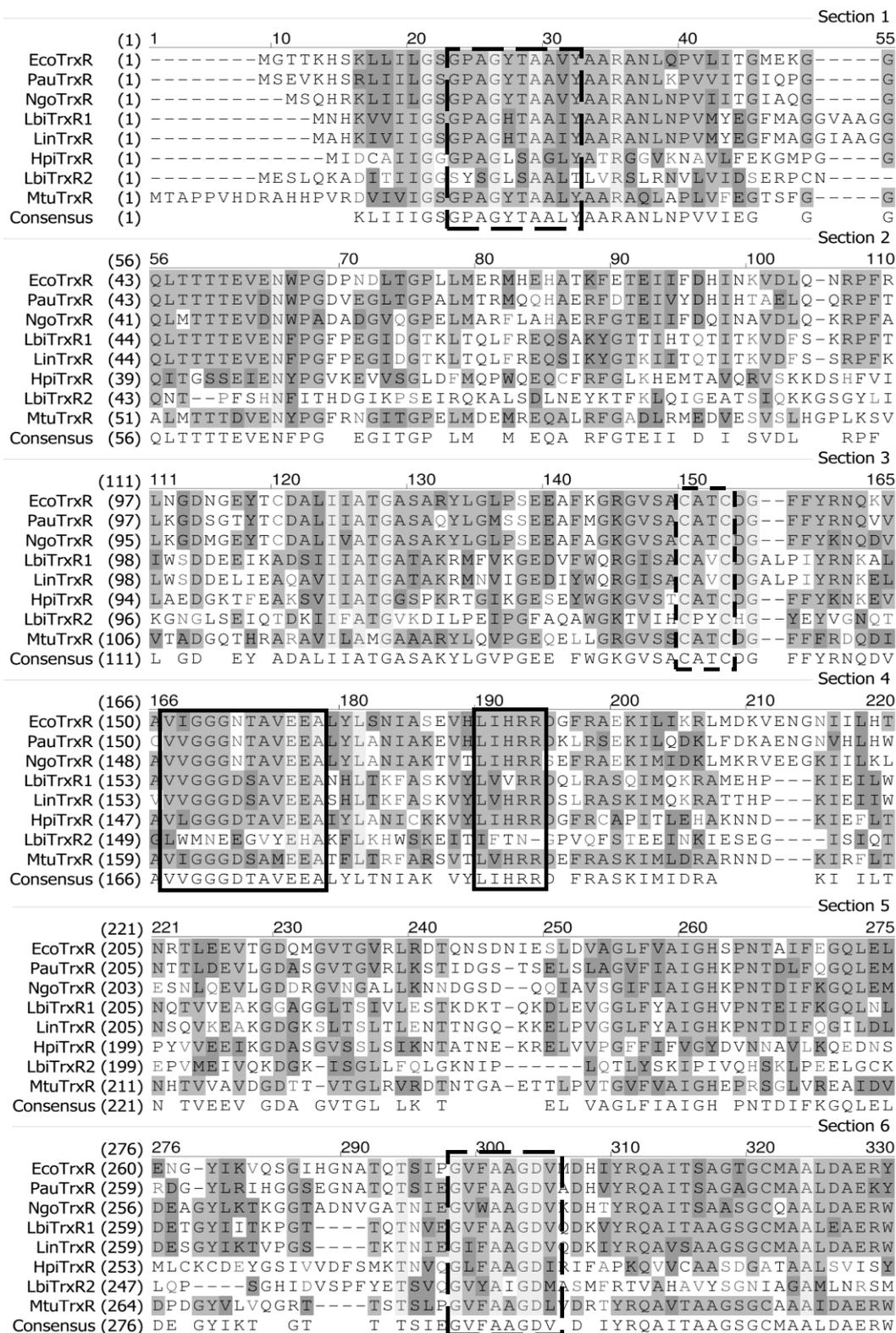


Figura 32| Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *LinTrxR*, *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2* con TrxRs de otras fuentes. *Escherichia coli* D9 (NCBI_EGJ07907.1), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NCBI_NP_251306.1), *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090 (NCBI_YP_207723.1), *Leptospira biflexa* (ABZ94782.1), *Leptospira interrogans* (NCBI_WP_000940586.1), *Helicobacter pylori* (NCBI_WP_000564417.1), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NCBI_NP_218430.1). Recuadrado con línea punteada se indica el motivo redox activo CXXC, con línea cortada, el motivo de unión al FAD y, con línea llena, el motivo de unión al NADPH. El alineamiento se realizó empelando el programa Vector NTI 10.0.

Cada uno de los genes amplificados fueron subclonados en el vector pET28c y expresados en células de *E. coli* BL21 (DE3). Las proteínas expresadas de esta forma se obtuvieron como proteínas de fusión a una cola de poli-His en el extremo N-terminal, adicionando de este modo aproximadamente 3 kDa a la masa de cada proteína. La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes fue llevada a cabo con el agregado de 0,25 mM IPTG e incubación a 25 °C durante 16 h de forma de optimizar la expresión de éstas en forma soluble. La purificación de las proteínas en forma nativa fue realizada mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) utilizando una resina Ni²⁺-IDA- *Sepharose*. El análisis de las proteínas recombinantes por SDS-PAGE reductor y teñido con *Coomassie blue*, muestra que las mismas fueron producidas y purificadas con una pureza del 95%, observándose una banda correspondiente a una masa de ~35 kDa para las TrxRs (**Figura 33**) y una banda a la altura de ~15 kDa para la Trx (**Figura 33**). Las proteínas purificadas se almacenaron a -80 °C sin pérdida de actividad por un período no menor a ocho meses.

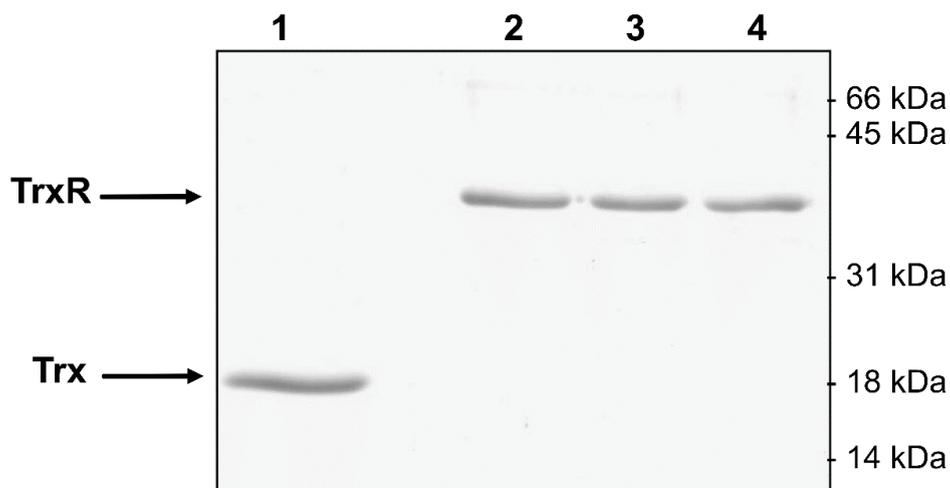


Figura 33| SDS-PAGE reductor al 12 % de las proteínas recombinantes purificadas por IMAC. Las proteínas recombinantes fueron analizadas mediante migración electroforética, en condiciones desnaturalizantes y reductoras y subsecuente tinción con *Commassie blue*. En la calle 1 se sembró la *LinTrx*, en la 2 la *LinTrxR*, en la 3 y 4, la *LbiTrxR1* y la *LbiTrxR2*, respectivamente.

4.2.2. Características físicas y estructurales de las *LinTrx*, *LinTrxR*, *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2*

Con el objeto de determinar la masa molecular en el estado nativo de las proteínas purificadas se realizó una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna *Superdex 200* (GE-Healthcare). Las tres TrxR purificadas eluyeron como proteínas con una masa molecular de ~70 kDa, lo cual sugiere que cada enzima

presenta una estructura homodimérica en su estado nativo (activo). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente para TrxRs de otras fuentes (Kanzok, S.M. y col. 2002). Por otro lado, la *LinTrx* presentó una estructura monomérica en su estado nativo (inclusive luego del tratamiento con 50 mM de DTT o 200 mM de diamida), similar a otras Trxs (Collet, J.F. y col. 2010) (**Figura 34**).

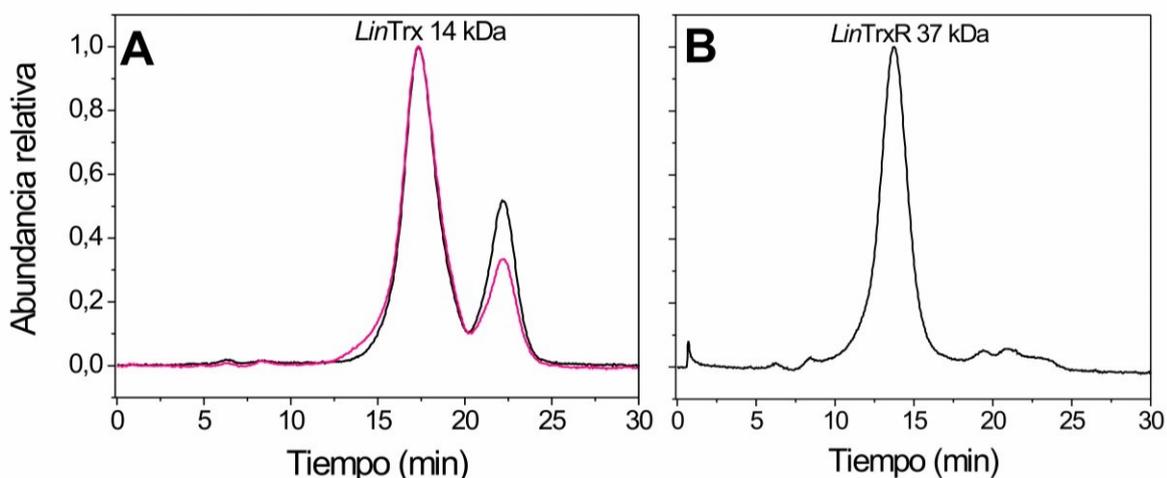


Figura 34 | Cromatografía de filtración por geles de la *LinTrx* y la *LinTrxR*. Se sembraron soluciones de *LinTrx* (A) y *LinTrxR* (B) de 1 mg.ml⁻¹ en una matriz *Superdex 200 Tricorn HP* en *buffer* HEPES pH 8,0 y 0,6 mM de NaCl a un flujo constante de 0,2 ml.min⁻¹. Previa a la siembra la *LinTrx* se incubó con DTT 50 mM (línea negra) y diamida 200 mM (línea fucsia) a 25 °C por 10 min.

Al efectuar experimentos de SDS-PAGE en condiciones no reductoras, con *LinTrxR*, *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2* preincubadas previamente en presencia y en ausencia de DTT 10 mM o diamida 10 mM, no se evidenciaron modificaciones entre el perfil de migración de las proteínas tratadas y sin tratamiento, observándose en consecuencia una banda mayoritaria de ~70 kDa. En la **Figura 35A** se expone el espectro de absorción UV-Visible de la *LinTrxR*, la *LbiTrxR1* y la *LbiTrxR2*, en ausencia de algún reductor. En éste se evidencian dos picos de absorción a 375 y 450 nm, los cuales son característicos de las flavoproteínas (proteínas con FAD o FMN como grupo prostético). Bajo condiciones aeróbicas, el pico a 450 nm disminuyó luego de la adición de NADPH 100 µM, lo cual se puso de manifiesto en los espectros correspondientes a la *LinTrxR* y la *LbiTrxR1*. Este cambio espectral, debido a la reducción de la flavina por el NADPH, es común entre las TrxRs (Ben-Menachem, G. y col. 1997; Macheroux, P. 1999). Sin embargo, bajo condiciones experimentales idénticas, *LbiTrxR2* fue insensible al NADPH (no se observó reducción de la flavina). Un comportamiento similar fue

informado para la TrxR de *Thermoplasma acidophilum* (Hernandez, H.H. y col. 2008; Arias, D.G. y col. 2014).

En la mayoría de las flavoproteínas, el cofactor se encuentra estrechamente unido (pero no en forma covalente). Este parece ser el caso de las TrxRs de leptospira, las cuales liberaron un compuesto amarillo brillante luego de ser calentadas a 100 °C por 10 min. La flavina libre se analizó por cromatografía en capa delgada y como se muestra en la **Figura 35B** luego de comparar el patrón de migración de cada proteína con los estándares empleados (FAD y FMN), se puede concluir que la *LinTrxR*, la *LbiTrxR1* y la *LbiTrxR2* contienen FAD como grupo prostético. Los resultados de este apartado señalan que la *LinTrxR* y la *LbiTrxR1* presentan propiedades físicas y estructurales similares a otros miembros de la familia de las L-TrxR (Williams, C.H. 1995; Arias, D.G. y col. 2012).

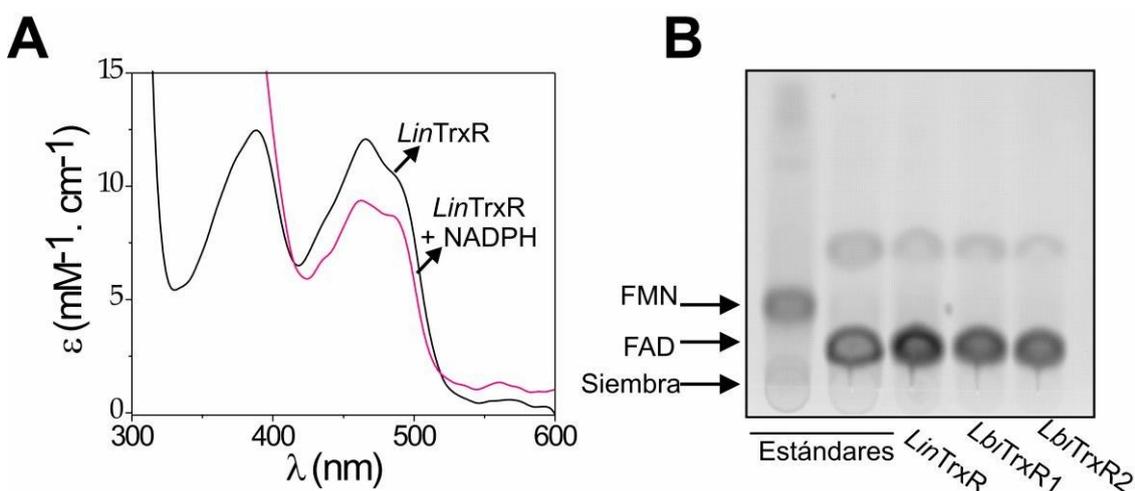


Figura 35 | A. Espectro de absorción UV-visible de *LinTrxR*. El ensayo se realizó a 25°C y a pH 7,0. Los coeficientes de extinción molar (ϵ) fueron calculados empleando diferentes concentraciones de *LinTrxR*. (6, 11 y 22 μM). La línea negra corresponde al espectro de absorción de la *LinTrxR* y la línea fucsia, al de la *LinTrxR* en presencia de 100 μM NADPH (similar comportamiento se observó para *LbiTrxR1*). **B. Determinación por TLC del tipo de flavina presente en las TrxRs.** La placa fue revelada por fluorescencia en un escáner *Typhoon*. La fase móvil fue una solución de butanol: ácido acético: agua (12:3:5). Las muestras se sembraron en el siguiente orden: estándares comerciales de FMN y FAD; y sobrenadantes obtenidos luego del tratamiento térmico (para liberar el cofactor de la proteína) de *LinTrxR*, *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2*

4.2.3. Estudio de las propiedades cinéticas del sistema tiorredoxina en *Leptospiras* spp.

4.2.3.1. Evaluación de la actividad TrxR de las proteínas recombinantes

Para revelar la funcionalidad de las proteínas recombinantes, se desarrolló una completa caracterización enzimática *in vitro*. En primer lugar se realizó el clásico ensayo de reducción de DTNB para evaluar actividad TrxR, y de este modo determinar la funcionalidad de la *LinTrxR*, la *LbiTrxR1* y la *LbiTrxR2*. Tanto la *LinTrxR* como la *LbiTrxR1* fueron capaces de reducir específicamente la *LinTrx*, usando NADPH como dador de electrones y DTNB como aceptor final (**Figura 36**). En esas condiciones de reacción el sistema enzimático exhibió un máximo de actividad a pH 7,0 (**Figura 37**). Sin embargo, no se detectó actividad para ninguna de las enzimas cuando se empleó NADH (en lugar de NADPH) en equivalentes concentraciones; resultado que es consistente con lo observado previamente para L-TrxR de otras fuentes (Lu, J. y col. 2013). A diferencia de lo observado para las otras TrxRs estudiadas, *LbiTrxR2* no presentó actividad TrxR con este clásico ensayo *in vitro* y empleando NAD(P)H como sustrato reductor. Por tal motivo y con el objeto de determinar la actividad TrxR de la *LbiTrxR2*, se evaluó la capacidad de otras proteínas redox, tales como: ferredoxina [2Fe-2S], ferredoxina [4Fe-4S] o flavodoxina, en presencia de la ferredoxina NADP reductasa y NADPH, como sistemas reductores de la *LbiTrxR2*, pero con ninguno de esos sistemas alternativos la enzima mostró actividad. También se estudió un sistema compuesto por glucosa-glucosa oxidasa, metil viológeno (o bencil viológeno) como intermediarios en el transporte de electrones, *LbiTrxR2*, *LinTrx* y DTNB, no detectándose funcionalidad de la misma nuevamente. Finalmente, surgió como interrogante si la misma podría interactuar con la otra isoforma presente en la bacteria (la *LbiTrxR1*) modificando su actividad, ya sea inhibiéndola o incrementándola. En relación a esto último se realizó un ensayo de reducción de DTNB, en presencia de NADPH y cantidades fijas y bajas de *LbiTrxR1* y crecientes de la *LbiTrxR2* o, en presencia de altas concentraciones de la *LbiTrxR2* y crecientes de la *LbiTrxR1*. En ninguno de los casos se pudo detectar cambios en la actividad TrxR de *LbiTrxR1* en presencia de *LbiTrxR2*. Esto mostró que ambas proteínas, *a priori*, no estarían interactuando en las condiciones evaluadas.

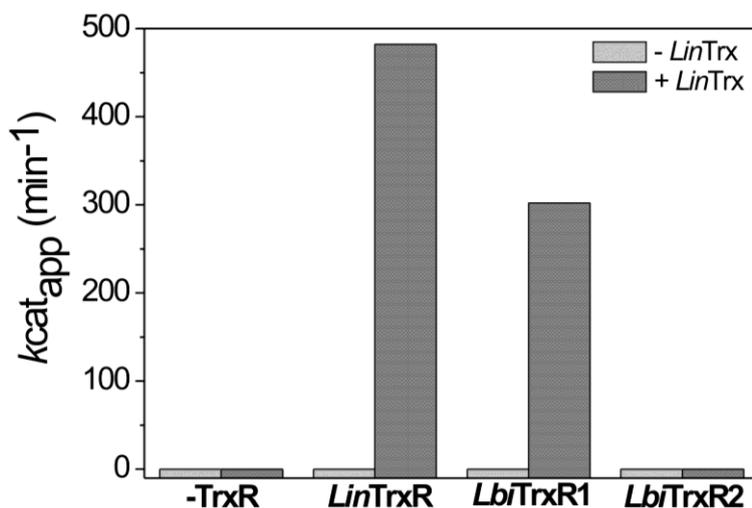


Figura 36 | Funcionalidad del sistema Trx. Se realizaron ensayos de reducción del DTNB a 30 °C y pH 7,0 en presencia de 200 μ M de NADPH, con o sin 3 μ M de *LinTrx*. La actividad TrxR se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 13,6 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y teniendo en cuenta que 1 mol de NADPH rinde 2 moles de TNB.

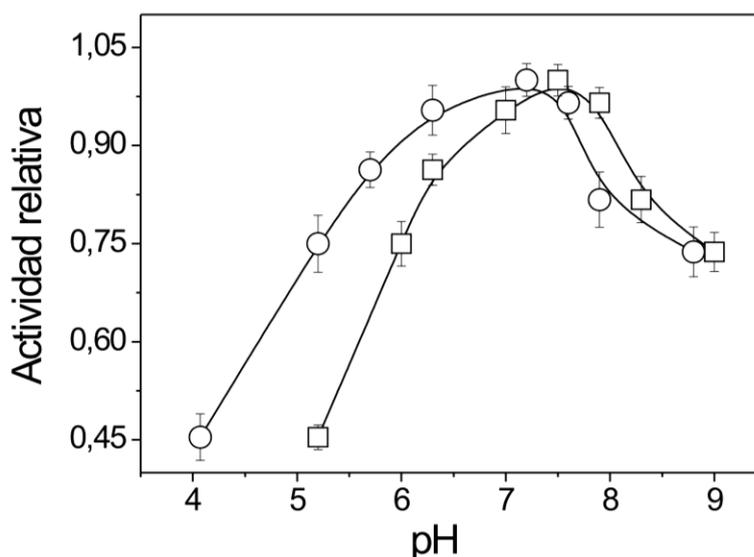


Figura 37 | Curva de pH. La reacción se realizó a 30 °C y en *buffer* fosfato de potasio 100 mM en un rango de pH de 4,0 a 9,0 y con DTNB 5 mM, (□) *LinTrxR* y (○) *LbiTrxR1*.

Por otro lado, los ensayos cinéticos en estado estacionario indican que la reducción de la *LinTrx* (dependiente de NADPH) por la *LinTrxR* y la *LbiTrxR1*, siguen una cinética de Michaelis-Menten (**Figura 38**) y los parámetros cinéticos se detallan en la **Tabla 5**. Los valores señalados en la **Tabla 5** muestran que ambas TrxRs presentan una relativamente alta afinidad por el NADPH y elevada eficiencia de catálisis para reducir la *LinTrx*. Los parámetros obtenidos se hayan en el mismo orden de magnitud a los informados para otras L-TrxRs (Williams, C.H. 1995). Además, las enzimas estudiadas resultaron ser específicas para la *LinTrx*, no mostrando actividad cuando

ésta se reemplazó por Trxs heterólogas, tales como, *E. coli* Trx (obtenida a partir del pET32a), *Prunus pérsica* Trxh (Hartman, M.D. y col. 2014) o *Entamoeba histolytica* Trx8 (Arias, D.G. y col. 2008).

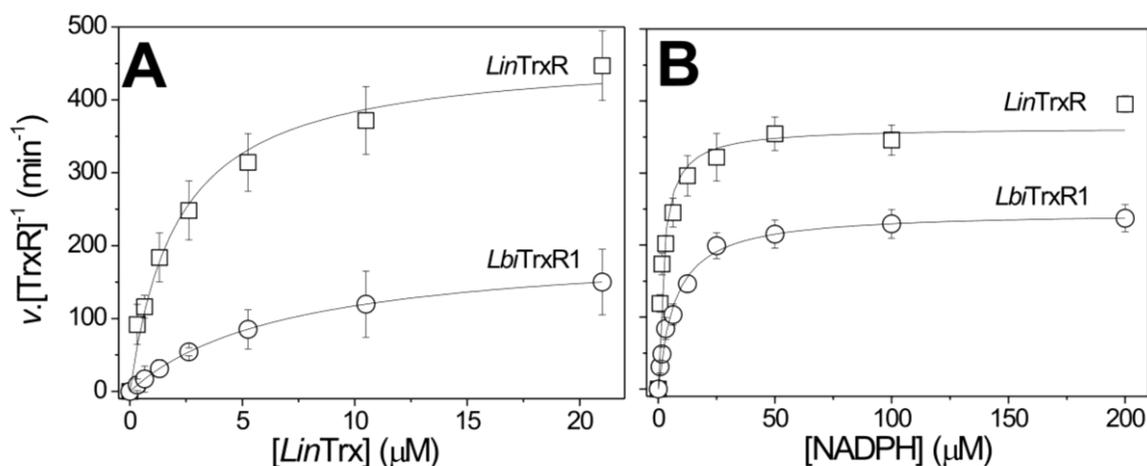


Figura 38 | Cinética de reducción de *LinTrx* dependiente de NADPH para *LinTrxR* y *LbiTrxR1*. Los ensayos se realizaron a 30 ° C y pH 7,0 en presencia de 5 mM DTNB y de cada TrxR 17 nM y con diferentes concentraciones de *LinTrx* (0,5 - 20 μM) y NADPH 200 μM (A) o concentraciones de NADPH (3 - 200 μM) y 20 μM *LinTrx* (B).

Como parte de la caracterización de estas enzimas, se ha evaluado sus capacidades para reducir otros sustratos disulfuros de baja masa molecular, tales como: GSSG, Cys y lipoamida, o no disulfuros como: MBQ, $K_3Fe(CN)_6$, CDNB y Se_2O_3 . Para esto se efectuó un ensayo análogo al anterior donde se reemplazó el DTNB por el sustrato a investigar, manteniendo constante y saturante la concentración de NADPH. Los datos cinéticos indican que sólo la MBQ y el $K_3Fe(CN)_6$ pudieron ser usados como sustratos alternativos dentro de los rangos de concentraciones evaluados (**Tabla 5**). La reducción de éstos sigue una cinética de Michaelis-Menten, y las eficiencias catalíticas calculadas para la reducción tanto de MBQ como del $K_3Fe(CN)_6$ fueron dos o tres órdenes de magnitud menores a lo obtenido para la reducción de la *LinTrx*. Estos resultados concuerdan con lo informado en la bibliografía, ya que en general las L-TrxR presentan baja promiscuidad (baja capacidad de emplear sustratos diferentes a las Trxs) (Banerjee, R. 2008).

Tabla 5 |. Parámetros cinéticos aparentes de *LinTrxR* y *LbiTrxR1* para la reducción de sustratos disulfuro y no-disulfuro a pH 7.0 y 30 ° C. N.D.: no detectable.

Proteína	Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>LinTrxR</i>	<i>LinTrx</i> 14 μM	NADPH	$2,2 \pm 0,3$	363 ± 11	$2,8 \cdot 10^6$
		<i>LinTrx</i>	$2,1 \pm 0,3$	464 ± 20	$3,7 \cdot 10^6$
		Na_2SeO_3	N. D.	N. D.	N. D.
	NADPH 200 μM	CDNB	N. D.	N. D.	N. D.
		DTNB	908 ± 73	$12,3 \pm 0,3$	$2,3 \cdot 10^2$
		MBQ	1369 ± 392	637 ± 149	$7,6 \cdot 10^3$
		$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	369 ± 79	625 ± 101	$2,8 \cdot 10^4$
<i>LbiTrxR1</i>	<i>LinTrx</i> 14 μM	NADPH	7 ± 1	246 ± 20	$5,9 \cdot 10^5$
		<i>LinTrx</i>	$6,7 \pm 0,8$	802 ± 74	$1,9 \cdot 10^6$
		Na_2SeO_3	N. D.	N. D.	N. D.
	NADPH 200 μM	CDNB	N. D.	N. D.	N. D.
		DTNB	1514 ± 291	29 ± 3	$3,2 \cdot 10^2$
		MBQ	132 ± 21	856 ± 45	$1,1 \cdot 10^5$
		$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	383 ± 97	198 ± 22	$8,6 \cdot 10^3$

El siguiente análisis consistió en examinar el efecto de uno de los productos de reacción, el NADP^+ , sobre la actividad TrxR de la *LinTrxR* y la *LbiTrxR1*. En primer lugar, se evaluó la actividad de las enzimas en presencia de diferentes concentraciones de NADPH, a una concentración fija de *LinTrx* y variables concentraciones de NADP^+ . Analizando los resultados obtenidos, se determinó que el NADP^+ presenta un mecanismo de inhibición competitivo respecto al NADPH, con un K_{ic} de 90 μM para *LinTrxR* y un K_{ic} de 128 μM para *LbiTrxR1*. En segundo lugar, se estimó la actividad de las enzimas en presencia de diferentes concentraciones de *LinTrx*, a una concentración fija de NADPH y concentraciones variables de NADP^+ . Este ensayo indicó que el NADP^+ actúa como un inhibidor mixto en relación a la *LinTrx*. Las constantes de inhibición calculadas fueron un K_{ic} de 1,7 mM y un K_{iu} de 2,2 mM para la *LinTrxR*,

mientras que las constantes de inhibición para la *LbiTrxR1* fueron K_{ic} de 1,1 mM y K_{iu} de 0,9 mM. Estos resultados soportan la idea de que ambos sustratos se unen a sitios diferentes en la enzima, tal como se encontró para TrxRs de otras fuentes (Strelow, J. y col. 2004; Urig, S. y col. 2006).

Con el objetivo de evaluar la importancia de los residuos de Cys (como tioles) en la actividad disulfuro reductasa de *LinTrxR* y *LbiTrxr1*, se decidió medir la actividad DTNB reductasa en presencia de cationes divalentes. Solamente, Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} exhibieron un significativo efecto inhibitorio (**Figura 39**) y los respectivos valores de IC_{50} se detallan en la **Tabla 6**. El efecto inhibitorio del Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} fue parcialmente revertido luego del tratamiento con EDTA, sin embargo el efecto que ejerce el Hg^{2+} sobre la enzima no fue reversible. Los resultados obtenidos indican la participación de los residuos de Cys en la actividad disulfuro reductasa de la enzima, ya que la unión de los iones metálicos bloquea la capacidad del grupo tiolato de participar en reacciones de intercambio tiol/disulfuro, inhibiendo por lo tanto la actividad de la enzima (Giles, N.M. y col. 2003).

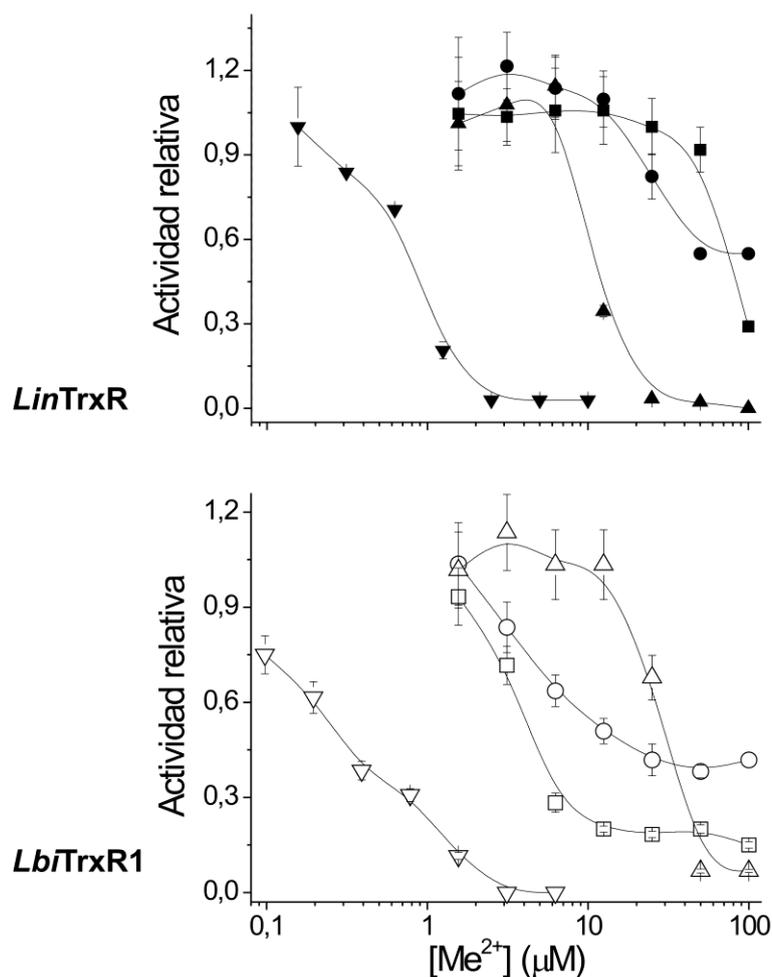


Figura 39 | Perfil inhibitorio de la actividad DTNB reductasa en presencia de iones metálicos: Hg^{2+} (∇), Cu^{2+} (Δ), Co^{2+} (O) y Zn^{2+} (\square). Los ensayos se realizaron a pH 7,0 y a 30 ° C, utilizando TrxR 17 nM, NADPH 200 μM , DTNB 1 mM y diferentes concentraciones de cada ión metálico: Zn^{2+} 1,6-100 μM , Co^{2+} 1,6-100 μM , Cu^{2+} 1,6-100 μM y Hg^{2+} 0, 2-10 μM .

Tabla 6 | Efecto inhibitorio de iones de metales pesados sobre la actividad de las TrxRs. El análisis fue realizado a 30 ° C y pH 7,0.

Enzyme	Me^{2+}	IC_{50} (μM)
<i>LinTrxR</i>	Zn^{2+}	80 ± 2
	Co^{2+}	100 ± 22
	Cu^{2+}	$10,5 \pm 0,3$
	Hg^{2+}	$0,82 \pm 0,06$
<i>LbiTrxR1</i>	Zn^{2+}	5 ± 1
	Co^{2+}	20 ± 5
	Cu^{2+}	28 ± 1
	Hg^{2+}	$0,28 \pm 0,04$

4.2.3.2. Estudios de inhibición de la actividad disulfuro reductasa de *LinTrxR* y *LbiTrxR1*

El criterio para la selección de las drogas empleadas en los ensayos de inhibición tanto *in vitro* como *in vivo* (los cuales se detallan más adelante), fue considerando lo reportado en la bibliografía acerca de varios agentes con potencial efecto inhibitorio sobre el sistema tiorredoxina (Lu, J. y col. 2006; Kristiansen, J.E. y col. 2015; Siriwong, S. y col. 2015; Edwards, K. 2016). Los agentes ensayados fueron: mercurocromo, azul de metileno, quercetina y piocianina. Empleando una concentración fija y saturante de NADPH, al igual que de DTNB, pero variable de cada uno de los compuestos a ensayar (ver **Tabla 3** en Materiales y Métodos), se evaluó la actividad de DTNB reductasa de *LinTrxR* y *LbiTrxR1*. Según este ensayo, el mercurocromo fue el inhibidor más potente de la *LinTrxR* ($IC_{50} = 0,34 \pm 0,09 \mu M$), seguido en orden decreciente por el azul de metileno ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,3 \mu M$), la quercetina ($IC_{50} = 17 \pm 4 \mu M$) y la piocianina ($IC_{50} = 19 \pm 7 \mu M$). Un análisis similar fue realizado para la *LbiTrxR1*, presentando el siguiente comportamiento de los inhibidores sobre la actividad de la enzima: mercurocromo ($IC_{50} = 0,099 \pm 0,009 \mu M$), azul de metileno ($IC_{50} = 2,8 \pm 0,6 \mu M$), piocianina ($IC_{50} = 9 \pm 1 \mu M$) y quercetina ($IC_{50} = 25 \pm 3 \mu M$).

Dado que el azul de metileno cumple el criterio de ser una droga BONARIA (BON significa segura y eficaz, A representa asequible, R significa registrada, e IA representa internacionalmente accesible), la cual ha sido empleado en ensayos clínicos por muchas décadas (Buchholz, K. y col. 2008); y ya que además, se ha comprobado que es un potente inhibidor de la *LinTrxR in vitro*, se continuó estudiando su mecanismo de acción sobre esta enzima. Si bien, la actividad DTNB reductasa de *LbiTrxR1* también fue inhibida por azul de metileno, se decidió seguir trabajando solamente con la enzima homóloga de la especie patógena con el objeto de evaluar a la misma como un potencial blanco para el diseño de agentes terapéuticos. No es posible definir al azul de metileno como un inhibidor clásico, ya que este actúa como un sustrato subversivo, lo cual significa que tiene la habilidad de convertir una enzima disulfuro reductasa antioxidante en pro-oxidante (Krauth-Siegel, R.L. y col. 2005; Kasozi, D.M. y col. 2011). Por otro lado, tanto la *LinTrx* como la *LinTrxR* podrían ser blancos de ataque para los derivados de fenotiazinas, así como también, ambas proteínas tendrían la capacidad de reducir a éstos. En relación a lo antes mencionado, se siguió la reducción de DTNB para determinar la pérdida de actividad de la *LinTrxR*,

mostrando que el azul de metileno puede ser reducido tanto por *LinTrxR* como por *LinTrx*, señalando un efecto sinérgico entre ambas, con concentraciones crecientes de *LinTrx* y en presencia de *LinTrxR* (Figura 39). Por el contrario, en ausencia de *LinTrx* fue necesario emplear altas concentraciones de *LinTrxR* (0,17 μM) (Figura 40). La reducción del azul de metileno sigue una cinética de saturación del tipo Michaelis-Menten (Figura 40), con un valor de K_m de 12 μM , una k_{cat} de 91 min^{-1} y una relación $k_{\text{cat}} K_m^{-1} \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Las constantes cinéticas obtenidas para la *LinTrxR* en presencia de *LinTrx*, la cual aparentemente tiene la capacidad de transferir electrones al azul de metileno, son similares a las reportadas para otras flavoenzimas, tales como la TrxR de *Plasmodium falciparum* (Krnajski, Z. y col. 2001).

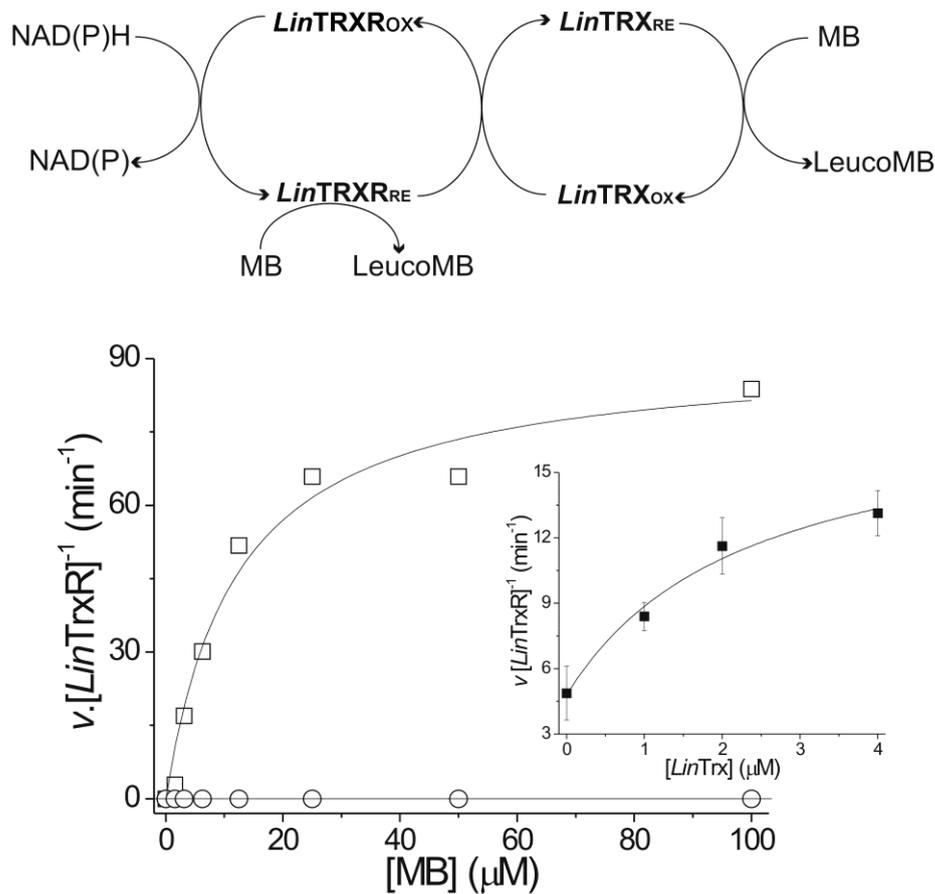
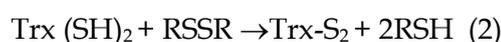


Figura 40 | Cinética de reducción del azul de metileno por el sistema Trx de *L. interrogans*. El análisis fue realizado a 30 ° C y pH 7,0, con 1,56-100 μM de azul de metileno (MB), en ausencia (○) o en presencia de *LinTrx* (□). En el gráfico interno se muestra el efecto sinérgico entre *LinTrxR* y *LinTrx* en la reducción de MB, lo cual significa mayor reducción de MB con mayores concentraciones de *LinTrx*. Las reacciones fueron realizadas en presencia de diferentes concentraciones de *LinTrx*, MB 100 μM , *LinTrxR* 0,2 μM y NADPH. 200 μM . La actividad fue medida siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm. (MB del inglés *methylene blue*)

4.2.3.3. Capacidad de reducción de disulfuros de baja masa molecular y S-nitrosotioles por la *LinTrx*

Tal como se mencionó previamente la *LinTrxR* fue incapaz de reducir sustratos disulfuros de baja masa molecular u otras proteínas disulfuro diferentes a la *LinTrx*. Por tal motivo, se midió la actividad disulfuro reductasa de la *LinTrx*, siguiendo para ello la oxidación del NADPH en una reacción conteniendo un exceso cinético de *LinTrxR*. Bajo estas condiciones, la reacción (1) ocurre rápido, y genera suficiente cantidad de *LinTrx*, la cual actúa luego sobre varios sustratos disulfuros mediante un intercambio redox no enzimático, de acuerdo a la reacción (2).



De este modo, la ley de velocidad propuesta es $v = k [\text{Trx-(SH)}_2] \cdot [\text{RSSR}]$, y a partir de ésta se puede calcular la constante de pseudo-segundo orden (k), la cual refleja la eficiencia cinética de la *LinTrx* frente a los diferentes RSSR. Los valores obtenidos por la enzima a pH 7,0 y a 30 °C fueron: 64 M⁻¹ s⁻¹ sobre la lipoamida, 50 M⁻¹ s⁻¹ para la cistina, 30 M⁻¹ s⁻¹ para el GSSG y 33 M⁻¹ s⁻¹ para la bis- γ -GC. Las eficiencias catalíticas calculadas para la reducción de los disulfuros de baja masa molecular a expensas de la *LinTrx* son similares a aquellos obtenidos para Trx de otros organismos (Ariyanayagam, M.R. y col. 1999; Flohe, L. y col. 1999; Muller, S. y col. 2001; Kanzok, S.M. y col. 2002). Los S-nitrosotioles (RSNO) son portadores de NO, y son producidos por las células huésped como mecanismo de defensa durante procesos infectivos. La reducción de RSNO por la *LinTrx* sugeriría que la bacteria posee un sistema enzimático capaz de resistir al daño generado por esas tóxicas ERN. Teniendo en cuenta la importancia que esto significaría desde el punto de vista fisiológico, se analizó la capacidad de la *LinTrx* de reducir CySNO, GSNO y γ -GCSNO. Para calcular las eficiencias de catálisis de la proteína, se procedió como se describió previamente para evaluar la capacidad de la *LinTrx* para reducir los tioles de baja masa molecular. La *LinTrx* no fue efectiva para reducir CySNO ni GSNO, pero si fue capaz de reducir γ -GCSNO ($k = 138 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

4.2.3.4. Determinación del potencial redox de *LinTrx*

Para una mejor evaluación de la capacidad redox del sistema Trx de *L. interrogans*, se determinó el E° para *LinTrx*, siguiendo la metodología descrita por Arias, D.G. y col. (2008). Como se muestra en la **Figura 40**, la reacción entre la *LinTrx* oxidada y el NADPH, catalizada por la *LinTrxR*, fue reversible. Mediante el monitoreo de la reacción con cantidades variables de *LinTrx*, se pudieron determinar las concentraciones de los reactantes en el equilibrio. Con los datos obtenidos y empleando la ecuación de Nernst, se estimó el valor de E° de -290 ± 5 mV para la *LinTrx* (**Figura 41**), un valor similar a lo reportado para Trxs de diferentes organismos (Mossner, E. y col. 1999; Jeon, S.J. y col. 2002; Watson, W.H. y col. 2003). Además, el E° hallado para la proteína sugiere que la misma podría tener un rol importante en el metabolismo redox de la bacteria, siendo involucrada en el intercambio de equivalentes de reducción con diferentes metabolitos. De acuerdo a esto, el sistema Trx podría trabajar junto a la *LinAhpC* (cuyo E° es de -217 mV) (Arias, D.G. y col. 2014) y a otros metabolitos.

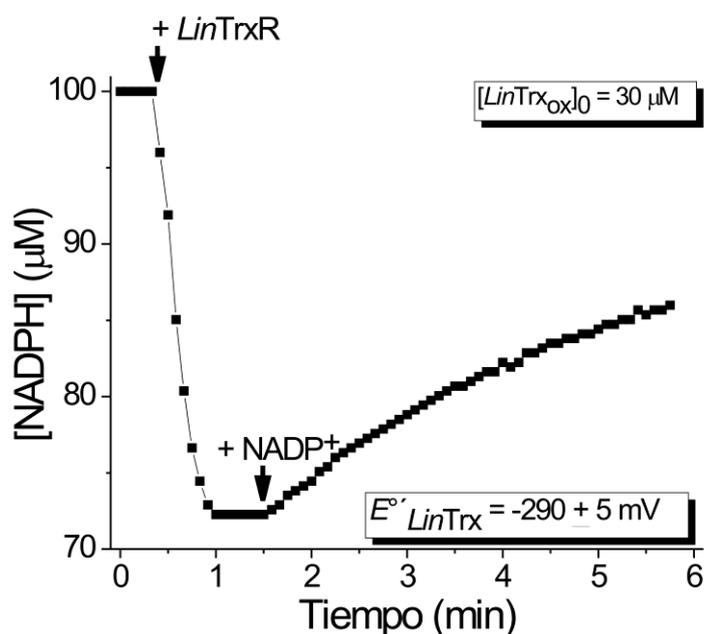


Figura 41 | Determinación del potencial redox de la *LinTrx*. La reducción de 30 µM de *LinTrx* en la forma de disulfuro fue iniciada por adición de *LinTrxR* 0,5 µM. Cuando la reacción se detuvo se agregó NADP⁺ a una concentración final de 1,2 mM. La formación de NADP⁺ y NADPH fue seguida espectrofotométricamente a 340 nm a 30 °C y pH 7,0.

A continuación, se determinó la capacidad de la *LinTrx* de operar junto a la *LinAhpC* en la reducción de peróxidos, de modo NADPH dependiente. En este sistema

acoplado, la velocidad de reducción de H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$ fue dependiente de la concentración de *LinAhpC*, como previamente se observó utilizando un sistema acoplado heterólogo (Arias, D.G. y col. 2014). En la **Tabla 7** se muestran los parámetros cinéticos de reducción de H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$ por *LinAhpC* (en forma dependiente de Trx), la cual sigue una cinética hiperbólica (**Figura 42**). Las eficiencias catalíticas ($k_{\text{cat}}K_m^{-1}$) calculadas para la reducción de ambos peróxidos fueron similares, lo cual podría indicar que la enzima presenta promiscuidad en el uso de sustratos, lo que resulta bastante común para este tipo de enzimas (Baker, L.M. y col. 2001; Hofmann, B. y col. 2002; Arias, D.G. y col. 2008; Parsonage, D. y col. 2008; Parsonage, D. y col. 2010). Conforme a lo anterior, *LinAhpC* actúa con un sistema reductor homólogo con eficiencias de catálisis comparables a las obtenidas usando el sistema Trx de *E. coli* (Arias, D.G. y col. 2014).

Tabla 7 | Parámetros cinéticos aparentes para *LinAhpC* a pH 7.0 y 30 °C.

Proteína	Co-sustrato	Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>LinAhpC</i>	<i>LinTrx</i>	$t\text{-BuOOH}$	7 ± 2	157 ± 27	$3,7 \cdot 10^5$
	<i>LinTrx</i>	H_2O_2	10 ± 2	159 ± 21	$2,7 \cdot 10^5$
	$t\text{-BuOOH}$	<i>LinTrx</i>	9 ± 2	186 ± 24	$3,4 \cdot 10^5$
	H_2O_2	<i>LinTrx</i>	6 ± 1	109 ± 13	$3,0 \cdot 10^5$

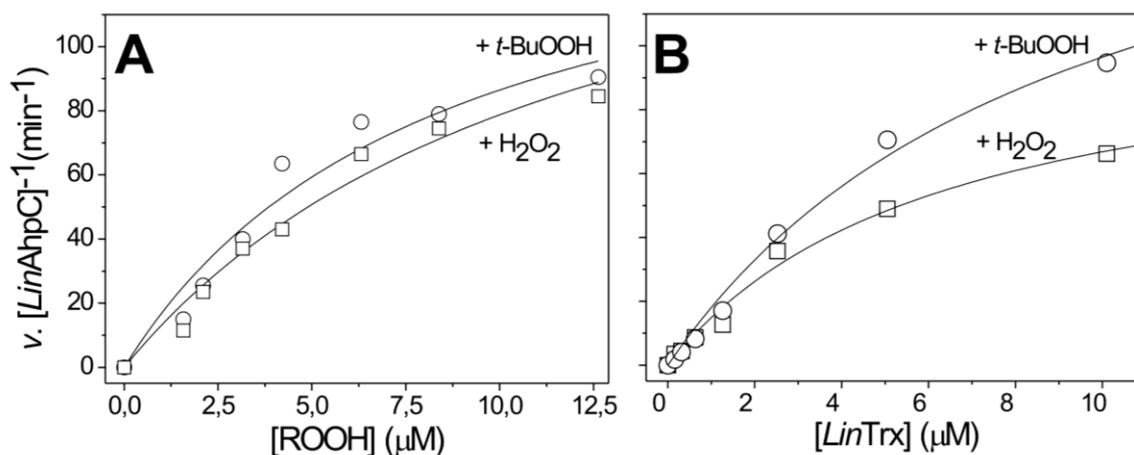


Figura 42 | Actividad peroxidasa de *LinAhpC*. **A.** Cinética de reducción de H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$ por *LinAhpC*. Las reacciones se realizaron en presencia de *LinTrx* 10 μM y H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$ 0,39 – 12,5 μM . **B.** Cinética de la oxidación de *LinTrx* por *LinAhpC*. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 100 μM de H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$ y utilizando 0,38 – 20 μM de *LinTrx*. Los parámetros cinéticos se determinaron monitoreando el consumo de NADPH a 340 nm. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo a pH 7,0 y 30 °C.

4.2.3.5. Evaluación de la capacidad antioxidante de las proteínas recombinantes sobre células de *E. coli*

Después de determinar la funcionalidad *in vitro* de las TrxRs, se propuso evaluar la posible protección, frente a la presencia de diferentes oxidantes, que las células de *E. coli* transformadas con las construcciones recombinantes ([pET28c/*LinTrxR*], [pET28c/*LbiTrxR1*] y [pET28c/*LbiTrxR2*]) presentaban respecto a las bacterias transformadas con el plásmido vacío. Para poder evaluar la capacidad antioxidante de los diferentes cultivos bacterianos se realizó un ensayo de inhibición en disco. Los halos de inhibición se midieron en presencia de compuestos oxidantes, tales como MV, MBQ, diamida, H₂O₂ y *t*-BuOOH. Las placas conteniendo células de *E. coli* sobre-expresantes de *LinTrxR* o *LbiTrxR1* mostraron halos de inhibición con menor diámetro que la placa control (células de *E. coli* transformadas con [pET28c]) en presencia de MV (**Figura 43**). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre el control y las células productoras de *LinTrxR* o *LbiTrxR1*, cuando las mismas se crecieron en presencia de H₂O₂, *t*-BuOOH o diamida (**Figura 43**). Por otro lado, las células sobre-expresantes de *LinTrxR* fueron más sensibles a MBQ, lo cual era esperable, ya que la MBQ fue sustrato de la *LinTrxR* en los ensayos *in vitro* (**Tabla 6**). Este último resultado sugiere que la reducción de esta quinona por la *LinTrxR* seguido por su reciclo redox puede convertir esta enzima antioxidante en pro-oxidante. Resulta importante destacar de que las células sobre-expresantes de *LbiTrxR2* muestran un halo de inhibición menor, respecto al ensayo control, en presencia de MBQ y ambos peróxidos, lo cual sería indicativo de que *LbiTrxR2* presentaría una función antioxidante *in vivo*.

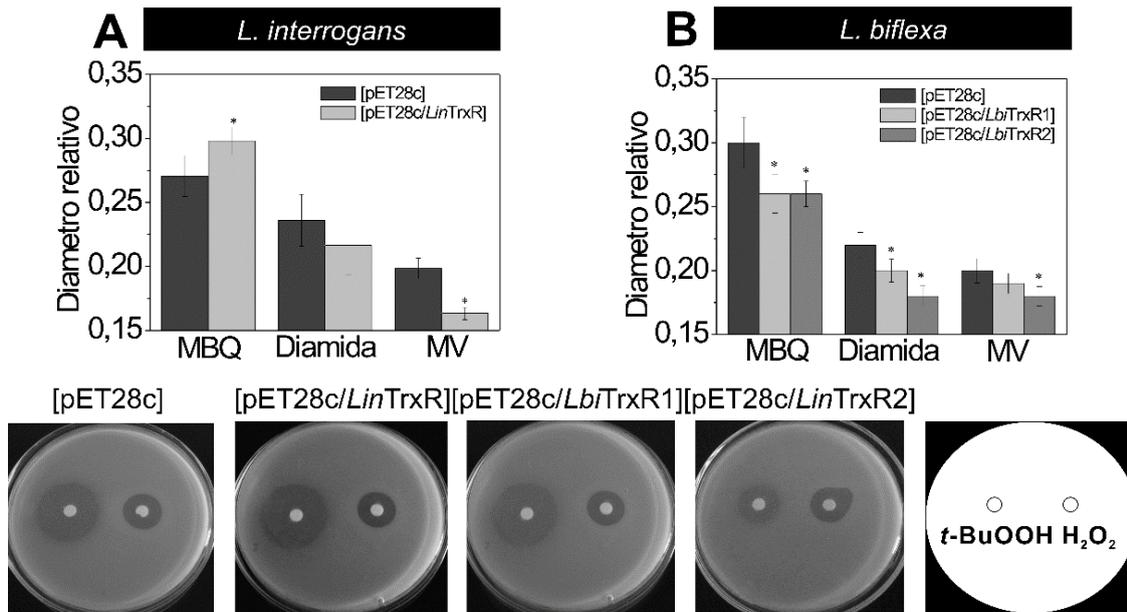


Figura 43 | Ensayos de inhibición del crecimiento de células de *E. coli* transformadas en presencia de agentes oxidantes. Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET28c (ensayo de control) o con pET28c/LinTrxR, pET28c/LbiTrxR1 o pET28c/LbiTrxR2 y con una DO_{630nm} de 0,6 fueron inducidos por 1 h en presencia de 0,1 mM IPTG. Luego, las células con una DO_{630nm} normalizada se añadieron en un soft agar con la adición de kanamicina (50 mg. ml⁻¹). Finalmente, estas células fueron expuestas a metil viológeno 1 M (MV), 2-metilbenzoquinona (MBQ) 0,1 M, diamida 0,5M, H₂O₂ 1 M o t-BuOOH 0,01 M. Después de la incubación de las placas a 37 °C durante toda la noche, se realizó la lectura de los ensayos. Los resultados son promedio de tres experiencias independientes. (*): indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la relación diámetro relativo del halo de inhibición (cm) / diámetro de la placa (cm).

4.2.4. Evaluación de modificaciones post-traduccionales de LinTrx

En este apartado se revisarán algunos de los conceptos introducidos previamente. La S-glutathionilación y la S-nitrosilación consisten en la unión covalente entre una molécula de glutatión (GSH) o nitrosilo (NO), respectivamente, al átomo de azufre de la Cys (Dalle-Donne, I. y col. 2007; Sengupta, R. y col. 2012). Ambos procesos celulares ocurren tanto en situación fisiológica como consecuencia de estreses nitrosativo u oxidativo. Además de esto, constituyen mecanismos de regulación redox que tienen la capacidad de regular la estructura/función de un amplio rango de proteínas (Dalle-Donne, I. y col. 2007; Sengupta, R. y col. 2012). Existen numerosos antecedentes de que tanto la Trx como la Grx pueden glutathionilarse o nitrosilarse (Gaston, B.M. y col. 2003; Sengupta, R. y col. 2013).

4.2.4.1. Glutathionilación de *LinTrx*

4.2.4.1. A. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de *LinTrx* según el estado redox

Las técnicas que utilizan el fenómeno de fluorescencia intrínseca requieren la presencia de los aminoácidos Trp, Tyr y/o Phe en la secuencia primaria de las proteínas analizadas (Ghisaidoobe, A.B. y col. 2014). En el caso la *LinTrx*, esta contiene dos Trp, una Tyr y dos Phe. Para determinar cambios de fluorescencia frente a distintos estados redox, la *LinTrx* recombinante fue reducida con DTT o GSH, y oxidada con GSSG a pH 7,5. Las muestras fueron excitadas a la longitud de onda de 280 nm en un espectrofluorímetro y los espectros de emisión de fluorescencia se registraron entre 300–400 nm (**Figura 44**). La intensidad de fluorescencia registrada fue mayor en orden decreciente para la *LinTrx* tratada con DTT, GSH y GSSG. Esas diferencias espectrales refieren cambios en la estructura tridimensional de la proteína en función del estado redox. Según lo reportado, la Trx de *E. coli* también mostró un incremento en la intensidad de la fluorescencia por reducción de las Cys del sitio activo. Esto se lo ha relacionado al efecto de *quenching* que ejerce la forma de disulfuro de las Cys del sitio activo en la fluorescencia del residuo de Trp adyacente (Stryer, L. y col. 1967). Esto podría explicar la mayor intensidad de fluorescencia de las variantes reducidas de *LinTrx* respecto a la forma oxidada. Por otro lado, las modificaciones registradas en los espectros de fluorescencia de la *LinTrx* en presencia de GSSG y GSH podrían indicar la capacidad de glutathionilarse de la proteína, sin embargo este ensayo no es concluyente de este comportamiento y por tanto se realizó el ensayo que se describe a continuación.

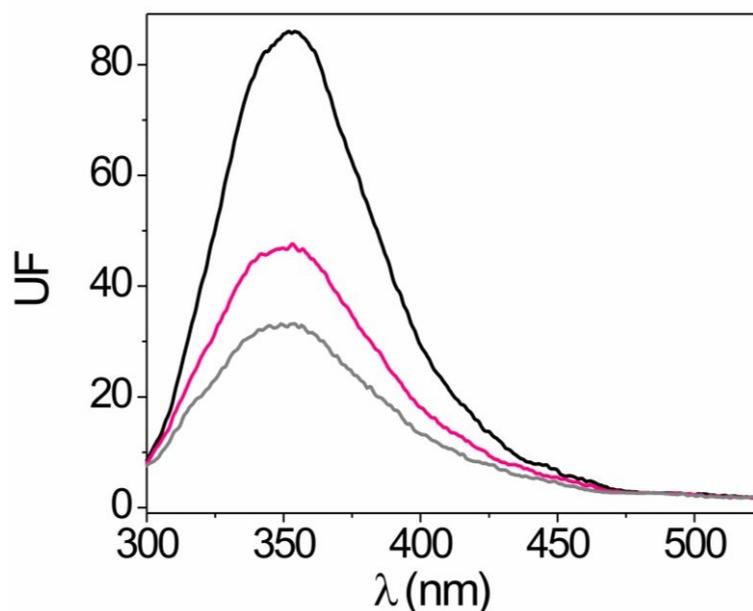


Figura 44 | Espectro de emisión de fluorescencia de la *LinTrx* oxidada y reducida. La *LinTrx* recombinante (5 μ M) se trató con 1 mM de DTT (trazo negro), GSH (trazo fucsia) y GSSG (trazo gris), respectivamente, a 30 $^{\circ}$ C y *buffer* fosfato pH 7,0.

4.2.4.1. B. Capacidad de auto-glutationilarse de *LinTrx*

Con el objetivo de poner en evidencia la formación de disulfuros mixtos entre la *LinTrx* y el GSSG, se realizaron ensayos de glutationilación empleando el fluoróforo, di-eosina-glutación disulfuro (Di-E-GSSG). Este compuesto presenta un bajo nivel de fluorescencia en su forma de disulfuro debido a la auto-extinción (*self-quenching*), mientras que la forma reducida (GSH-E) exhibe una gran emisión de fluorescencia a 545 nm (con excitación a 520 nm) (Coppo, L. y col. 2016). Esta propiedad lo hace un reactivo interesante para marcar los residuos de Cys cuando son glutationilados. Para este ensayo, una solución de *LinTrx* recombinante fue tratada con Di-E-GSSG y subsecuente tratamiento con y sin DTT (**Figura 45**). En simultáneo se empleó una solución conteniendo *LinTrx* en presencia y ausencia de DTT pero sin la adición del fluoróforo (**Figura 45**). Los productos de cada tratamiento se resolvieron mediante SDS-PAGE no reductor. Finalizada la electroforesis, el gel se reveló utilizando el escáner *Typhoon* (GE Healthcare), para capturar la fluorescencia emitida (**Figura 45**). Esa banda fluorescente es debido al tratamiento de la *LinTrx* con Di-E-GSSG y en ausencia de DTT, lo cual estaría indicando su capacidad de glutationilarse. Es importante indicar que no se detectó fluorescencia en la calle donde se sembró la proteína marcada con Di-E-GSSG, y posteriormente tratada con DTT. En esta calle la marca de fluorescencia desaparece luego de la reducción con DTT, por lo tanto se

puede concluir que la unión entre la proteína y el fluoróforo sería específicamente por la formación reversible de un puente disulfuro mixto. Tampoco se detectó fluorescencia en las calles donde se sembró la Trx en presencia y ausencia de DTT, descartando de este modo la autofluorescencia de la proteína.

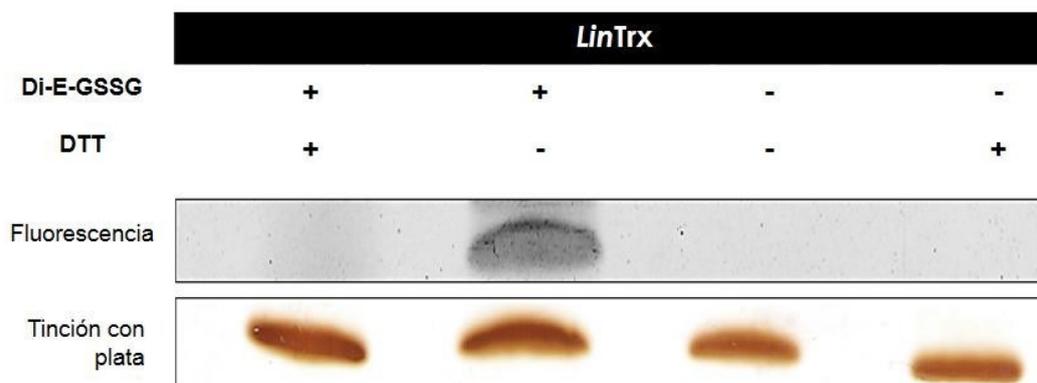


Figura 45 | Auto-glutacionilación de la *LinTrx*. La *LinTrx* (1 μ M) se incubó secuencialmente a 30 °C por 15 min en *buffer* Tris-HCl pH 7,5 con DiE-GSSG 10 μ M y posteriormente con DTT 10 mM o en su ausencia. Los ensayos controles de la proteína sola en *buffer* de muestra de SDS-PAGE no reductor (DTT -) y reductor (DTT +) se incubaron durante los mismos tiempos y temperaturas que las otras muestras. El panel de arriba muestra fluorescencia de las muestras registradas con el escáner *Thyphoon*. El panel de abajo corresponde al control de carga de proteína mediante la tinción con nitrato de plata del SDS-PAGE.

4.2.4.2. S-nitrosilación de *LinTrx*

Es importante recordar que, como se describió antes en este capítulo, la *LinTrx* presenta capacidad de reducir S-nitrosotioles, pudiendo actuar como una vía de eliminación de estos metabolitos. No obstante, en vista de los antecedentes mencionados arriba, se propuso evaluar la sensibilidad de la *LinTrx* a la S-nitrosilación mediada por un nitrosotiol de baja masa molecular (en este caso se empleó el GSNO). El experimento consistió en incubar a la proteína reducida con GSNO y evaluar, posteriormente, la cantidad de grupos -SNO (y grupos -SH remanentes) que se han formado y si esta modificación podría generar alteraciones en su actividad catalítica. Brevemente, en primer lugar, se incubó la *LinTrx* en presencia de DTT (etapa de reducción para que todos los residuos Cys se encuentren en forma -SH) y posteriormente se incubó con GSNO (etapa de nitrosilación). El exceso de cada uno de estos agente químicos fue eliminado por desalado con empelo de una matriz de *Sephadex G-25*. Como se observa en la **Figura 46**, la proteína nitrosilada mostró un pico a 335 nm [característico de la presencia de nitrosotioles (Hashemy, S.I. 2008; Vanin,

A.F. y col. 2011)]. El número de tioles y nitrosotioles presente en la *LinTrx* pretratada y luego del tratamiento con GSNO se detallan en la **Tabla 8**. El número de tioles en la proteína reducida (*LinTrx-SH*) es consistente con el número de Cys identificados en su secuencia primaria a partir de su análisis *in silico* (**Figura 31**). Curiosamente, el número de nitrosotioles estimados para la proteína tratada (*LinTrx-SNO*) es el mismo que el número de residuos de Cys presentes en la proteína. En relación a estos resultados se puede inferir, *a priori*, que los tres residuos de Cys serían igualmente sensibles a ser nitrosilados. En relación a esto, se evaluó si la modificación redox podría traer cambios en la capacidad de la *LinTrx* modificada de ser reducida por su par, la *LinTrxR*. Fue interesante observar que la eficiencia catalítica para la reducción de *LinTrx-SNO* por *LinTrxR* fue ~5 veces menor que para la reducción de la forma *LinTrx-SH* (**Tabla 8**). Es importante mencionar que, las diferencias observadas en las eficiencias catalíticas calculadas radican, principalmente, en diferencias en los valores de k_{cat} estimados y no en los valores de K_m obtenidos para cada tipo de Trx sustrato (resultados no mostrados). Esto nos podría indicar que la nitrosilación de la *LinTrx* podría, en forma simplificada, modificar la etapa catalítica en la transferencia de equivalentes de reducción por parte de la *LinTrxR* hacia esta y no así la unión de estas proteínas. Estos resultados, si bien son preliminares, podrían indicar que esta modificación redox actuaría como un modulador de la actividad de la *LinTrx*, dado que repercute en la capacidad de reciclarse a expensas de la *LinTrxR*. Se deja abierto el interrogante acerca de si la *LinTrx-SNO* podría actuar como un dador de grupos NO para otras proteínas, y así participar, por lo tanto, en vías de transnitrosilación.

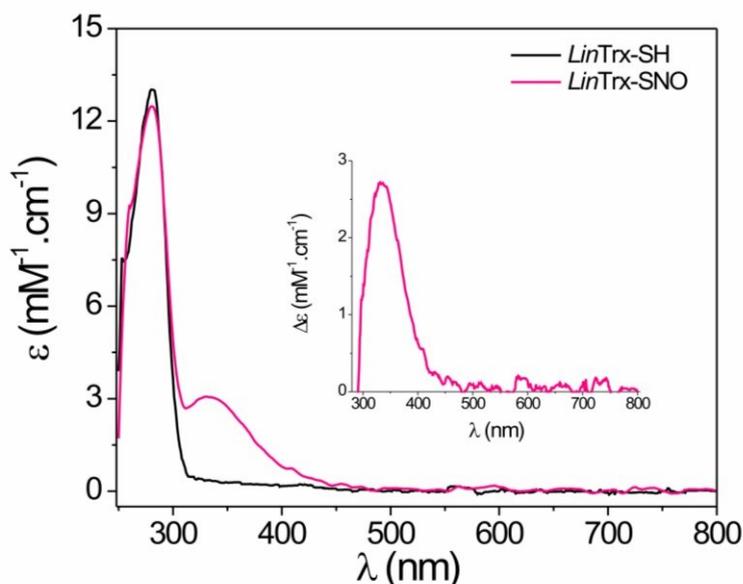


Figura 46 | Espectro de absorción UV-Visible de la *LinTrx* nitrosilada. La *LinTrx* (781 μM) se incubó sucesivamente en presencia de DTT 100 mM y luego con GSNO 5 mM, durante 15 min y a 30 °C. Los excesos de ambos agentes se eliminaron a través de una *Sephadex G-25*. Para determinar la concentración de -SNO se usó un $\epsilon_{335\text{nm}} = 0,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para determinar la concentración de proteína se empleó un $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ calculado en forma teórica a partir de la secuencia primaria empleando para ello el Vector NTI.10.0. En el gráfico interior se representa la diferencia entre los espectros registrados de la proteína S-nitrosilada y de la proteína reducida.

Tabla 8 | Determinación del número de -SH y -SNO en la *LinTrx* reducida y nitrosilada, respectivamente. Para determinar el número de -SH por mol de proteína se empleó el ensayo de DTNB y un $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para cuantificar tanto los -SNO como las proteínas se procedió como se detalla en la leyenda de la **Figura 46**.

	Trx-SH	Trx-SNO
$[-\text{SH}]/[\text{proteína}]$	$3,02 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,01$
$[-\text{SNO}]/[\text{proteína}]$	-	$2,98 \pm 0,03$
$k_{\text{cat}}\cdot K_{\text{m}-1} (\text{M}_{-1} \text{ s}_{-1})$	$1,5 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$
(reducción por <i>LinTrxR</i>)		

4.2.5. Evaluación de las propiedades antioxidantes sobre extractos celulares de especies de *Leptospira* spp.

4.2.5.1. Determinación de la capacidad de detoxificar peróxidos y de la actividad antioxidante de células de *Leptospiras* spp.

Las bacterias contienen sistemas enzimáticos para detoxificar ambos, peróxidos endógenos y exógenos (Panek, H.R. y col. 2004), con el propósito de determinar la relevancia fisiológica de los mismos, se realizaron dos ensayos *in vivo*. En primer lugar, se estudió cómo la presencia de *t*-BuOOH y H₂O₂ afecta la viabilidad celular de cultivos de *L. interrogans* y *L. biflexa*. En relación a esto, valores similares de IC₅₀ fueron calculados para ambos peróxidos (IC_{50 t-BuOOH} = 0,4 ± 0,1 mM; IC_{50 H2O2} = 0,33 ± 0,05 mM) sobre cultivos de *L. interrogans*, lo cual indicaría que este organismo presenta similar tolerancia frente a ambos peróxidos (**Figura 47A**). Se ha informado en la bibliografía que *L. interrogans* presenta elevada actividad catalasa (Eshghi, A. y col. 2012), sin embargo ésta se inactiva en presencia de *t*-BuOOH (**Figura 47B**), de igual manera a lo reportado en otros organismos (Pichorner, H. y col. 1993). Los resultados obtenidos soportan la existencia de un escenario redox integrado por un grupo de proteínas (además de la catalasa) que trabajan en conjunto para hacer frente a las situaciones de estrés oxidativo. Esas macromoléculas redox incluyen la *LinAhpC*, así como también otras peroxirredoxinas que se han identificado en el proyecto genoma de *L. interrogans*, entre ellas: proteína tipo glutatión peroxidasa (LIC3442), tiol-peroxidasa (LIC12765), y dos proteínas bacterioferritina comigratorias (LIC20093 y LIC19732). Por otro lado, *L. biflexa* mostró un IC₅₀ mayor para el *t*-BuOOH que para el H₂O₂ (IC_{50 t-BuOOH} = 3,5 ± 0,9 mM; IC_{50 H2O2} = 0,07 ± 0,01 mM) (**Figura 47A**). Este efecto es consistente con la baja actividad catalasa descrita para esta bacteria (Rao, P.J. y col. 1964), la cual se sabe que es una enzima críticamente importante para el consumo de H₂O₂.

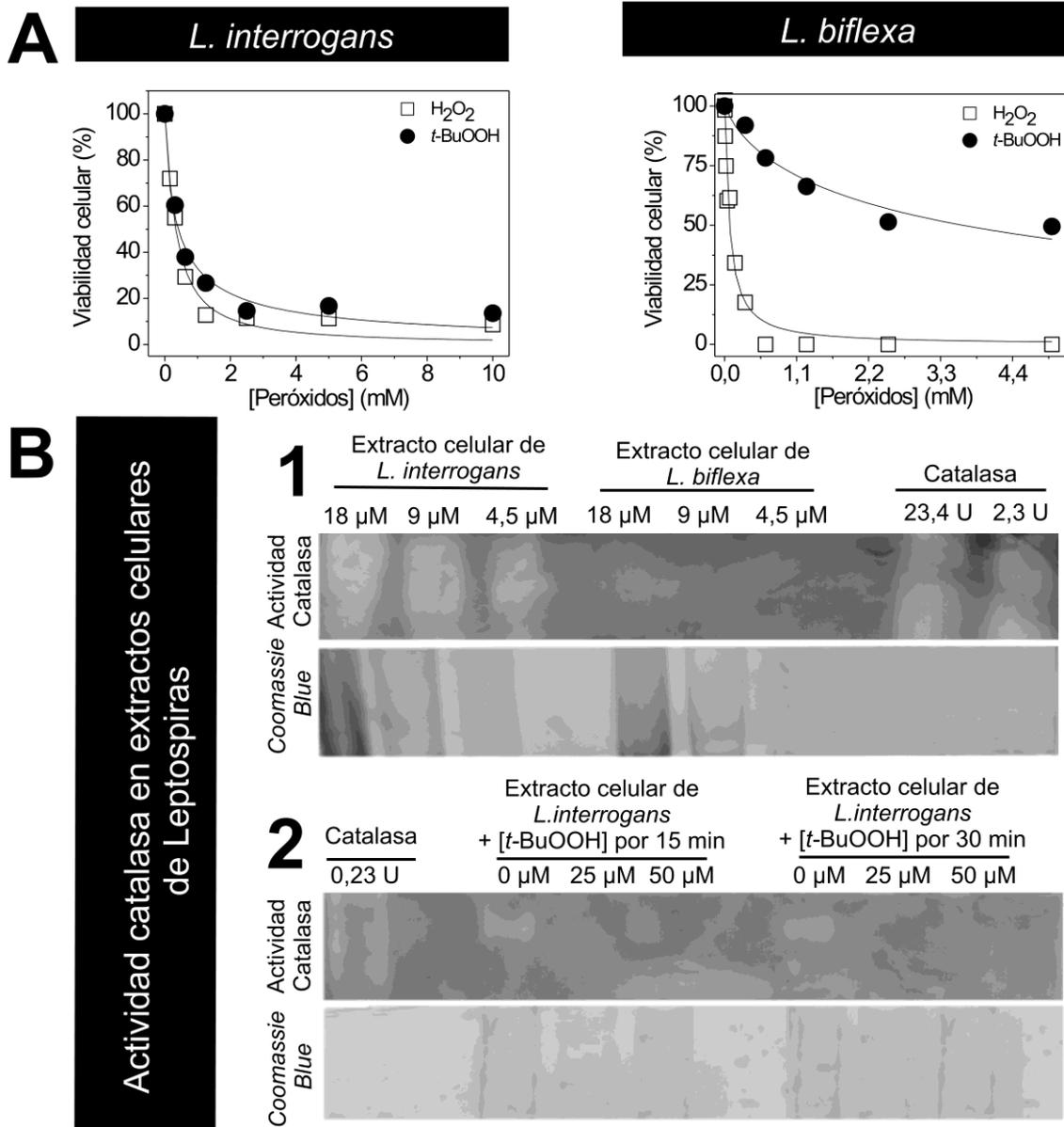


Figura 47 | A. Viabilidad celular frente a estrés oxidativo. Suspensiones bacterianas ($DO_{420nm} \sim 0,04$) fueron incubadas a 28 °C con diferentes cantidades de H₂O₂ o t-BuOOH (0-10 mM) y AlamarBlue®, el cual es un indicador de viabilidad celular. El 100 % se corresponde con el ensayo control, donde se usaron bacterias en ausencia de oxidantes. **B. Actividad catalasa en gel.** (1) Se dosó actividad catalasa en extractos celulares de *Leptospira* spp. conteniendo 5, 9, y 18 μg de proteínas, siguiendo el protocolo descrito por Weydert, C.J.(2010). (2) Se incubaron suspensiones de *L. interrogans* ($DO_{420nm} \sim 0,5$) a 28° C por 15 min o 30 min, en ausencia y presencia de t-BuOOH (25-50 μM). Luego, se prepararon los extractos celulares usando BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck Millipore) y finalmente se sembraron diferentes cantidades en un gel nativo al 8%. Se empleó catalasa de *Aspergillus niger* (Sigma) como estándar.

En segundo lugar, se ensayó la capacidad de ambas bacterias para detoxificar t-BuOOH o H₂O₂, midiendo el peróxido remanente a diferentes tiempos, empleando para ello el método de ferritocianato. Estas mediciones indican que la detoxificación de H₂O₂ para *L. interrogans* fue más rápida que para *L. biflexa* (datos no mostrados).

Esto último avala la importancia de la actividad catalasa para la especie patogénica, y la implicancia de esta enzima en su virulencia (Panek, H.R. y col. 2004; Eshghi, A. y col. 2012).

Además de los ensayos anteriores, se realizaron *western blots* empleando anticuerpos policlonales dirigidos contra las enzimas recombinantes, para así evaluar la abundancia relativa de *LinTrxR* y *LinAhpC* en los extractos celulares de *L. interrogans*. *LinTrxR* representó un $0,019 \pm 0,002\%$, mientras que *LinAhpC* un $0,122 \pm 0,006\%$ de la concentración total de proteínas. Las señales de reconocimiento se corresponden con proteínas de 35 kDa, 24 kDa y 45 kDa; lo cual es coincidente con la M_r de la *LinTrxR* y la *LinAhpC* (en su forma monomérica y de dímero covalente, respectivamente) (**Figura 48 y Figura 49**). El antisuero α -*LinTrxR* también fue utilizado para evaluar la presencia de *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2* en células de *L. biflexa*. Este anticuerpo sólo fue capaz de detectar *LbiTrxR1* recombinante, pero no *LbiTrxR2*. Sin embargo, se pudo comprobar la transcripción del gen de *LbiTrxR2* mediante RT-PCR. La transcripción fue verificada por electroforesis en gel de agarosa, como una banda de ~900 pb (**Figura 50**), lo que sugiere que la enzima se traduce constitutivamente en *L. biflexa*.

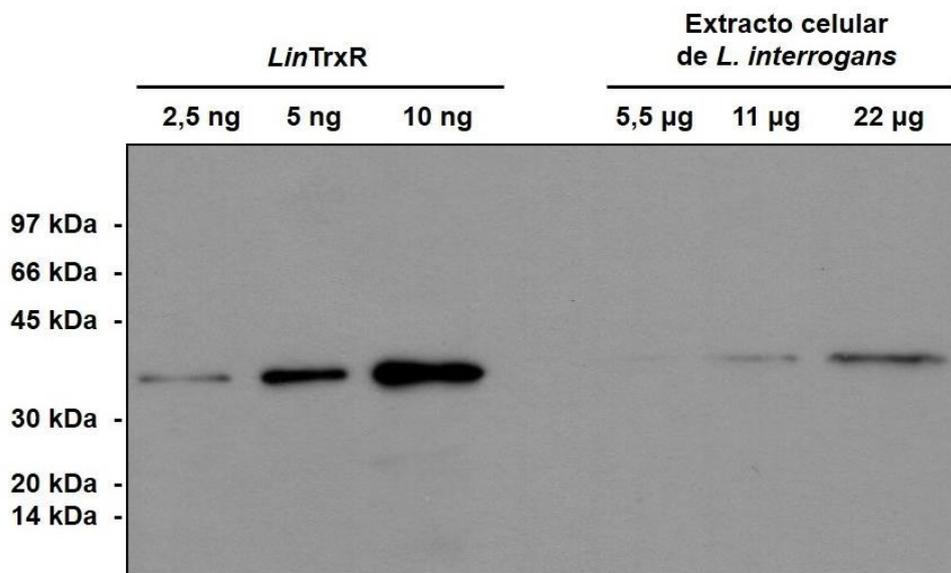


Figura 48 | Inmunodetección de TrxR en el extracto total de *L. interrogans*. Extractos que contienen 5,5; 11 y 22 µg de proteína fueron separados por SDS-PAGE al 15% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. El *western blot* se reveló con α -*LinTrxR*. Como control de la identidad de la banda detectada se utilizó 2,5; 5 y 10 ng de la *LinTrxR* recombinante.

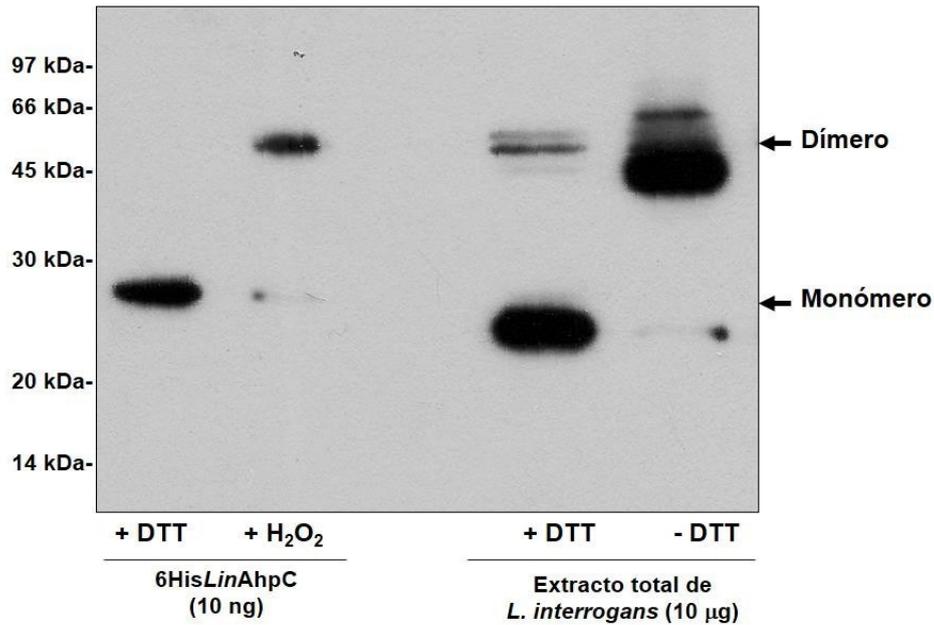


Figura 49| Inmunodetección de *LinAhpC* en el extracto total de *L. interrogans*. Aproximadamente 10 µg de un extracto proteico se separó en un SDS-PAGE al 15 % y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. El *western blot* se reveló con un anti-*LinAhpC*. Como control de la identidad de la banda detectada se utilizó 10 ng de la His- tag *LinAhpC* recombinante.

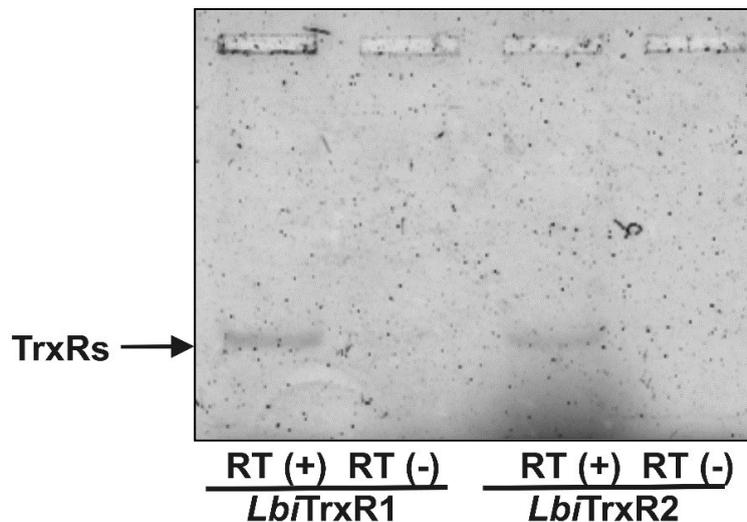


Figura 50| Evaluación de la expresión de los transcritos de *LbiTrxR1* y *LbiTrxR2* por RT-PCR. Cultivos de leptospiras en fase exponencial se cosecharon y su RNA fue aislado por extracción con fenol y precipitación con etanol. Para confirmar la ausencia de contaminación con DNA genómico, se realizó el tratamiento con RQ1 libre de RNasa DNasa (Promega) según el protocolo del fabricante. Luego, se evaluó la pureza del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cuantificó a partir de su absorbancia a 260 nm. 0,26 µg/µl de cada ARN codificante para las hipotéticas proteínas de *L. biflexa* fue utilizado como molde en la reacción de PCR, junto a los oligonucleótidos específicos. Los productos de PCR se analizaron por fluorescencia con el escáner *Typhoon* (GE Healthcare). RT (+) = reacción de retrotranscripción con retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen). RT (-) = reacción de retrotranscripción sin retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen).

Teniendo en cuenta la posible implicancia del sistema Trx-AhpC en la desintoxicación de peróxidos *in vivo*, se evaluó el efecto que causa la exposición de las células bacterianas frente a peróxidos, en la modulación del nivel de las proteínas en estudio, para lo cual se realizaron experimentos de *western blot*. Como se muestra en la **Figura 51**, no se registraron cambios en los niveles de TrxR en leptospiras estresadas; sin embargo, se observó un aumento en la intensidad de la señal de la AhpC en ambas especies bacterianas luego de su exposición a H₂O₂ y a *t*-BuOOH. Estos resultados sugieren que la AhpC (una peroxirredoxina que es capaz de reducir ambos peróxidos *in vitro*) contribuye significativamente a la defensa antioxidante *in vivo*. Esto último fortalecería, además, la importancia del sistema Trx, ya que hasta el momento es el único sistema antioxidante descrito con la capacidad de proveer equivalentes de reducción a la AhpC *in vivo*. Además, cabe destacar la disminución en el nivel de la catalasa cuando células de *L. interrogans* fueron expuestas a *t*-BuOOH (**Figura 51**), lo cual puede ser, probablemente, debido al efecto de inactivación que este peróxido causa sobre la enzima, tal como fue descrito previamente (apartado 4.1.3.1). Este resultado apoya la importancia de la AhpC (en asociación con el sistema Trx) en la desintoxicación de peróxidos orgánicos en la bacteria patógena. Por otro lado, se detectó un incremento del contenido de la catalasa en presencia de H₂O₂ (de igual modo que la AhpC) (**Figura 51**), lo cual podría indicar una acción conjunta de ambas proteínas en la eliminación de este peróxido, lo que explicaría además la mayor tolerancia de esta especie bacteriana patógena, respecto a la no patógena.

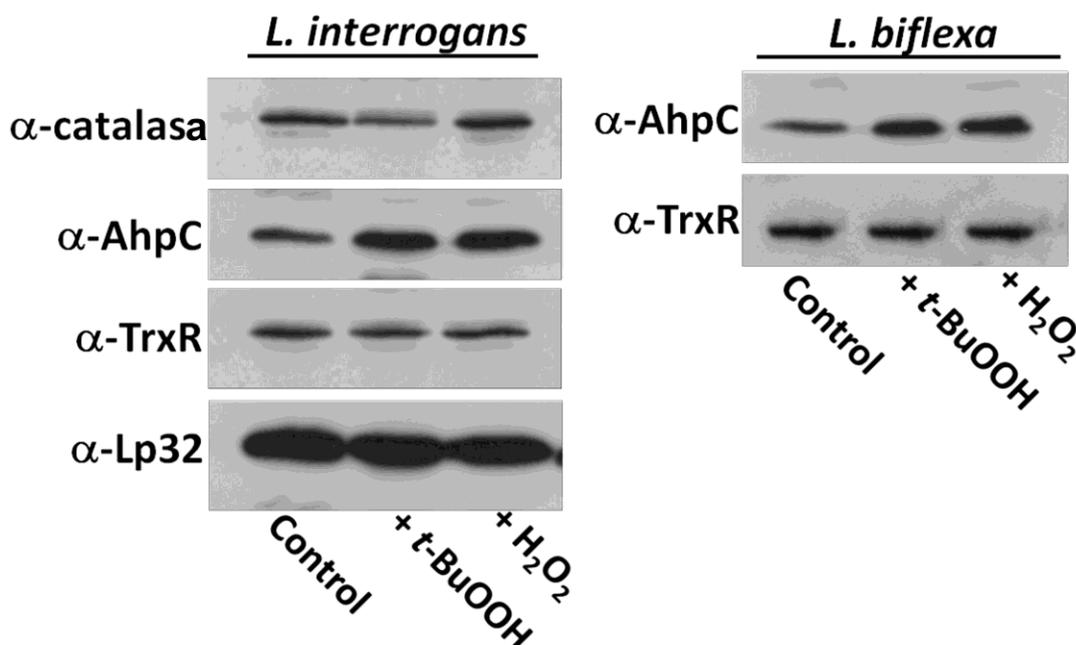


Figura 51 | Inmunodetección de proteínas implicadas en la eliminación de EROs en extractos celulares de *L. interrogans*. Se incubaron suspensiones bacterianas ($DO_{420\text{ nm}} \sim 0,135$) realizadas en PBS, a 28 °C por 4 h, en presencia de *t*-BuOOH 1 mM y H₂O₂ 1 mM, o en su ausencia (ensayo control). Las muestras se lisaron por calentamiento en presencia de *buffer* de muestra para SDS-PAGE reductor 1X y se sembraron en un gel al 15 %. Luego, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con diferentes anticuerpos primarios α-*Lincatalasa* (1/1000), α-*LinAhpC* (1/1000), α-*LinTrxR* (1/1000) y α-*LinLp32* (1/5000). Como anticuerpo secundario se empleó una dilución 1/10000 de un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP comercial (Thermo Scientific). Finalmente, las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia y su identidad se determinó por comparación con un marcador de masa molecular.

Las bacterias contienen tanto sistemas enzimáticos para detoxificar peróxidos, endógenos y exógenos, así como también disponen de sistemas dependientes de tioles de baja masa molecular que poseen una función esencial en la eliminación de EROs y ERNs, siendo ambos sistemas necesarios para mantener el equilibrio redox celular. En relación a la importancia que estas moléculas representan para la célula se estimó el contenido de tioles totales, en la especie patógena y no patógena de leptospiras, bajo condiciones de estrés oxidativo. Para ello, las suspensiones celulares se incubaron en presencia o ausencia de H₂O₂ 5 mM, y luego se midió la cantidad de tioles totales utilizando el DTNB. *L. interrogans* exhibió gran cantidad de tioles, tanto en forma basal (sin H₂O₂, 5 ± 1 pmol. 10^7 bacterias⁻¹), como en condiciones estrés ($2,8 \pm 0,8$ pmol. 10^7 bacterias⁻¹), en comparación con *L. biflexa* ($0,4 \pm 0,1$ pmol. 10^7 bacterias⁻¹ y $0,010 \pm 0,008$ pmol. 10^7 bacterias⁻¹, sin y con H₂O₂, respectivamente). Estos resultados señalan que *L. interrogans* posee sistemas antioxidantes más potentes que *L. biflexa* para hacer frente al estrés oxidativo, lo que

podría advertir un papel importante de estos metabolitos en la patogénesis de *L. interrogans*.

4.2.5.2. Sobreoxidación de *LinAhpC* *in vivo*

Conforme a lo obtenido en los ensayos de *western blot*, la *LinAhpC* es una proteína abundante en el citoplasma de la bacteria, y por lo tanto constituiría una herramienta crítica para la adecuada detoxificación de H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos. De acuerdo a lo informado previamente, la *LinAhpC* se inactiva *in vitro* en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 o *t*-BuOOH (Arias, D.G. y col. 2014). La inactivación por sobreoxidación fue consecuencia de eventos oxidativos sobre el intermediario ácido sulfénico (C_P -SOH), con la consiguiente producción de ácido sulfínico (C_P -SO₂H) y sulfónico (C_P -SO₃H). La Cys peroxidática de la *LinAhpC*, como C_P -SO₂H, es relativamente estable y resistente a la reducción a expensas de la Trx. Como consecuencia de esto, la enzima no puede actuar sobre sus sustratos, perdiendo por lo tanto, su capacidad para detoxificar peróxidos. Su capacidad de sobreoxidarse se lo relacionó con la presencia en su secuencia primaria de dos motivos (GGIG e YF) que son característicos de las 2-CysPrx sensibles a sobreoxidarse (Barranco-Medina, S. y col. 2009; Pascual, M.B. y col. 2010). Debido al comportamiento que mostró la *LinAhpC* *in vitro*, decidimos evaluar la posible ocurrencia de dicho proceso *in vivo*. Para evaluar la sobreoxidación de esta proteína *in vivo*, se expusieron células de *L. interrogans* (en fase exponencial de crecimiento) a concentraciones variables de H_2O_2 por 1 y 3 h. La **Figura 52** muestra que en ausencia de H_2O_2 la *LinAhpC* se encuentra como dímero (disulfuro activo), sin embargo la cantidad de proteína como dímero disminuye con la concentración de peróxido, con un concomitante incremento de la misma en su forma monomérica. Esta observación es consistente con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*. Por otro lado, la acumulación tiempo dependiente de la forma dimérica sugiere que la expresión del gen codificante para *LinAhpC* se induciría cuando las células de *L. interrogans* se exponen a peróxidos exógenos como el H_2O_2 . Esto último fue apoyado mediante la cuantificación de la banda correspondiente a la *LinAhpC* en un SDS-PAGE en condiciones reductoras, valor que indica un incremento de $1,6 \pm 0,1$ veces después del tratamiento con oxidantes (**Figura 51**). Aunque la *LinAhpC* presenta sensibilidad redox a la oligomerización esta exhibe una transición estructural desde pentadímero a dímero, con cambios pasando desde el estado reducido (tiol), al estado oxidado (disulfuro). La enzima sobreoxidada (inactiva) fue

una mezcla entre dímero y monómero, la cual fue estimulada por la alta concentración de peróxidos y sustratos reductores. Estos resultados muestran que la *LinAhpC*, sumados a otros antecedentes previamente descritos por nuestro grupo (Arias, D.G. y col. 2014), muestran que la *LinAhpC* carecería de actividad chaperona *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo, debido a su incapacidad para formar oligómeros nativos de alta masa molecular (**Figura 52**). Esto último la diferencia de la 2-CysPrx de otras bacterias patógenas tales como *H. pylori*, la cual presenta actividad chaperona en su forma sobreoxidada, contribuyendo a la estabilización de otras proteínas bajo condiciones de estrés oxidativo (Barranco-Medina, S. y col. 2009; Pascual, M.B. y col. 2010; Rhee, S.G. y col. 2011). Todo lo mencionado hasta aquí señala que la *LinAhpC* sería importante en la detoxificación de peróxidos. Por otro lado, su forma sobreoxidada podría ser una señal indicadora de estrés oxidativo que actuaría como segundo mensajero, el cual regularía diversas vías de señalización. Este tipo de mecanismo ha sido observado en diferentes enzimas, como por ejemplo la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la cual luego de ser sobreoxidada adquiere funciones en la señalización celular (Holtgreffe, S. y col. 2008).

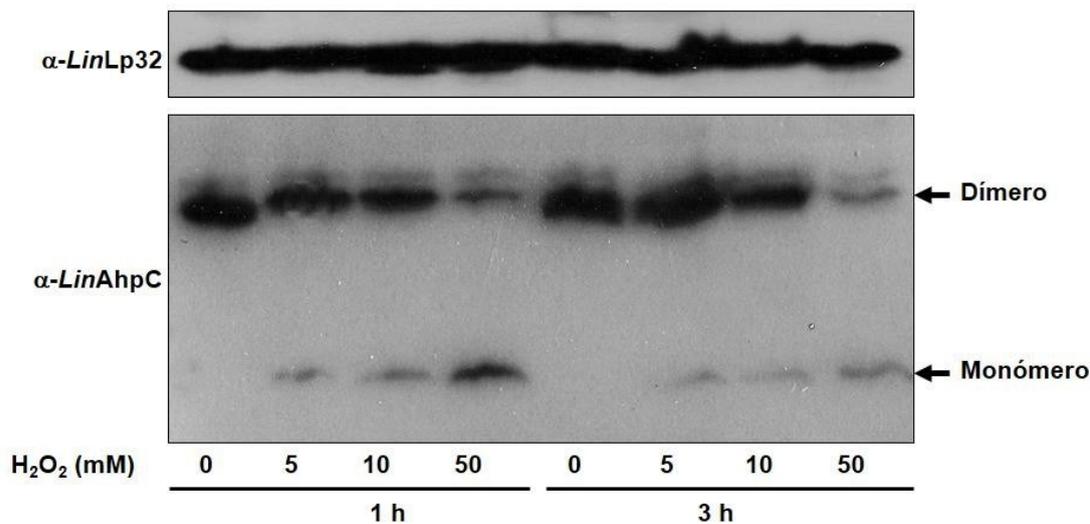


Figura 52 | Detección del estado redox de *LinAhpC* *in vivo*. Se incubaron células de *L. interrogans* en PBS con diferentes concentraciones de H_2O_2 por 1 y 3 h a 28 °C. Las células fueron lisadas con *buffer* no reductor de SDS-PAGE (en presencia de iodoacetamida 10 mM) y el estado redox de *LinAhpC* se analizó mediante *western blot* utilizando α -*LinAhpC*. Lip32 fue utilizado como control de carga

4.2.5.3. Efecto inhibitorio de diferentes compuestos en crecimiento celular de *L. interrogans*

Las drogas que se emplearon para realizar los ensayos de inhibición de la actividad DTNB reductasa de la *LinTrxR in vitro*, se ensayaron como inhibidores del crecimiento en cultivos de *L. interrogans*. Respecto a esto, se observó que el azul de metileno y el mercurocromo inhiben el crecimiento bacteriano ($IC_{50} = 7 \pm 1 \mu M$ y $IC_{50} = 6 \pm 2 \mu M$, respectivamente) (**Figura 53**). El efecto de estos compuestos en el crecimiento junto a lo descrito en los ensayos *in vitro* en el apartado 4.2.3.2., señalan que la *LinTrxR* podría considerarse como un potencial blanco molecular para el diseño de fármacos. Por lo contrario, la quercetina estimuló el crecimiento de *L. interrogans*. Este comportamiento fue observado anteriormente en otros patógenos como *Clostridium perfringens* o *Bacteroides fragilis* (Zhang, Z. y col. 2014) y se cree que podría deberse a la actividad antioxidante de este polifenol (o sus derivados metabólicos) sobre los cultivos. Por otro lado, la piocianina no afectó el crecimiento bacteriano. La ampicilina, fármaco de referencia para el tratamiento de la leptospirosis (Oie, S. y col. 1983; Hospenthal, D.R. y col. 2003) presentó un valor de IC_{50} calculado de $33 \pm 6 \mu M$, y fue empleado como experimento control (**Figura 53**).

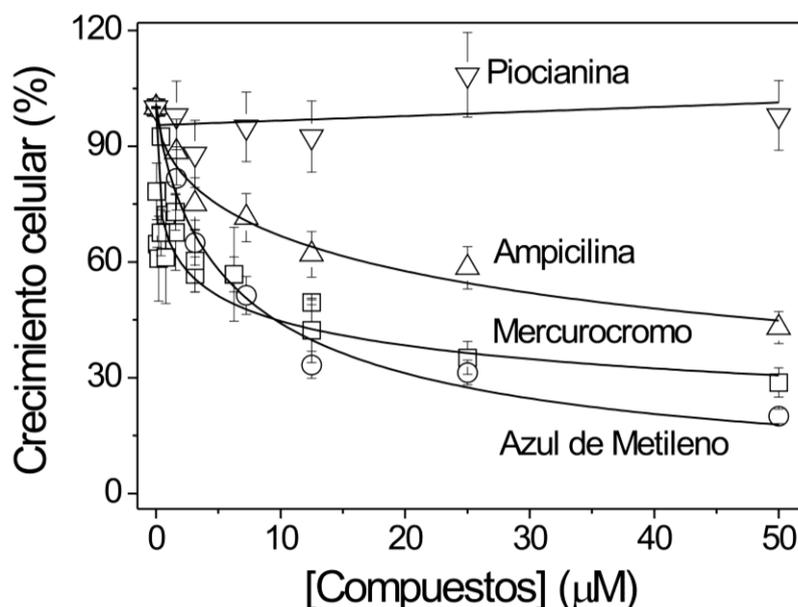


Figura 53 | Inhibición del crecimiento celular de *L. interrogans* por diferentes compuestos. Las bacterias con una densidad celular normalizada a $DO_{405\text{ nm}} \sim 0.1$ (en 1 ml) fueron expuestas con concentraciones de 1,6 a 50 μM de ampicilina, piocianina, azul de metileno, mercurocromo o quercetina, respectivamente, durante 5 días a 28 ° C. Después de este tiempo se midieron las densidades celulares y calcularon los IC_{50} para cada compuesto. El azul de metileno ($IC_{50} = 7 \pm 1 \mu\text{M}$), el mercurocromo ($IC_{50} = 6 \pm 2 \mu\text{M}$) y la ampicilina ($IC_{50} = 33 \pm 6 \mu\text{M}$) causaron efecto inhibitorio sobre el cultivo celular, mientras que piocianina no tuvo efecto.

4.2.6. Identificación de interactores de *LinTrx*

Con el fin de identificar posibles sustratos de la *LinTrx* se procedió a realizar, mediante un enfoque *in vitro*, un estudio siguiendo lineamientos proteómicos utilizando geles bidimensionales y espectrometría de masas. Este enfoque propuso la utilización de una técnica similar al *biotin-switch*, en donde se empleó al sistema Trx de *L. interrogans* (en el paso reductor) para la generaciones de tioles nacientes en las proteínas blanco con el concomitante aislamiento y la identificación de las mismas. En una primera aproximación, las proteínas aisladas se separaron mediante un SDS-PAGE reductor el cual se tiñó con plata, registrándose un gran número y abundancia en las proteínas capturadas en el ensayo frente al control negativo (en ausencia de NADPH). En paralelo y a modo de validar el enfoque, se realizó un *western blot* con parte de las muestras obtenidas, observándose la identificación de la *LinAhpC* como parte de las proteínas sustrato de la *LinTrx* aisladas (**Figura 54A**). Este resultado indicó que el enfoque era válido para continuar con la identificación de posibles blancos del sistema Trx, dado que la *LinAhpC* es un sustrato de la *LinTrx*, tal como lo mostraron los

ensayos *in vitro* realizados en este capítulo. Este resultado distintivo motivó la realización de una electroforesis bidimensional (**Figura 54**). Los *spots* seleccionados fueron aquellos que resultaron ausentes en el ensayo control (sin la adición de NADPH). Posteriormente, se identificaron por espectrometría de masas utilizando el *software* Mascot. Al momento de escribir esta Tesis de la totalidad de los *spots* enviados para su análisis al Instituto Pasteur de Montevideo tres proteínas sólo han sido identificadas, las cuales se detallan en la **Tabla 9**. Como era de esperar, la *LinAhpC* se detectó entre las proteínas interactores con *LinTrx*. Además de ésta, se identificaron dos proteínas involucrados en el proceso de traducción, los factores de elongación Tu y Ts. Existen antecedentes en la literatura de que este paso de la traducción es particularmente sensible a la oxidación por EROs y ERNs (Kumar, J.K. y col. 2004; Yutthanasirikul, R. y col. 2016). De este modo, los factores involucrados en esta etapa se inhiben, con la consecuente formación de puentes disulfuro y ácido sulfénico en sus residuos de Cys, los cuales pueden ser reducidos y reactivados por la Trx. Las Cys presentes en los factores de elongación son conservadas entre diferentes especies bacterianas (Yutthanasirikul, R. y col. 2016). Esta función del sistema Trx ha sido detectado en numerosos organismos, entre ellos: *E.coli*, *Synechoscystis spp*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc. (Kumar, J.K. y col. 2004; Jun, K.O. y col. 2009; Yutthanasirikul, R. y col. 2016). Es interesante indicar que el factor de elongación Tu ha sido considerado un factor de virulencia importante en microorganismos patógenos humanos (incluyendo a *L. interrogans*). Esta proteína es abundante y se expone en la superficie de los patógenos (*Mycoplasma pneumoniae*, *Lactobacillus johnsonii*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) favoreciendo la invasión tisular y la evasión del sistema inmune del huésped (Wolff, D.G. y col. 2013). El factor EF-Tu favorece la conversión de plasminógeno a plasmina, incrementando la fibrinólisis (Sakolvaree, Y. y col. 2007; Wolff, D.G. y col. 2013), así como media la inactivación de la C3 convertasa (de la vía alternativa del complemento). En conclusión, este factor contribuye a la diseminación bacteriana y a la evasión de la respuesta inmune del huésped, facilitando el proceso infeccioso (Sakolvaree, Y. y col. 2007; Wolff, D.G. y col. 2013). Finalmente, las tres proteínas detectadas en este ensayo son proteínas inmunogénicas para *L. interrogans* (Sakolvaree, Y. y col. 2007).

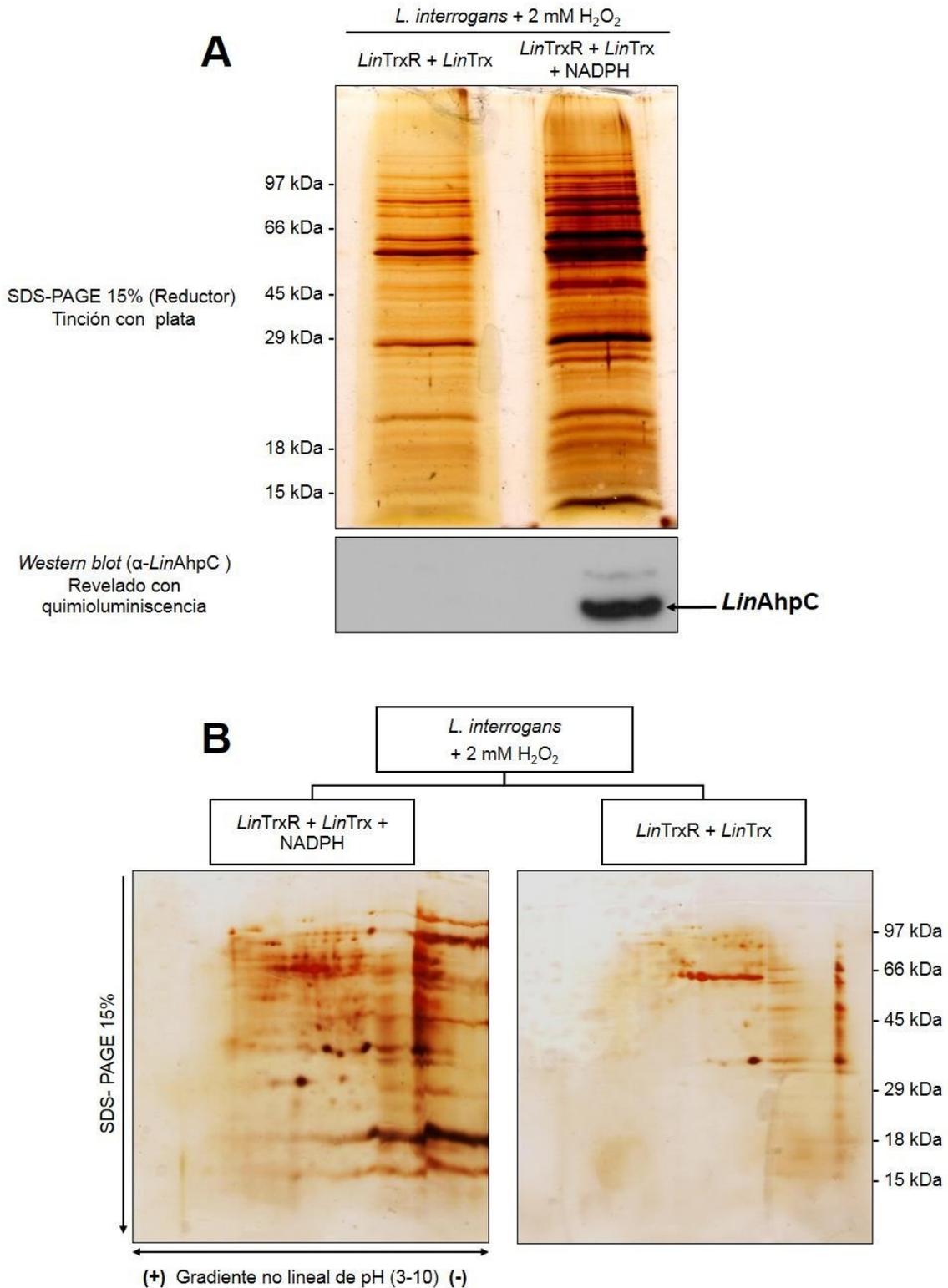


Figura 54 | A. Perfil del SDS-PAGE reductor de las proteínas capturadas por la cromatografía covalente realizada con la resina *Thiol activated-Sepharose 4B*. Previo a la separación cromatográfica los extractos celulares se incubaron en presencia del sistema tiorredoxina completo (*LinTrx* 0,5 μ M, *LinTrxR* 1 μ M y NADPH 500 μ M) o incompleto (en ausencia de NADPH; control negativo). Las proteínas fueron eluidas con DTT 100 mM, luego se sembraron en un SDS-PAGE reductor, el cual fue teñido con nitrato de plata. El panel de abajo corresponde

al *western blot* realizado para confirmar la eficiencia del ensayo. La membrana se reveló con el anticuerpo α -LinAhpC, la cual es proteína sustrato de la LinTrx. **B. Interactoma de LinTrx con un homogenato de células de *L.interrogans* en fase exponencial.** El interactoma se reveló por electroforesis bidimensional. Las muestras proteicas obtenidas (luego de la cromatografía descrita en A) fueron isoelectroenfocadas en un rango no lineal de pH de 3-10. Posteriormente, se separaron en un SDS-PAGE reductor que se coloreó con nitrato de plata. Se cortaron 15 *spots* del gel teñido para ser sometidas a la digestión trípica para su análisis por MALDI-TOF. De esta forma se generaron mapas con masas de péptidos y se buscaron los ortólogos a las proteínas de interés. Las proteínas identificadas se listan en la **Tabla 9**.

Tabla 9 | Potenciales proteínas blancos de LinTrx identificados utilizando datos de MS y MS/MS.

N° de <i>spot</i>	Proteína identificada por EM	Protein ID	N° Cys	Protein score	MM teórica (kDa.)
2	<i>hypothetical protein (peroxiredoxin)</i>	gi 523631651	2	128	21,4
3	<i>translation elongation factor Ts</i>	gi 523634405	3	122	22
4	<i>translation elongation factor Ts</i>	gi 495867628	3	61	22
9	<i>translation elongation factor Tu</i>	gi 495870417	2	151	43,8

4.2.7. Discusión

L. interrogans tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en los tejidos, escapando de los mecanismos naturales de defensa del huésped, tales como el sistema del complemento y las células fagocíticas, similares a otros patógenos microbianos (Green, S.S. y col. 1967; Murgia, R. y col. 2002; Ren, S.X. y col. 2003; Cinco, M. 2010). En este capítulo se realizó una caracterización comparativa funcional del sistema Trx de especies patógenas y saprófitas. Los resultados obtenidos tienen como objetivo contribuir a la correcta asignación de las relaciones estructura y función de estas enzimas, asignándole valor a los datos disponibles en el proyecto del genoma. Los resultados, además apoyan la ocurrencia de diferencias funcionales entre el metabolismo antioxidante de leptospiros patógenas y de vida libre.

Las propiedades estructurales y funcionales de las TrxRs indican que las enzimas pertenecen a la familia de las L-TrxRs, las cuales presentan estructuras homodiméricas. Cada monómero tiene un sitio de unión al NADPH (incompleto en *LbiTrxR2*), un sitio

de unión al FAD y un sitio redox activo compuesto por dos residuos de Cys. Las enzimas recombinantes, *LinTrxR* y *LbiTrxR1*, fueron capaces de catalizar la reducción de *LinTrx* de una manera dependiente de NADPH. *In vivo*, el NADPH (importante como dador de equivalentes de reducción) puede obtenerse del ciclo del ácido tricarbóxico y de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Green, S.S. y col. 1967; Amineni, U. y col. 2010; Arias, D.G. y col. 2014; Lu, J. y col. 2014). Ambas enzimas, *LinTrxR* y *LbiTrxR1*, utilizaron otros sustratos no fisiológicos como MBQ y ferricianuro de potasio aunque exhibieron menor eficiencia catalítica. Estas TrxRs, mostraron ser sensibles a la inhibición por metales pesados, lo cual apoya la idea de que los tioles reactivos participan en la actividad de reducción de sustratos disulfuros. Además, *LinTrxR* y *LinTrx* fueron capaces de trabajar junto a *LinAhpC*, catalizando la reducción de peróxidos de manera dependiente del NADPH. La *LinAhpC* exhibe propiedades cinéticas similares empleando tanto un sistema Trx homólogo como heterólogo (compuesto por una Trx y una TrxR de *E.coli*) (Arias, D.G. y col. 2014). Estos resultados indican que este sistema funcionaría *in vivo* para eliminar el H₂O₂ e hidroperóxidos orgánicos con similar eficiencia. Sin embargo, la *LinAhpC* se inactiva después de la oxidación excesiva por la elevada concentración de peróxidos. Además, el *t*-BuOOH puede inhibir la actividad de la *Lincatalasa*, lo que señala la importancia de otras proteínas con actividad peroxidasa para eliminar los peróxidos orgánicos y mantener el equilibrio redox.

En el caso de *L. biflexa*, sólo se evidenció funcionalidad de *LbiTrxR2* en los ensayos de inhibición en disco, donde las células de *E. coli* sobre-expresantes de *LbiTrxR2* mostraron elevada tolerancia al estrés oxidativo generado por varios compuestos oxidantes. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de *LbiTrxR2* sugieren que la falta de actividad *in vitro* podría ser debido al reemplazo del motivo canónico rico en Arg por aminoácidos neutrales y no polares. Este motivo se conserva entre las L-TrxRs y está involucrado en la unión del NADPH (Krnajski, Z. y col. 2001; Bao, R. y col. 2009). Sin embargo, la actividad antioxidante de *LbiTrxR2* frente a peróxidos (observado en ensayos *in vivo*) fue mayor que la actividad antioxidante de *LbiTrxR1*, indicando que esta proteína sería importante para la supervivencia bacteriana.

Por otro lado, la *LinTrxR* fue incapaz de reducir disulfuros de baja masa molecular (cistina, GSSG, lipoamida y bis- γ -GC), mientras que la *LinTrx* fue capaz de hacerlo con una eficiencia de catálisis similar a Trx de otros organismos. El análisis de

estos resultados, junto con el hecho de que *L. interrogans* tiene un alto contenido de tioles (que además es levemente afectado por la presencia de oxidantes), genera dos interrogantes: i) ¿cuál es el tiol de baja masa molecular más abundante en *L. interrogans*?, ii) ¿cuál es la importancia de ese tiol para el metabolismo de la bacteria? Para obtener respuestas a estos interrogantes, en primer lugar se analizaron los resultados obtenidos en el capítulo I. En éste se había determinado actividad GCL y GS en los extractos celulares de *Leptospira* spp. siendo mayor la actividad GCL para la especie patógena y mayor la actividad GS para la especie saprófita. En ambas especies se han identificado secuencias codificantes para proteínas con esas funciones putativas. En contraparte, a pesar de que no se han identificado secuencias codificantes para GR en la información disponible en el proyecto genoma de ambas bacterias, la actividad GR fue mayor en los extractos celulares de la especie patógena. La ausencia de esta entidad enzimática convierte el sistema Trx en un sistema muy importante para mantener el balance GSH/GSSG celular. Un efecto similar ha sido identificado para la TrxR de *Drosophila melanogaster*, organismo que acumula GSH y carece de GR (Kanzok, S.M. y col. 2001). Por otro lado se puede inferir que ambas especies bacterianas presentarían tanto γ -GC como GSH. Sin embargo, las diferencias encontradas en cuanto a la actividad de las enzimas que catalizan ambos pasos en la síntesis de GSH se explicarían como sigue. Por un lado, la menor capacidad de síntesis de GSH por la especie patógena podría relacionarse con la capacidad de la bacteria para importar GSH del huésped, de igual modo a lo informado previamente en *Haemophilus influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* (Potter, A.J. y col. 2012; Vergauwen, B. y col. 2013). De esta manera, por su habilidad tanto para sintetizarlo como para importarlo del medio, *L. interrogans* mantiene los niveles celulares de GSH, el cual podría operar como cofactor redox de las supuestas glutatión peroxidasas (LIC12648, LIC13442), GST (LIC1298, LIC11363 y LIC10807) y glutarredoxinas (LIC11810, LA_2109). Por otro lado, la mayor actividad GS de la especie saprófita en relación a su actividad GCL sería debido a que a medida que se genera γ -GC se convierte en GSH, siendo esta, posiblemente, la única vía que dispone la bacteria para sintetizar este tiol. En adición a lo antes mencionado, el sistema Trx de *L. interrogans* podría, además, catalizar la reducción de la cistina *in vivo* (tal como lo hizo en los ensayos *in vitro*), lo cual sería relevante para conservar la concentración intracelular de Cys.

Como se mencionó antes, estas especies bacterianas están expuestas a ERNs (Loi, V.V. y col. 2015), las cuales pueden causar modificaciones post-traduccionales a

nivel de tioles (*S*-nitrosilación) en proteínas. Por otro lado, la descomposición de un RSNO puede generar nitrito, nitrato y NO (aunque este último en menor proporción) (Laver, J.R. y col. 2013). El estrés generado por los RSNO a nivel celular causa además una sobre regulación de los mecanismos que ejercen un efecto protector directo contra el NO, tales como la acción de la favohemoglobina y flavorubredoxina, en organismos aeróbicos y anaeróbicos (o microaerofílicos), respectivamente (Poole, R.K. 2005; Laver, J.R. y col. 2013). Además de estos, entre los sistemas bacterianos implicados en la detoxificación de RSNO se incluyen la GSNO reductasa, la nitroreductasa, así como también ha sido incluido en esta función al sistema Trx (Poole, R.K. 2005; Laver, J.R. y col. 2013). Se ha descrito que el sistema Trx cumple funciones similares a la GSNO reductasa, presentando una importante actividad denitrosilasa (Laver, J.R. y col. 2013). En relación a estos antecedentes, la capacidad de la *LinTrx* para reducir nitrosotioles de baja masa molecular podría indicar que el sistema Trx de *L. interrogans* está involucrado en la denitrosilación de proteínas, lo cual sería importante para prevenir el estrés nitrosativo. Además, y de acuerdo a lo antes mencionado, si la γ -GC junto al GSH son los principales tioles de baja masa molecular en estas bacterias, se puede proponer que estos tioles podrían quitar grupos NO de proteínas nitrosiladas (proteína-SNO) por medio de reacciones de transnitrosilación para producir γ -GCSNO o GSNO que luego serían reducidos por el sistema Trx. La ausencia de secuencias codificantes para una GSNO reductasa y nitroreductasa en el genoma de estas bacterias, sustenta la importancia del sistema Trx para la detoxificación de ERNs.

La Trx también media reacciones de transglutathionilación aunque con menos eficiencia que las Grxs) (Filipovska, A. y col. 2006). La glutathionilación de proteínas (al igual que la nitrosilación) se incrementa en condiciones de estrés oxidativo (Filipovska, A. y col. 2006). Los ensayos *in vitro* mostraron que la *LinTrx* fue capaz de glutathionilarse a expensas de GSSG, así como de nitrosilarse a través de GSNO. Este hecho sustenta la posibilidad de que la misma podría tener funciones de transglutathionilar (o transnitrosilar) a proteínas, pudiendo regular la función de las mismas. Si bien esto es una especulación, queda propuesta como trabajo futuro a investigar

Finalmente, la elevada abundancia relativa de la *LinTrxR* detectada por ensayos de *western blot*, manifiesta una posible relevancia funcional de *LinTrxR* a nivel celular. Esto último, junto al potente efecto inhibitorio que mostró el agente antimalárico, el azul de metileno (Buchholz, K. y col. 2008), sobre el sistema Trx (indicado por su bajo

IC₅₀ de ~0.8 μM) en los ensayos *in vitro* y a su toxicidad en los cultivos bacterianos (IC₅₀ ~7 μM), podría considerarse como un punto de partida para el desarrollo de nuevas drogas anti-leptospirosis. Sumado a esto, su par redox, la *LinTrx*, fue capaz de interactuar en situación de estrés, tanto con la *LinAhpC* como con factores involucrados en la elongación de la traducción (**Figura 54 y Tabla 9**). Todas estas proteínas se definieron como inmunógenos, por lo tanto son capaces de desencadenar la respuesta inmune en el huésped y, en consecuencia, se las ha involucrado con los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *L. interrogans* (Sakolvaree, Y. y col. 2007; Wolff, D.G. y col. 2013). En su conjunto, los resultados permiten plantear que en situación de estrés oxidativo la función de la *LinTrx* sería esencial para la supervivencia bacteriana, ya que reduce las forma disulfuro de proteínas que le permiten a la bacteria evadir la respuesta inmune del huésped y difundir hacia todos los tejidos para el establecimiento de la infección. Por consiguiente, ambas proteínas componentes del sistema Trx podrían investigarse como blancos moleculares para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

CAPÍTULO 3: Caracterización funcional de una glutamato cisteína ligasa de *L. interrogans*

4.3.1. Identificación, clonado y expresión del gen codificante para la glutamato cisteína ligasa de *L. interrogans*

En la base de datos del proyecto genoma de *L. interrogans* se identificó, una secuencia codificante para una glutamato cisteína ligasa (GCL). Esta enzima se encuentra codificada por un gen de 1563 pb (*gshA*, LIC11812) y la proteína putativa presenta una masa molecular teórica estimada de 61 kDa similar a otras GCL monofuncionales de otros organismos (Abbott, J.J. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2002; Kelly, B.S. y col. 2002). El gen especificado fue amplificado por PCR empleando el DNA genómico de la bacteria. Luego, se clonaron en pGEM®-T-*Easy* y sus identidades se confirmaron por secuenciación del ADN. Una vez comprobada su secuencia, el gen se subclonó en el vector pMAL-C-TEV y se expresó en células de *E. coli* BL21 (DE3). La proteína expresada de este modo se obtuvo como proteína de fusión a un *cassette* hacia el extremo N-terminal. Este *cassette* estaba compuesto por una cola de poli-His fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP, del inglés *Maltose-Binding Protein*) y hacia el C-terminal el sitio canónico de reconocimiento de la TEV proteasa. De este modo la fusión adiciona ~70 kDa. En las condiciones de expresión ensayadas (descritas en el punto 3.6.1 de Materiales y Métodos) la proteína se obtuvo mayoritariamente en la fracción soluble. La purificación de las proteínas en forma nativa fue realizada mediante tres pasos sucesivos. En primer lugar, se realizó una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) utilizando una resina Hi-Trap-Ni²⁺. En segundo lugar, a la proteína aislada en el paso anterior se le efectuó una digestión proteolítica utilizando TEV proteasa con el objeto de separar la MBP de la proteína de interés. Finalmente, luego del tratamiento proteolítico se realizó una cromatografía de afinidad empleando una matriz amilosa-agarosa (*New England Biolabs*). De este paso cromatográfico se recuperó la exclusión (donde se encontraba la proteína de interés separada físicamente de la MBP). A esta fracción, que presentó a la GCL, se la concentró por ultrafiltración, se cuantificó y se analizó en un SDS-PAGE reductor teñido con *Coomassie blue* (**Figura 55**). La proteína purificada se almacenó a -80 °C sin pérdida de actividad por un período no menor a ocho meses.

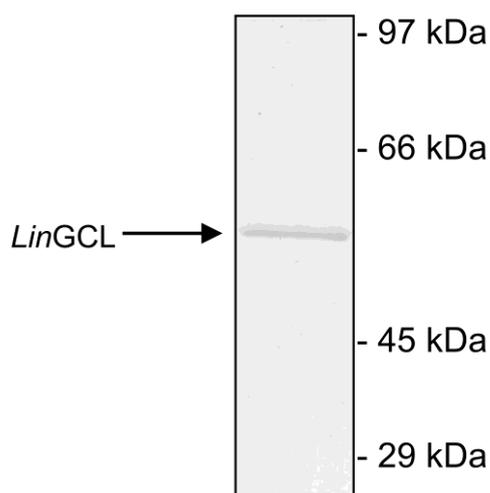


Figura 55| SDS-PAGE al 12% de la proteína recombinante purificada. La única banda se corresponde a la *LinGCL* (2 μ g) obtenida después de tres pasos de purificación.

A la proteína obtenida en forma recombinante se le realizó una cromatografía de filtración por gel para determinar su estructura nativa. El perfil del elusión se correspondió con el de un monómero de 61 kDa (no se muestra).

4.3.2. Determinación de la funcionalidad de la *LinGCL*

4.3.2.1. Evaluación de la actividad enzimática y promiscuidad por sustratos de la *LinGCL*

Como se mencionó en la introducción, el GSH es sintetizado enzimáticamente en dos pasos sucesivos dependientes de ATP, de los cuales el primer paso es catalizado por la GCL. Esta enzima establece la unión peptídica entre la Cys y el glutamato (Glu), formando γ -glutamilcisteína (γ -GC). En vista de esto y a modo de comenzar con la caracterización funcional de la *LinGCL* recombinante, en primer lugar se determinó su actividad enzimática en presencia de los sustratos canónicos: Glu, Cys y ATP-Mg²⁺ (**Figura 56A**). Paralelamente, se realizó una curva de pH de modo tal de establecer las condiciones óptimas de reacción (**Figura 56B**). Tanto el pH óptimo (pH 8,0) como la actividad enzimática específica obtenida (1,3 U.mg⁻¹) estimados para la *LinGCL* recombinante fueron similares a los informados para otras GCL de otros organismos (Hell, R. y col. 1990; Tu, Z. y col. 1998; Tu, Z. y col. 1998a; Abbott, J.J. y col. 2002; Gromes, R. y col. 2008).

En la bibliografía existen diversos antecedentes acerca de la capacidad que esta enzima tiene de emplear sustratos alternativos (Hang, C.S. y col. 1987; Hibi, T. y col. 2002; Kelly, B.S. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2004). En vista de estos antecedentes, se

analizó la actividad de la *LinGCL* en presencia de diferentes sustratos alternativos. Estos fueron: ácido aspártico (como análogo de Glu), Ser y cistina (como análogos de Cys), GTP (en lugar de ATP) y Mn^{2+} (en reemplazo de Mg^{2+}). Los diferentes compuestos fueron usados en iguales concentraciones que los sustratos canónicos, es decir 1 mM para los diferentes aminoácidos y nucleótidos fosfato, y 10 mM para los cationes divalentes. Las actividades medidas con los sustratos alternativos se infirieron como relativas al valor de actividad enzimática obtenida en presencia de los sustratos canónicos (Glu, Cys, ATP y Mg^{2+}). Las mediciones se desarrollaron a pH 8,0, a 37 °C y empleando la técnica del verde de malaquita (Fusari, C. y col. 2006). El reemplazo del nucleótido (ATP- Mg^{2+} por GTP- Mg^{2+}) generó valores similares de actividad enzimática. En consecuencia de ese resultado, los análogos de los aminoácidos sustratos canónicos se ensayaron en presencia de ambos nucleótidos (**Figura 57A**). Como se observa en el gráfico de la **Figura 57B**, la *LinGCL* tiene capacidad de usar Asp, Ser, y cistina como sustratos alternativos. Posteriormente, se ensayó la capacidad de la *LinGCL* de utilizar γ -GC junto a Cys, Glu, Ser o Gly. En presencia de γ -GC y Gly se evaluó la capacidad de la *LinGCL* de ser una enzima bifuncional, es decir, si presenta además actividad GS. Sin embargo, la *LinGCL* solo mostró funcionalidad cuando la mezcla de reacción contenía γ -GC, Glu y ATP- Mg^{2+} o GTP- Mg^{2+} . La falta de actividad GS se correlaciona con el análisis de la secuencia nucleotídica que muestra la ausencia de un dominio similar a la D-Ala-D-Ala ligasa (ATP-Grasp) hacia el extremo C-terminal (ver **Figura 63**) presente en las enzimas bifuncionales tales como las halladas en organismos Gram positivos como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes* y *Pasteurella multocida* (Janowiak, B.E. y col. 2005; Janowiak, B.E. y col. 2006; Vergauwen, B. y col. 2006; Li, W. y col. 2011). Finalmente, el reemplazo del ión metálico, tanto como complejo ATP- Mn^{2+} como GTP- Mn^{2+} , no permitió detectar actividad GCL. El comportamiento de la *LinGCL* fue similar al reportado para la GCL de *Proteus mirabilis* (*PmiGCL*) (Kumagai, H. y col. 1982) donde la enzima exhibió una leve promiscuidad de sustratos.

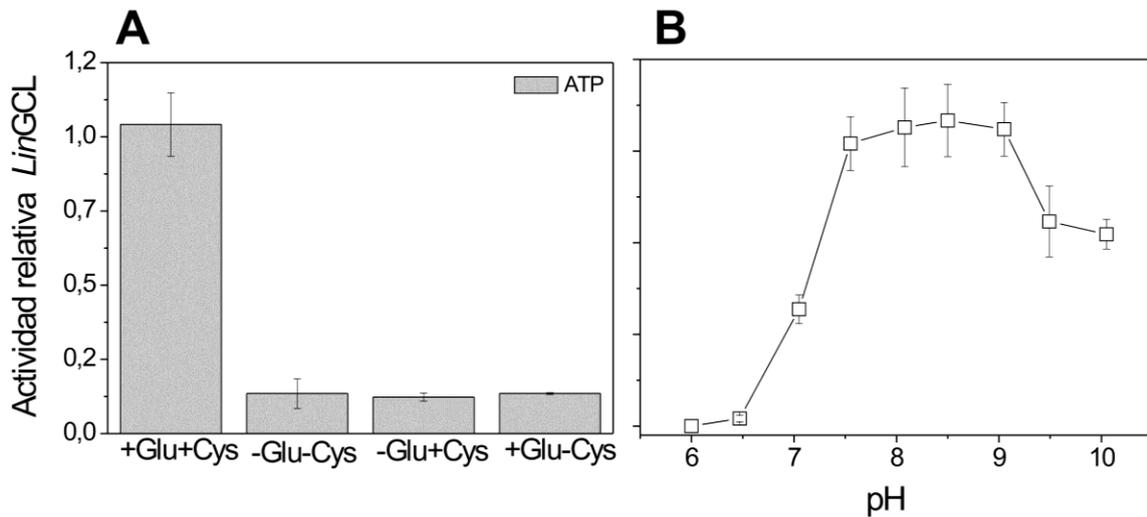


Figura 56 | A. Determinación de la funcionalidad de la enzima. La mezcla de reacción contenía ATP 1 mM, Cys 1mM, Glu 1 mM, MgCl₂ 10 mM y *buffer* Tris-HCl pH 8,0 100 mM. **B. Perfil de pH.** Las reacciones fueron realizadas en *buffer* Tris-propano 100 mM en un rango de pH de 6 a 10.

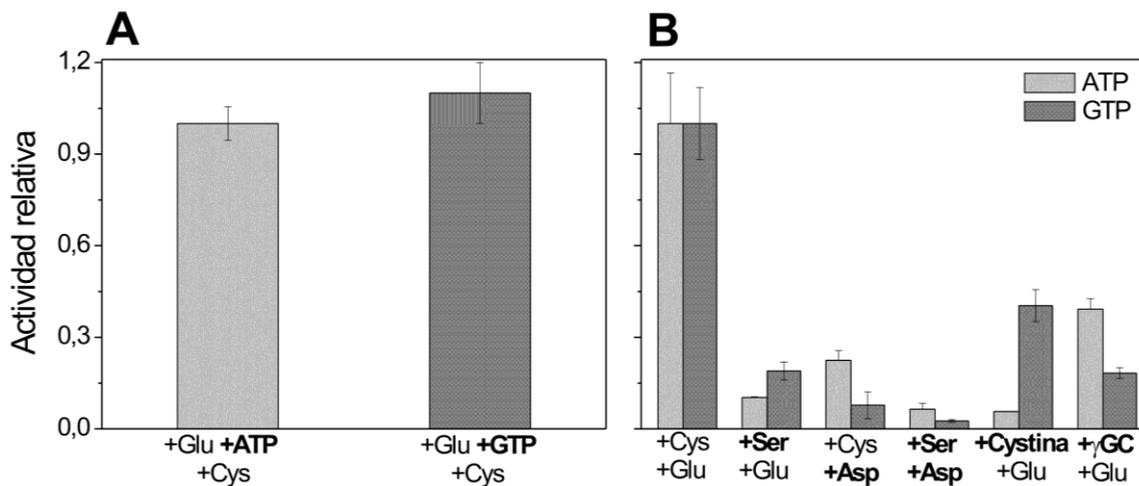


Figura 57 | Evaluación de sustratos alternativos para LinGCL. Los ensayos fueron realizados a pH 8,0 y 37 °C, en presencia de 1 mM de Glu, Cys, Ser, Asp, Cistina o γ-GC, y 10 mM de GTP o ATP. Las actividades se informaron como relativas a la actividad que presenta LinGCL, Glu, Cys y ATP o GTP, respectivamente.

Una vez evaluada en forma exploratoria un perfil de la especificidad de la enzima por los diferentes sustratos, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de la enzima recombinante. Las curvas de sustratos se realizaron para Glu, Cys y ATP o GTP. Los valores obtenidos se detallan en la **Tabla 10**. La LinGCL mostró una afinidad aparente por Cys y ATP dentro del mismo orden de magnitud. Contrariamente, la afinidad aparente por Glu fue un orden de magnitud menor respecto a los otros dos sustratos. Valores similares fueron reportados para las GCL de otros organismos tanto eucariotas como procariotas, entre ellos, la enzima de rata y humano, la GCL de algunas cepas de *E. coli* y la de *Candida boidinii*

(Griffith, O.W. y col. 1999). Por otro lado, las afinidades aparentes por ATP o GTP fueron similares. No obstante, se observó que en presencia de GTP, disminuyeron los valores de K_m para Cys y Glu con respecto a los valores estimados en presencia de ATP (ver **Tabla 10**).

Tabla 10 | Parámetros cinéticos aparentes de *LinGCL*. Las mediciones se realizaron en *buffer* Tris-HCl pH 8,0 100 mM, MgCl₂ 10 mM a 37 °C. La concentración utilizada de todos los co-sustratos fue de 1 mM.

Co-sustrato	Sustrato	V_m (U.mg ⁻¹)	K_m (mM)	$V_m.K_m^{-1}$ (U. mg ⁻¹ .mM ⁻¹)
Cys Glu	ATP	2,2 ± 0,4	0,41 ± 0,08	5.10 ¹
Cys Glu	GTP	0,96 ± 0,05	0,50 ± 0,07	2.10 ¹
ATP Glu		2,2 ± 0,4	0,21 ± 0,08	1.10 ²
GTP Glu	Cys	1,14 ± 0,07	0,029 ± 0,007	4.10 ²
ATP Glu		2,98 ± 0,05	1,12 ± 0,049	3.10 ¹
GTP Glu	Glu	3,01 ± 0,09	0,52 ± 0,05	6.10 ¹

4.3.2.2. Efecto inhibitorio de diferentes compuestos sobre la *LinGCL*

De igual modo al ensayo exploratorio realizado para evaluar la promiscuidad de la enzima respecto a sus sustratos, se ensayaron diferentes compuestos como inhibidores de la actividad de la misma. La actividad enzimática fue medida en presencia de Glu, Cys y ATP-Mg²⁺ o GTP-Mg²⁺, y los potenciales inhibidores. Los compuestos evaluados fueron: γ -GC, GSH y sus formas disulfuros (bis- γ -GC y GSSG), coenzimas reducidas y oxidadas (NADH, NAD⁺, NADPH o NADP⁺), H₂O₂ y DTT. Existen numerosos antecedentes de que el GSH ejerce una inhibición de tipo *feed back* negativo sobre este tipo de enzimas (tanto de organismos eucariotas como procariontas, así como también para enzimas mono y bifuncionales) regulando de este modo la

síntesis de GSH (Richman, P.G. y col. 1975; Hang, C.S. y col. 1987; Griffith, O.W. y col. 1999; Franklin, C.C. y col. 2009; Li, W. y col. 2011). En las GCL de bacterias como la de *E. coli*, se ha informado que el GSH se une al sitio de unión al Glu, como así también (a pesar de no ser identificado específicamente) a un sitio que interactúa con el grupo tiol de la Cys (Hang, C.S. y col. 1987). En cambio, en eucariotas, el GSH (además de tener un comportamiento similar al anterior) genera una reducción del disulfuro presente entre las subunidades catalítica y moduladora. Esto trae un cambio conformacional que afecta la accesibilidad al sitio de unión por los sustratos (Franklin, C.C. y col. 2009). La actividad enzimática de la *LinGCL* (en presencia de Glu, Cys y ATP-Mg²⁺ o GTP-Mg²⁺) fue inhibida por los productos generados en cada una de las etapas de la síntesis de GSH (γ -GC y GSH). En adición, la bis- γ -GC y el GSSG, ejercieron una leve pérdida de actividad funcional de la enzima en presencia de Cys (**Figura 58A**). No obstante, cuando se reemplazó Cys por Ser (**Figura 58B**), esto no fue evidenciado. Este resultado indicó que este comportamiento, posiblemente, es debido a la generación de un disulfuro mixto entre la Cys y estos compuestos, produciendo una disminución de la concentración efectiva de Cys y en consecuencia una menor actividad enzimática.

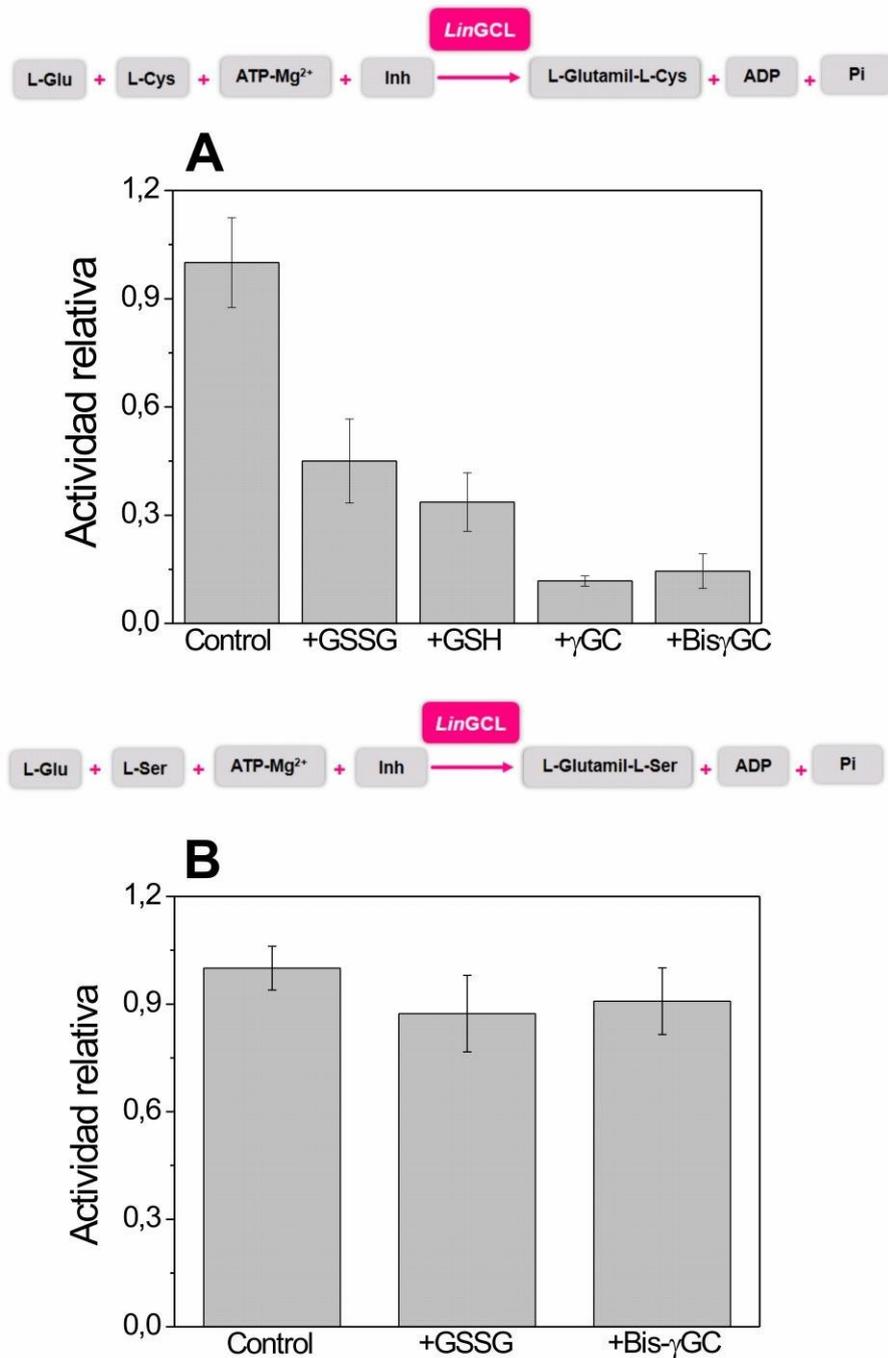


Figura 58 | Efecto inhibitorio de las formas oxidadas y reducidas de tioles. Los diferentes tioles fueron adicionados a la mezcla de reacción GSSG 1mM, GSH 1 mM, γ-GC 1 mM o bis-γ-GC 1 mM, respectivamente. La mezcla de reacción contenía: ATP 1 mM, Cys 1mM, Glu 1 mM, MgCl₂ 10 mM y *buffer* Tris-HCl pH 8,0 100 mM. Los ensayos fueron realizados a 37 °C y pH 8,0. En **A** la mezcla de reacción contenía Glu, Cys y ATP-Mg²⁺. En **B** la Cys fue reemplazada por Ser. Inh= inhibidor.

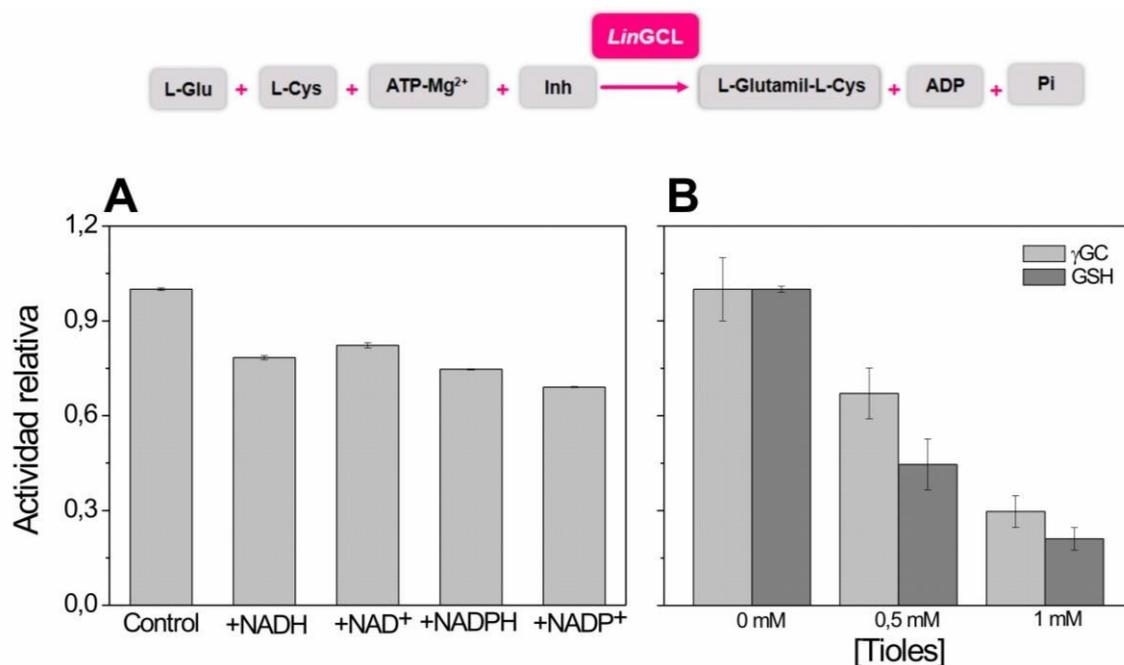


Figura 59 | Efecto inhibitorio de algunos compuestos en la actividad de *LinGCL*. A. A la mezcla de reacción se le adicionaron 200 μ M de las coenzimas oxidadas y reducidas, y en B. 0; 0,5 y 1 mM de GSH y γ -GC respectivamente. Los ensayos fueron realizados a 37 $^{\circ}$ C, pH 8,0 y la mezcla de reacción contenía Glu, Cys y ATP-Mg²⁺.

Por otro lado, se registró una actividad del 80-85 % en presencia de NADH y NAD⁺, respectivamente, y una actividad del 78-75% con NADPH y NADP⁺ (**Figura 59A**). Los perfiles de inhibición fueron similares a los hallados para la GCL de *Xenopus laevis* en presencia de esas coenzimas (Davis, J.S. y col. 1973). Contrariamente, agentes reductores y oxidantes, tales como el DTT y H₂O₂, no ejercieron efecto sobre la actividad enzimática de la *LinGCL*, ya sea cuando estos fueron adicionados directamente a la mezcla de reacción o cuando se incubó previamente la enzima en presencia de los mismos (no mostrado). Tampoco se observó retraso en la movilidad electroforética de la enzima ni formación de agregados de mayor masa molecular cuando fue realizado un SDS-PAGE no reductor en presencia de diferentes relaciones de enzima: oxidante (no mostrado). Estos últimos resultados sugieren la falta de formación de puentes disulfuros intra y/o intermoleculares cuando la proteína se somete a tratamientos con oxidantes.

Si bien existen numerosos antecedentes en la literatura acerca del mecanismo inhibitorio que produce el GSH sobre la GCL (Richman, P.G. y col. 1975; Chen, Y. y col. 2005), no se ha descrito la cinética de inhibición que el producto de la reacción, la γ -GC, genera sobre esta enzima. Esta falta de información condujo a profundizar este estudio. De este modo, se determinó que la γ -GC ejerce un efecto

inhibitorio de tipo reversible competitivo lineal respecto a ambos aminoácidos sustratos de la enzima (con un $K_i = 0,03$ mM respecto a Cys y un $K_i = 0,14$ mM respecto a Glu) (**Figura 60**). Sin embargo, no presentó efecto inhibitorio respecto al ATP. Estos resultados estarían indicando que el producto afectaría la unión de ambos aminoácidos sustratos directamente en el sitio de unión. Si bien se desconocen los niveles fisiológicos intracelulares tanto del Glu como de la Cys en *L. interrogans*, en relación con los resultados obtenidos se realizaron las siguientes inferencias. La mayor afinidad que muestra la enzima por la Cys y el bajo K_i por la γ -GC, podrían estar relacionados con un bajo nivel intracelular de este aminoácido. En adición a esto, se podría pensar que la alta afinidad que presenta *LinGCL* por la Cys traería, en consecuencia, que ante una situación de bajas concentraciones del aminoácido disponible en la célula, “se priorice” la síntesis de γ -GC (por competencia de la GCL con otras enzimas por la Cys). Por otro lado, el bajo K_i por la γ -GC, indicaría que el mismo ejercería un *feed-back* negativo sobre la actividad de la enzima, de manera de no hacer uso de los aminoácidos ni de moléculas energéticas (ATP o GTP) innecesariamente. Contrariamente, la baja afinidad que presenta la *LinGCL* por el Glu, podría sugerir que éste se presenta en elevadas concentraciones intracelulares. En relación a esto último, la posibilidad de que existe una mayor disponibilidad de este aminoácido (respecto a la de Cys) lleva a pensar que el excedente del mismo puede unirse al producto (γ -GC) y formar conjugados homólogos al GSH, donde la Gly es reemplazada por Glu. Compuestos similares han sido generados por GCL de plantas (Gromes, R. ; Gromes, R. y col. 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la *LinGCL* solamente fue capaz de generar la unión entre Glu y γ -GC.

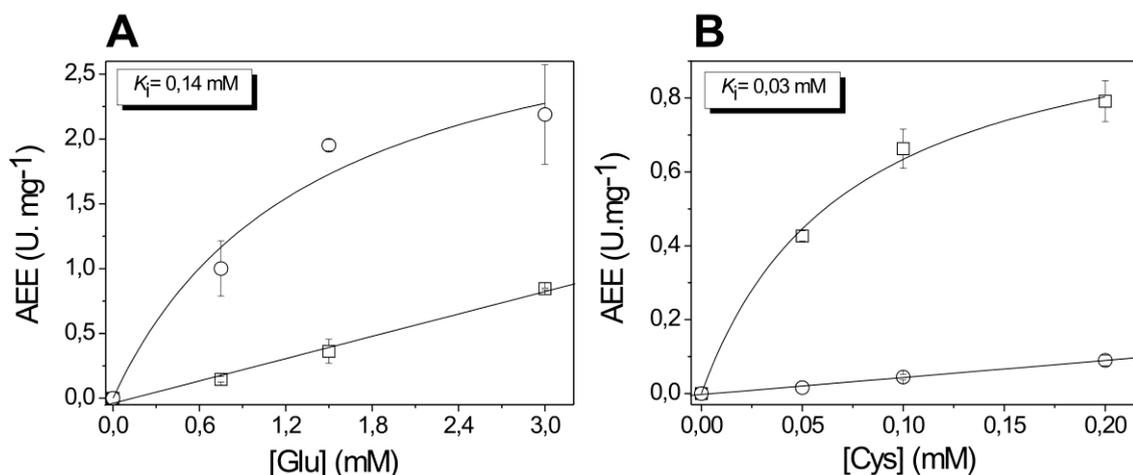


Figura 60 | Inhibición por γ -GC respecto a los aminoácidos sustrato de *LinGCL*. Los ensayos fueron realizados en presencia (\square) o ausencia (\circ) de 1 mM de γ -GC, a pH 8,0 y 37 °C, con una concentración final de los co-sustratos de 1 mM y MgCl_2 10 mM.

4.3.3. Determinación de la funcionalidad de la *LinGCL* en células de *E. coli*

Con la finalidad de realizar una aproximación de la funcionalidad de la enzima *in vivo* se evaluó el contenido de tioles totales, así como también el de GSH en células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el constructo recombinante [pMAL-C-TEV/*LinGCL*]. Como control negativo se emplearon células de *E. coli* transformadas con el plásmido vacío (pMAL-C-TEV). Ese control permitió inferir la producción basal de tioles por acción de la GS y GCL de *E. coli*. Como condición basal se considera a las células sin expresar en forma heteróloga ninguna de las enzimas involucradas en una o ambas de las etapas de la síntesis de GSH (GCL y GS). Ambos cultivos celulares (ensayo y control), se crecieron a 37 °C y previa a su inducción con 25 μM de IPTG se normalizó su densidad celular. Posteriormente, a partir de la biomasa generada se produjo un extracto celular libre de proteínas (por lisis con ácido tricloroacético y posterior neutralización). A los extractos obtenidos se le valoró el contenido de tioles totales (empleando DTNB) como de GSH total (empleando el método enzimático con GR). El número de tioles o GSH por bacterias se expresó teniendo en cuenta que una $\text{DO}_{630 \text{ nm}} = 1$ es equivalente a $7 \cdot 10^8$ células de *E. coli* ml^{-1} . Como se observa en el gráfico de barras de la **Figura 61A**, el contenido de tioles totales se incrementa en las células de *E. coli* transformadas con la *LinGCL*, lo cual podría indicar que se estaría acumulando γ -GC. Esta especulación es apoyada debido a que, contrariamente a lo esperado, no se observó diferencias significativas en el contenido de GSH total en ambas cepas recombinantes. Una posible explicación a este hecho,

podría deberse a que al expresar una GCL recombinante en una cepa que posee su enzima homóloga, la capacidad de síntesis de γ -GC se podría haber aumentado. Esto haría que la etapa de producción de γ -GC dejaría de ser la limitante en la vía metabólica de síntesis de GSH, restringiendo su velocidad de síntesis. Es interesante remarcar que este fenómeno fue observado en condiciones en que los niveles de la proteína recombinante no alcanzaron una elevada sobreexpresión, como se muestra en la **Figura 61B**.

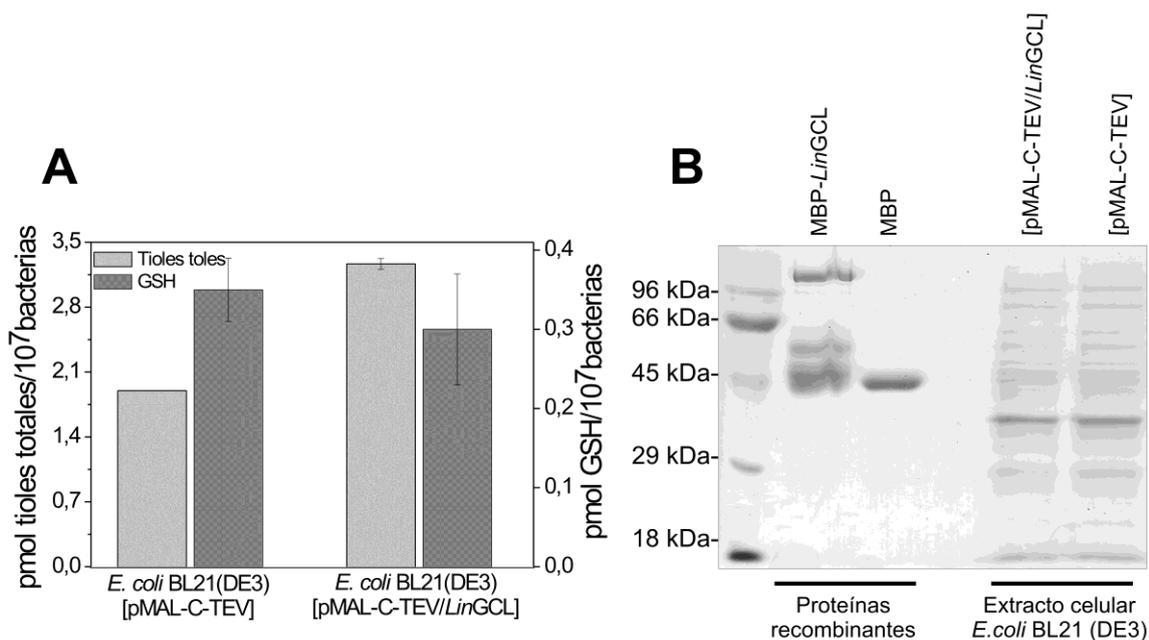


Figura 61 | Funcionalidad *in vivo* de *LinGCL*. **A.** Se midió el nivel de tioles en células de *E. coli* transformadas tanto con [pMAL-C-TEV] como con [pMAL-C-TEV/*LinGCL*]. **B.** Los niveles de expresión de las células transformadas con ambas construcciones se evaluaron en un SDS-PAGE al 12%.

4.3.4. Discusión

Para evadir el daño generado por las EROs y ERNs es necesaria la acción coordinada de proteínas y metabolitos antioxidantes, tales como los tioles de baja masa molecular. El GSH es el tiol más abundante en la mayoría de los eucariotas así como también en proteo y cianobacterias (Masip, L. y col. 2006). Este es sintetizado en dos pasos dependientes de ATP-Mg²⁺. Primero, la GCL establece la unión peptídica entre Cys y Glu formando γ -GC. Segundo, la glutatión sintetasa (GS) adiciona una Gly al extremo C-terminal de la γ -GC, formando GSH. Su reciclaje (reducción de la forma disulfuro) es llevado a cabo por la glutatión reductasa (GR) en la mayoría de los organismos que presentan este metabolito (Dickinson, D.A. y col. 2002).

La capacidad reductora de los disulfuros de baja masa molecular por *LinTrx*, así como también la amplia disponibilidad de secuencias codificantes para enzimas putativas dependientes de la vía de GSH en *L. interrogans*, fueron el punto de partida para comenzar el estudio de la enzima que cataliza el primer paso de la síntesis de GSH. Por tal motivo, se obtuvo la *LinGCL* en forma recombinante. La enzima presentó una estructura monomérica, similar a la GCL de otros organismos (Abbott, J.J. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2002). La *LinGCL* no presentó cambios en su estructura terciaria/cuaternaria cuando se incubó bajo diferentes condiciones redox. Efectos similares se describieron para las GCLs de proteobacterias, las cuales permanecen como monómeros bajo condiciones oxidantes o reductoras (independientemente de la conservación de uno de los residuos de Cys involucrados en la transición dímero-monómero en plantas) (Gromes, R. y col. 2008). Ese residuo de Cys en la GCL de *Arabidopsis thaliana* (*AthGCL*), por ejemplo, regula su actividad. En condiciones reductiva la *AthGCL* se inactiva y en presencia de H_2O_2 incrementa su actividad como consecuencia de la formación de un homodímero (Gromes, R. ; Franklin, C.C. y col. 2009). Por lo tanto, mientras que la estructura heterodimérica de las GCLs eucariotas es mantenida por puente disulfuro, las bacterianas como la *LinGCL* presentan una estructura monomérica bajo diferentes condiciones redox.

La actividad específica de la *LinGCL* ($1,3 \text{ U.mg}^{-1}$) se haya dentro del mismo orden de magnitud que la reportada para la subunidad catalítica de la GCL de *H. sapiens* ($1,2 \text{ U.mg}^{-1}$), la GCL de *Xantomonas campestris* ($2,4 \text{ U.mg}^{-1}$), la de *Agrobacterium tumefaciens* ($2,6 \text{ U.mg}^{-1}$) y la GCL de *E. coli* ($3,6 \text{ U.mg}^{-1}$). El pH óptimo para la enzima en presencia de ATP, Cys y Glu está entre 7,5-8,0, valores similares a lo informado para otras GCLs (Hussein, A.S. y col. 1995). La *LinGCL* tiene la capacidad de usar Asp, Ser y γ -GC como sustratos alternativos aunque en menor proporción. Es interesante indicar que esta enzima presenta parámetros cinéticos similares para la utilización de GTP- Mg^{2+} o ATP- Mg^{2+} (en presencia de Glu y Cys como co-sustratos). Por otro lado, la enzima mostró mayor afinidad por Cys que por Glu. En la bibliografía existen numerosos antecedentes acerca de la capacidad de la GCL de otras fuentes de emplear sustratos alternativos (Hang, C.S. y col. 1987; Hibi, T. y col. 2002; Kelly, B.S. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2004). Así por ejemplo la GCL de *E. coli* (*EcoGCL*) puede unir con elevada afinidad Mn^{2+} en lugar de Mg^{2+} (Kelly, B.S. y col. 2002). La *EcoGCL* muestra amplia capacidad de unir sustratos análogos al Glu, y sólo algunos análogos a Cys que presenten cadenas laterales de igual tamaño e hidrofobicidad que ésta. Por el contrario,

la GCL humana no tiene actividad con análogos de Glu como el Asp, sin embargo acepta una variedad de análogos de Cys (Kelly, B.S. y col. 2002; Hibi, T. y col. 2004). Además de esto, si bien la GCL de rata es estructuralmente diferente a la de *E. coli*, estas presentan propiedades cinéticas similares (Hang, C.S. y col. 1987).

Una característica observada en *LinGCL* es que presenta una inhibición marcada por GSH y γ -GC. Se determinó que esta última (el producto de la reacción) ejerce un efecto inhibitorio del tipo competitivo respecto a los aminoácidos sustratos de la enzima, no así sobre el ATP, el cual no se vió afectado por la presencia de este inhibidor. Este efecto inhibitorio no fue observado cuando se reemplazó γ -GC por bis- γ -GC. Estos últimos resultados, nos permiten inferir los siguientes supuestos: en condición basal, la inactivación que la γ -GC ejerce sobre *LinGCL* podría mantener un balance, entre la síntesis y degradación de este tiol a nivel celular. Por otro lado, en situación de estrés oxidativo, parte de este tiol se oxida a bis- γ -GC el cual no afecta la actividad de la enzima, permitiendo que forme γ -GC para así contribuir hacia la homeostasis redox. Sin embargo, tal como observamos en ensayos de actividad enzimática *in vitro*, la *LinGCL* catalizaría la formación en un conjugado entre γ -GC y Glu, cuya importancia a nivel celular se desconoce hasta el momento. En plantas, se han encontrado compuestos análogos a los conjugados del Glu y se los han considerado capaces de actuar como precursores bioquímicos de péptidos de cadena larga involucrados en la detoxificación de metales pesados (Klapheck, S. y col. 1992; Meuwly, P. y col. 1993).

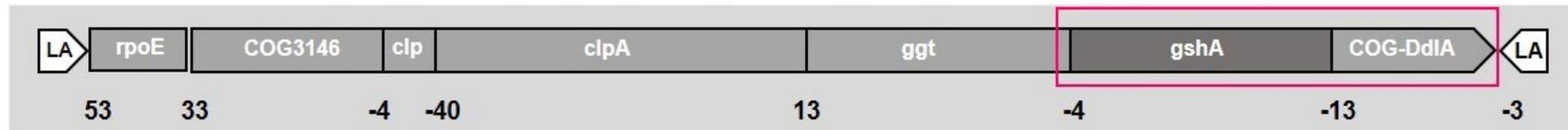
En forma paralela a los ensayos cinéticos *in vitro*, se evaluó la funcionalidad de la *LinGCL* en un sistema *in vivo* usando para ello células de *E. coli* BL21 (DE3) que expresan la enzima recombinante. De este experimento se observó que el contenido de tioles totales aumentó mientras el nivel de GSH total no se modificó de manera significativa en la cepa que expresa *LinGCL* con respecto a la cepa control. El mayor nivel de tioles totales podría deberse a un aumento del contenido de γ -GC, sin embargo como la *LinGCL* no es una enzima bifuncional (con actividad GCL y GS) como ocurre en otras bacterias (Gopal, S. y col. 2005; Janowiak, B.E. y col. 2005) el contenido de GSH se mantuvo sin modificar. Esto es apoyado por los resultados de los ensayos *in vitro* donde no se pudo detectar actividad GS de *LinGCL*, empleando γ -GC, Gly y ATP como sustratos.

Finalmente, teniendo en cuenta tanto la funcionalidad de la *LinGCL* así como también la identificación de genes codificantes para una GS putativa y enzimas

dependientes de este metabolito, sugieren que existiría un metabolismo completo del GSH en leptospiras. En un primer análisis a nivel genómico no se detectó en forma directa un gen codificante para GS en *L. interrogans* (contrariamente a *L. biflexa*, la cual posee un gen codificante para esta enzima). Por otro lado, en la literatura se reportó que algunas bacterias contienen el gen *gshF* (Gopal, S. y col. 2005), el cual codifica para una enzima bifuncional (con actividad GCL y GS) (Gopal, S. y col. 2005; Janowiak, B.E. y col. 2006; Vergauwen, B. y col. 2006; Li, W. y col. 2011). El dominio N-terminal de este polipéptido exhibe moderada identidad en su secuencia aminoacídica con las GCL. La porción C-terminal de la proteína, contiene un dominio ATP-Grasp (homólogo a la D-Ala-D-Ala ligasa), el cual presenta insignificante similitud con la GS, pero se considera que es un dominio implicado en la síntesis de GSH (Gopal, S. y col. 2005; Janowiak, B.E. y col. 2006; Vergauwen, B. y col. 2006; Li, W. y col. 2011). Para apoyar esa hipótesis, Gopal y col. (2005) han realizado mutantes en *Listeria monocytogenes*, donde se trunca ese dominio y se detecta que la enzima pierde la capacidad de sintetizar GSH pero no γ -GC. Además, estos autores realizaron un análisis bioinformático encontrando que *L. interrogans* serovar *Lai* 56601 contiene ORFs separados pero adyacentes codificantes para una GCL (LA2106) y para una ATP-Grasp (LA2107). A partir de estos antecedentes, se realizó una búsqueda con un predictor de operones (<http://www.microbesonline.org/operons/>) con el objetivo de conocer si el contexto génico de la secuencia codificante para la GCL de *L. interrogans* serovar Copenhageni era similar al reportado para el serovar *Lai* de esta especie. Tal como se muestra en la **Figura 62**, el contexto génico en el cual se encuentran los genes codificantes para las enzimas implicadas en la síntesis de GSH, son similares para ambos serovares. Además, las secuencias aminoacídicas de la GS putativa en *L. interrogans* y la codificada para el serovar *Lai* 56601 (LA2107) muestran un 100% de identidad. Sumado a esto, en la **Figura 63** se muestran los dominios identificados en la secuencia aminoacídica para una GS putativa en *L. interrogans* serovar Copenhageni junto a los dominios ATP-Grasp de proteínas multidominio (GCL-GS) cuya funcionalidad ha sido puesta de manifiesto. A partir de estos análisis *in silico* se podrían inferir la existencia de una GS putativa en *L. interrogans*, lo cual explicaría la actividad detectada en los extractos celulares de la bacteria. El clonado, purificación y obtención en forma recombinante, así como también la caracterización cinética de esta enzima es de potencial interés para trabajos futuros fuera del alcance de esta Tesis.

VIMSS Predicted Operon

VIMSS291560: LA_2106 gshA gamma-glutamylcysteine synthetase (RefSeq), 520 a.a. [*Leptospira interrogans* serovar lai str. 56601]



VIMSS660477: LIC11812 gshA gamma-glutamylcysteine synthetase (NCBI), 520 a.a. [*Leptospira interrogans* serovar Copenhageni str. Fiocruz L1-130]

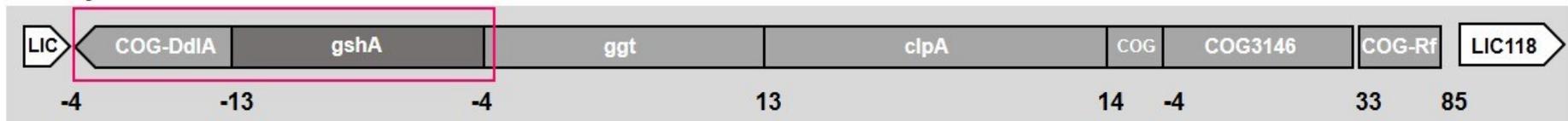


Figura 62 | Contexto génico de la secuencia codificante para una putativa GS en *L. interrogans*. Se empleó para identificar las posiciones de los genes en el genoma el predictor (<http://www.microbesonline.org/>). En un recuadro se muestran las secuencias codificantes para GCL (*gshA*) y una putativa GS (COG-DdIA) en dos serovares de *L. interrogans*, Lai (arriba) y Copenhageni (abajo).

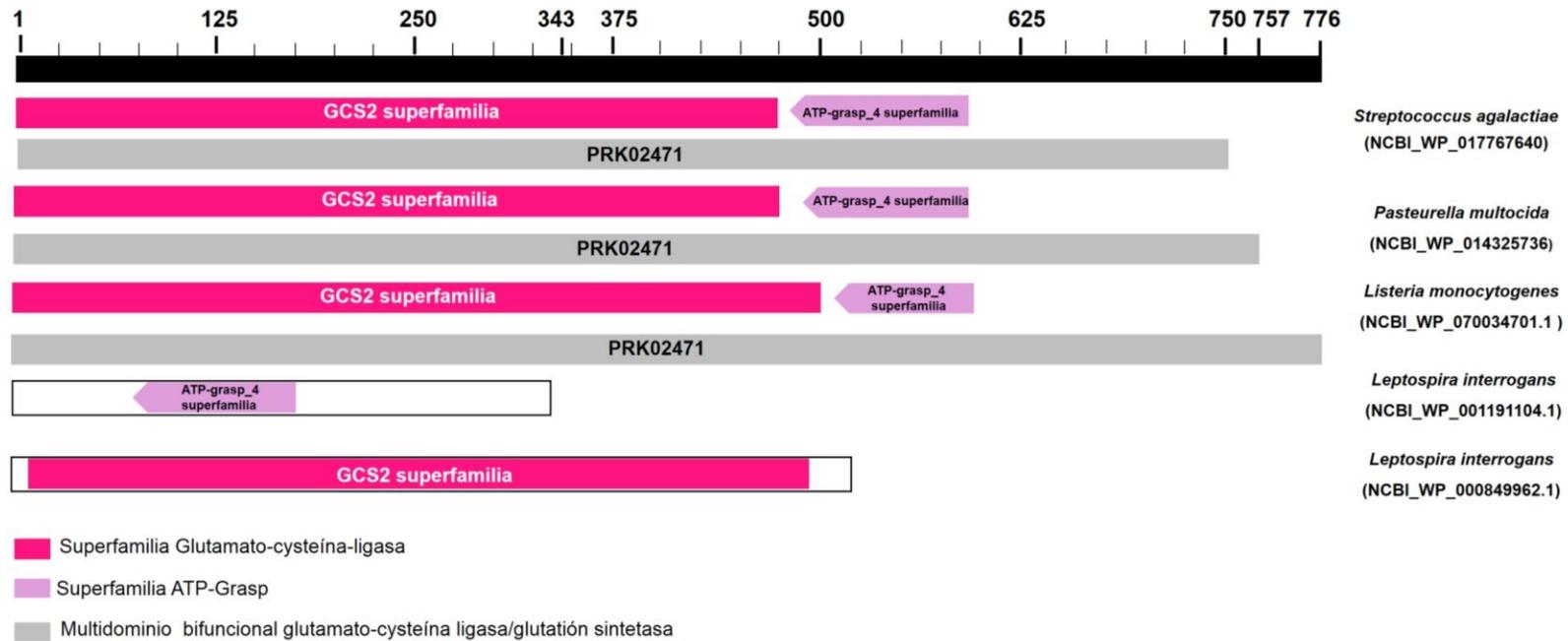


Figura 63| Esquema de los motivos identificados en las secuencias aminoacídica codificantes para enzimas bifuncionales (GCL-GS) y la putativa GS de *L.interrogans*. Las secuencias apiladas junto a la GS putativa y la GCL de *L. interrogans*, incluyen la GCL-GS de *Streptococcus agalactiae*, *Pasteurella multocida* y *Listeria monocytogenes*. Los motivos se detectaron empleando <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>.

CAPÍTULO 4: Sistema de reparación del daño oxidativo en *L. interrogans*

4.4.1. Clonado y expresión de los genes codificantes para *LinMsrA1*, *LinMsrA2* y *LinMsrB*

En la base de datos del proyecto genoma de *L. interrogans* (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/world/lic/>) se identificaron posibles secuencias codificantes para dos MsrA (*linmsrA1*, LIC10545 y *linmsrA2*, LIC12978), *LinMsrA1* y *LinMsrA2*, respectivamente. Estos genes codifican para enzimas de 188 y 198 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 21 kDa y 23 kDa, respectivamente. En la **Figura 64** se presenta un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la *LinMsrA1* y *LinMsrA2*. Se puede observar que las proteínas exhiben una identidad de secuencia del 37%. Ambas secuencias primarias se corresponden con una MsrA del “tipo Trx”, ya que su Cys catalítica y resolutive se hayan presentes en un motivo CFWC, de manera similar a la MsrA de *Bacillus subtilis* (Boschi-Muller, S. y col. 2005). Además de las Cys presentes en el motivo CXXC, la *LinMsrA1* presenta tres residuos de Cys adicionales, mientras que la *LinMsrA2* tiene sólo una Cys extra. En la **Figura 66** se muestra un alineamiento de secuencias más amplio de estas proteínas junto a MsrA de otros organismos.

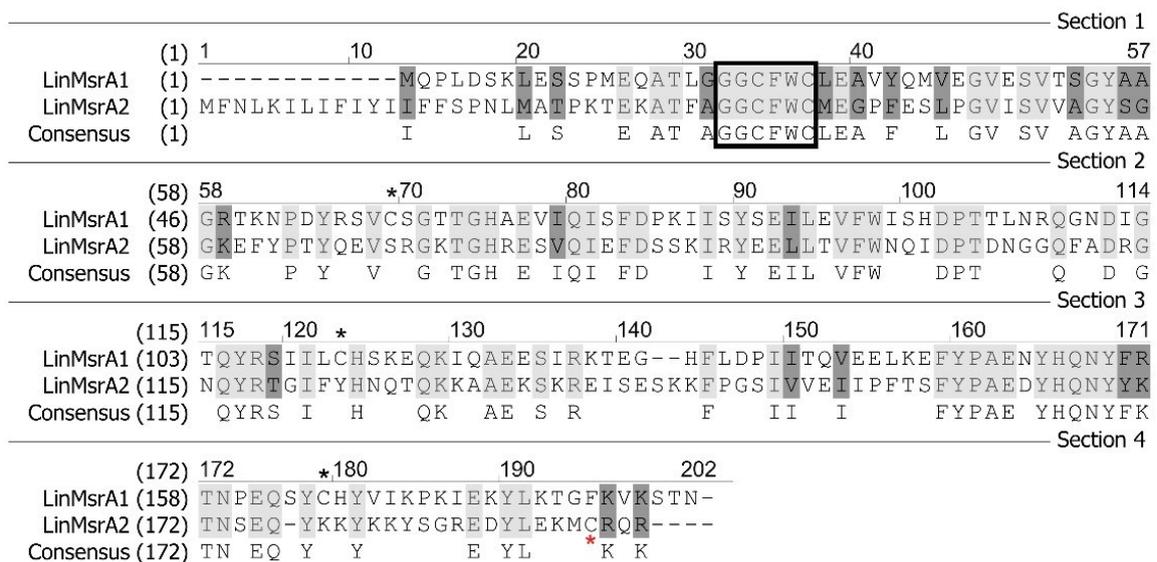


Figura 64 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *LinMsrA1* y *LinMsrA2*. En el recuadro se muestran los dos residuos de Cys contiguos en un motivo tipo CXXC presentes en ambas proteínas y que se postula, serían los involucrados en la catálisis. Con asteriscos negros (*) se señalan los tres residuos de Cys adicionales presentes en *LinMsrA1* (la cual tiene un total de cinco Cys) y con un asterisco rojo (*) se indica la Cys extra que tiene *LinMsrA2* (la cual tiene un total de tres Cys). El alineamiento fue realizado empleando el programa Vector NTI 10.0.

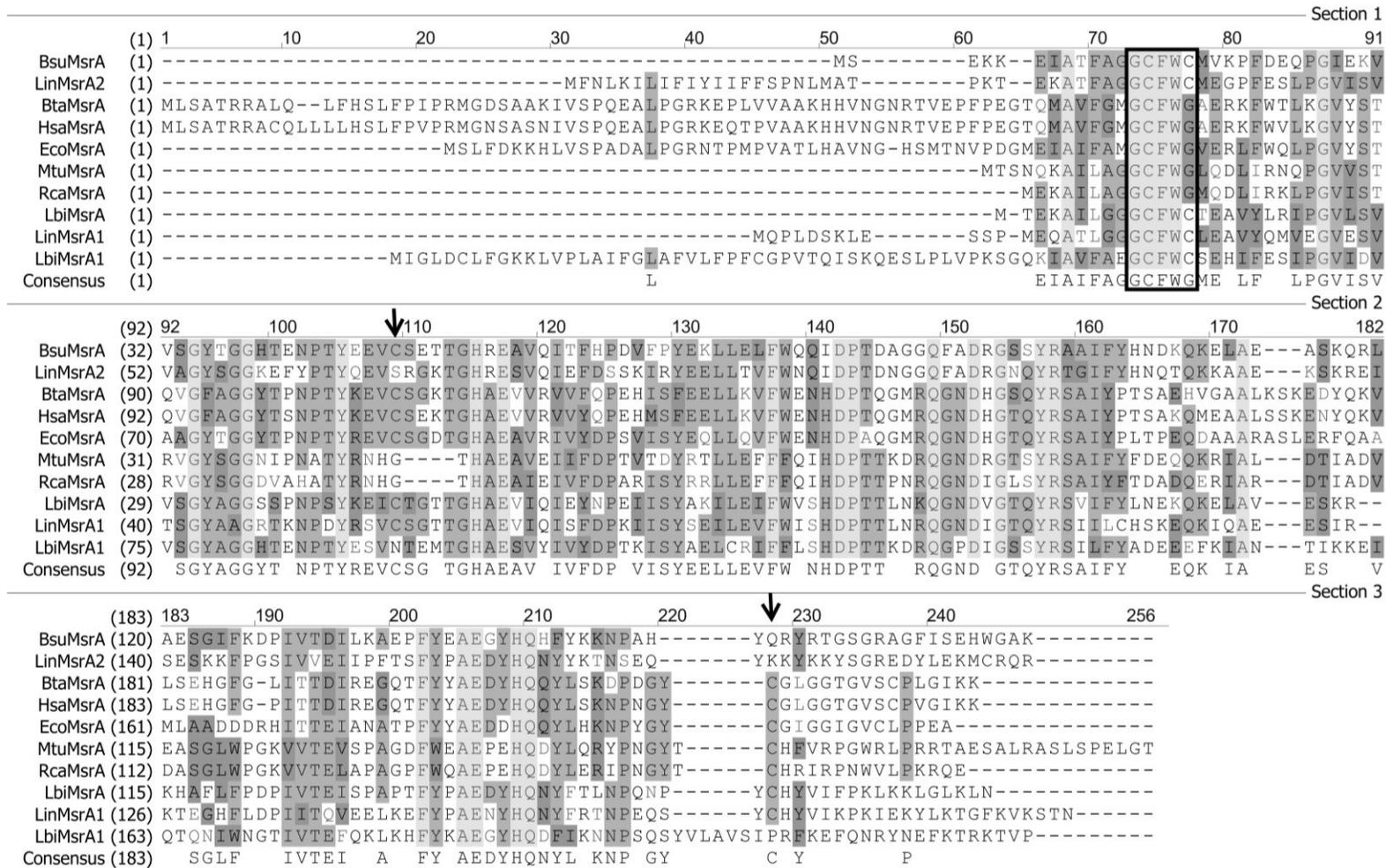


Figura 65 | Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las *LinMsrAs* con *MsrA* de otras fuentes. Las secuencias apiladas junto a las *MsrA* de *L. interrogans* corresponden a la *MsrA* de *Bacillus subtilis* (NCBI-AIY97801.1), *Bos Taurus* (NCBI-AAI02981.1), *Homo sapiens* (NCBI-NP_036463), *E. coli* (NCBI-AAA97115.1), *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI-POA5L0.1), *Rhodobacter capsulatus* (NCBI-QQB14835.1) y *L. biflexa* (NCBI-WP_012389572.1 y NCBI-WP_012389852.1), respectivamente. En el recuadro se muestra el motivo redox activo conservado en todas las *MsrA*. En las *MsrAs* de la especie patógena y saprófita de *Leptospira* analizadas, el motivo redox activo es del tipo CXXC. Con flechas se señalan otros residuos de Cys conservados entre las secuencias aminoacídicas analizadas. El alineamiento fue realizado empleando el programa Vector NTI 10.0.

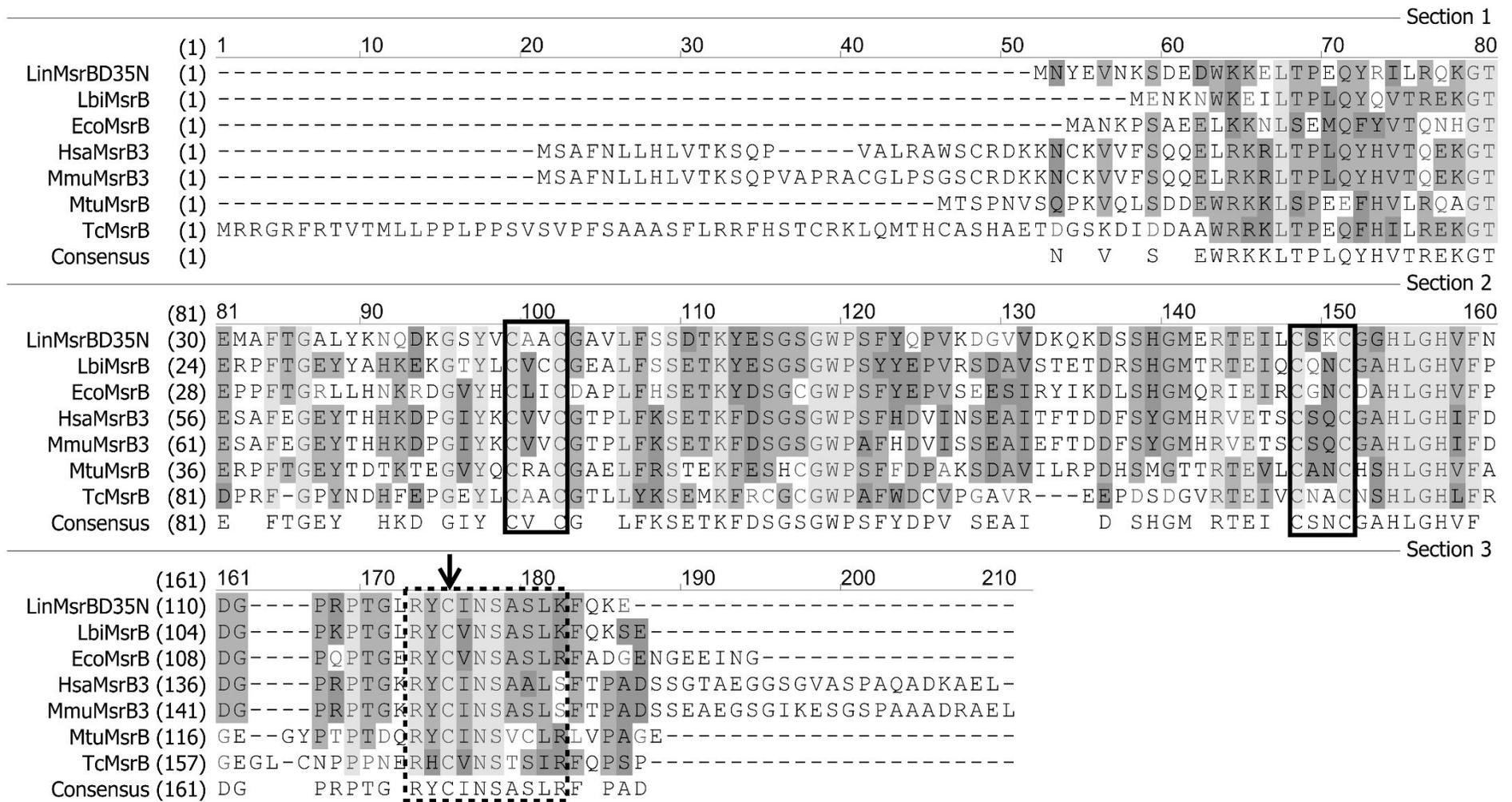


Figura 66 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de *LinMsrBD35N* con *MsrB* de 1Cys de otras fuentes. Las secuencias apiladas junto a las *MsrB* de *L. interrogans* corresponden a la *MsrB* de *L. biflexa* (NCBI_WP_012388169.1), *E. coli* (NCBI_WP_001284612.1), *Homo sapiens* (NCBI_EAW97151.1), *Mus musculus* (NCBI_NP_796066.1), *Mycobacterium tuberculosis* (NCBI_WP_040631412.1) y *Trypanosoma cruzi* (NCBI_XP_817746.1), respectivamente. En los recuadros de línea continua se muestran los motivos CXXC necesarios para la coordinación del ión metálico. El motivo redox activo se indica en el recuadro de línea discontinua, con una flecha se señala la Cys nucleofílica. El alineamiento fue realizado empleando el programa Vector NTI 10.0.

En forma adicional, pudo ser identificada una secuencia codificante para una MsrB (*linmsrB*, NCBI_WP_000790973.1). En la **Figura 66** se presenta un alineamiento de la secuencia aminoacídica de la *LinMsrB* con otras MsrB de diferentes orígenes. En el mismo fueron identificados cuatro residuos de Cys en posiciones conservadas e involucrados en la unión del ión metálico (*) y un quinto residuo (*) implicado en la catálisis. Por otro lado, se detectó la presencia de una extensión N-terminal no conservada por otras MsrB. Con el objetivo de poder predecir una posible función del extremo N-terminal de la *LinMsrB* se realizó un análisis *in silico* utilizando los predictores *online* SOSUI¹ Signal-P² y PsortB³. A partir de los resultados arrojados por los servidores utilizados se llegó a un consenso promedio que sugiere que los 35 aminoácidos iniciales de la secuencia proteica corresponda a un péptido señal o motivo de unión a membrana. En vista de esta observación, para la obtención de la proteína recombinante se ha realizado el clonado de la secuencia codificante omitiendo los 105 pb del extremo 5' del ORF completo. La secuencia nucleotídica resultante codifica para una proteína madura de 131 aminoácidos (*LinMsrBΔ35N*), que presentaría una masa molecular teórica de 15 kDa.

Los tres genes especificados *linmsrA1* (LIC10545), *linmsrA2* (LIC12978) y *linmsrB* (NCBI_WP_000790973.1) fueron amplificados por PCR empleando el DNA genómico de la bacteria y *primers* específicamente diseñados (ver **Tabla 2** en Materiales y Métodos). Luego, se clonaron en pGEM®-T-*Easy* y sus identidades se confirmaron por secuenciación del ADN. El gen de la *linmsrB* fue subclonado en el pET22b y los genes *linmsrA1* y *linmsrA2* en el pMAL-C-TEV y en el pET28c. De las estrategias empleadas, *LinMsrA2* y la *LinMsrBΔ35N* se pudieron obtener en forma recombinante, expresándose en forma soluble en células de *E. coli* BL21 (DE3). Por el contrario, el gen *linmsrA1* pese a ser clonado en diferentes vectores de expresión y evaluar diferentes condiciones de inducción (temperatura, tiempo y concentración de IPTG) no se pudo obtener en forma soluble. A pesar de esta dificultad, se continuó con la purificación y caracterización de *LinMsrA2* y *LinMsrBΔ35N*. La purificación de la *LinMsrBΔ35N* recombinante fue llevada a cabo mediante un solo paso de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En cambio, la purificación de la *LinMsrA2* fue realizada en cuatro etapas: i) IMAC, ii) corte con TEV proteasa, iii) cromatografía de

¹ Disponible en: <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>

² Disponible en: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

³ Disponible en: <http://www.psort.org/psortb/>

afinidad a amilosa y iv) IMAC, tal como se procedió para obtener la *LinGCL* (descrito en el capítulo 2). El análisis de las proteínas recombinantes purificadas por SDS-PAGE reductor y teñido con *Coomassie blue*, muestra que las mismas fueron obtenidas con una pureza de ~95%, observándose una banda correspondiente a una masa de ~18 kDa para la *LinMsrBΔ35N* y una banda de ~26 kDa para la *LinMsrA2* (Figura 67). Las proteínas purificadas se almacenaron a -80 °C sin pérdida de actividad por un período no menor a ocho meses.

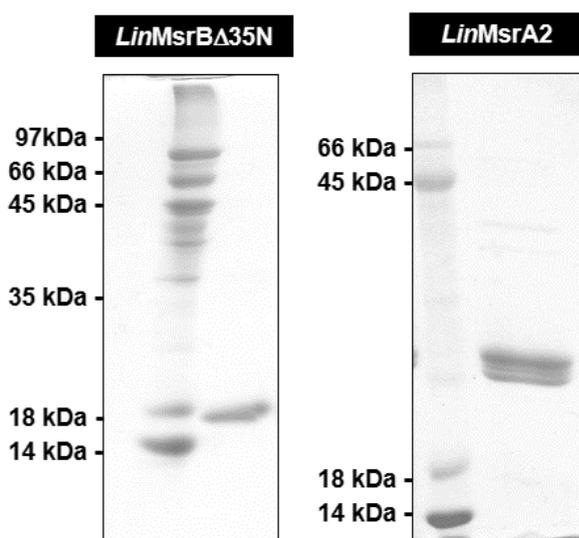


Figura 67 | Análisis electroforético de las *LinMsrs* recombinantes. Las proteínas fueron resueltas en un SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. Ambos geles se corresponden a la elución de la IMAC de la *LinMsrBΔ35N* (izquierda) y la *LinMsrA2* (derecha).

4.4.2. Localización celular de MsrB en *L. interrogans*

A partir de un cultivo de bacterias de crecimiento exponencial se realizó una extracción parcial de la fracción periplasmática (incubando con una solución de digitonina 0,016 mg.ml⁻¹). Luego, la suspensión fue centrifugada y el sobrenadante resultante correspondió a la fracción periplasmática y el *pellet* obtenido a las fracciones citoplasmáticas (envuelta por la membrana plasmática no permeabilizada). Con las fracciones obtenidas se realizó un ensayo de *western blot* utilizando anticuerpos policlonales contra *LinMsrBΔ35N*, la *LinTrxR* y la *Lincatalasa*. Una banda correspondiente a la masa molecular de la *LinMsrBΔ35N* fue detectada únicamente en la fracción periplasmática (Figura 68). Adicionalmente, se detectó en esta fracción a la *Lincatalasa*, la cual presenta una ubicación periplasmática, previamente informada en la literatura (Eshghi, A. y col. 2012). Este resultado permite inferir que la *LinMsrB* posee una localización en el periplasma de la bacteria. Como era de esperar, en la fracción citoplasmática se identificó a la *LinTrxR* (Figura 68).

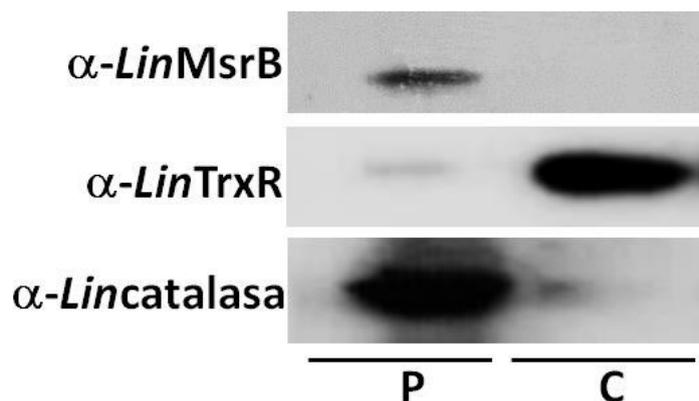


Figura 68 | Localización periplasmática de *LinMsrb*. Para la realización del ensayo de *western blot* se empleó un cultivo de 30 ml de *L.interrogans* en fase exponencial de crecimiento $DO_{420\text{ nm}} = 0,3$. Como extractante se empleó una solución de digitonina de una concentración de $0,016\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, preparada en Tris-HCl pH 7,5 100 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM y Sacarosa 250 mM. En la fracción periplasmática fueron identificadas la *Lincatalasa* (control) y la *LinMsrb*, mientras que la *LinTrxR* se detectó en el citoplasma. P= periplasma y C= citoplasma.

4.4.3. Caracterización básica de la estructura y función de las Msrs

Con el objetivo de determinar la masa molecular relativa en condiciones nativas de las proteínas recombinantes purificadas se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular empleando para ello una columna *Superdex 200 HR* (GE-*Healthcare*). Tanto la *LinMsrb* Δ 35N como la *LinMsrbA2* purificadas eluyeron como proteínas monoméricas con una Mr de 18 kDa y 38 kDa, respectivamente (**Figura 69**). Ninguna de las dos proteínas mostró cambios en el perfil de elución luego de un tratamiento previo con L-Met(*R,S*)SO o DTT (no mostrado).

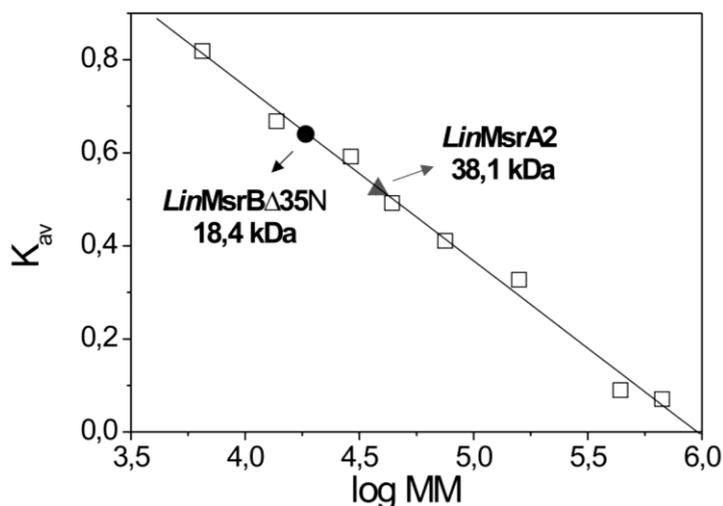


Figura 69 | Cromatografía de exclusión molecular de las Msrs recombinantes. Se empleó una *Superdex 200 HR* (GE). En la curva de calibrado construida con patrones de masa molecular conocida, se indican las masas correspondientes a la *LinMsrA2* y a la *LinMsrB Δ 35N*.

A continuación, se realizó un ensayo *in vitro* para determinar la capacidad de la *LinMsr Δ 35N* y la *LinMsrA2* de revertir la oxidación de Met no peptídicas. Específicamente, se evaluó la capacidad de las proteínas de reducir los distintos isómeros de la L-Met(*R,S*)SO utilizando DTT como reductor. Realizadas las reacciones *in vitro*, los productos de reacción fueron resueltos por cromatografía en capa delgada (TLC) y reveladas con ninhidrina como reactivo cromogénico. Como se muestra en la **Figura 70**, sólo fue detectada la presencia de Met en las reacciones donde la *LinMsr Δ 35N* fue incubada con L-Met(*R*)SO y la *LinMsrA2* con L-Met(*S*)SO (no se observó la generación de Met cuando las reductasas fueron incubadas en forma alterna con los isómeros de MetSO). Ese resultado soporta la estereoespecificidad que presentan este tipo de las enzimas. Cabe aclarar que la banda de menor intensidad detectada en la mezcla de reacción compuesta por *LinMsrA2* y L-Met(*R*)SO es debido a que ese isómero no se encuentra totalmente puro, dado que ambos isómeros fueron obtenidos en el laboratorio siguiendo un protocolo artesanal (Toennies, G. y col. 1941; Tarrago, L. y col. 2009). En adición, en las reacciones donde está presente la mezcla racémica de MetSO junto a *LinMsr Δ 35N* o a *LinMsrA2* la conversión a Met es parcial (**Figura 70**).

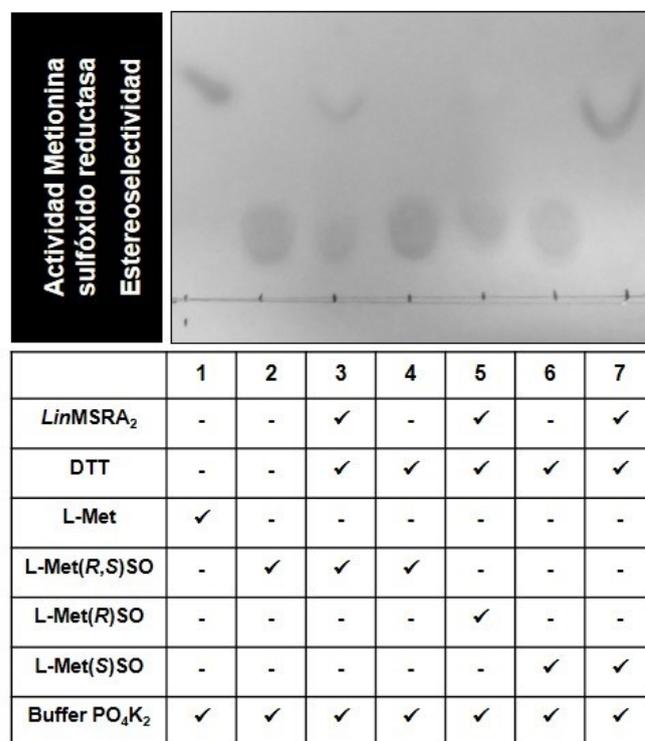
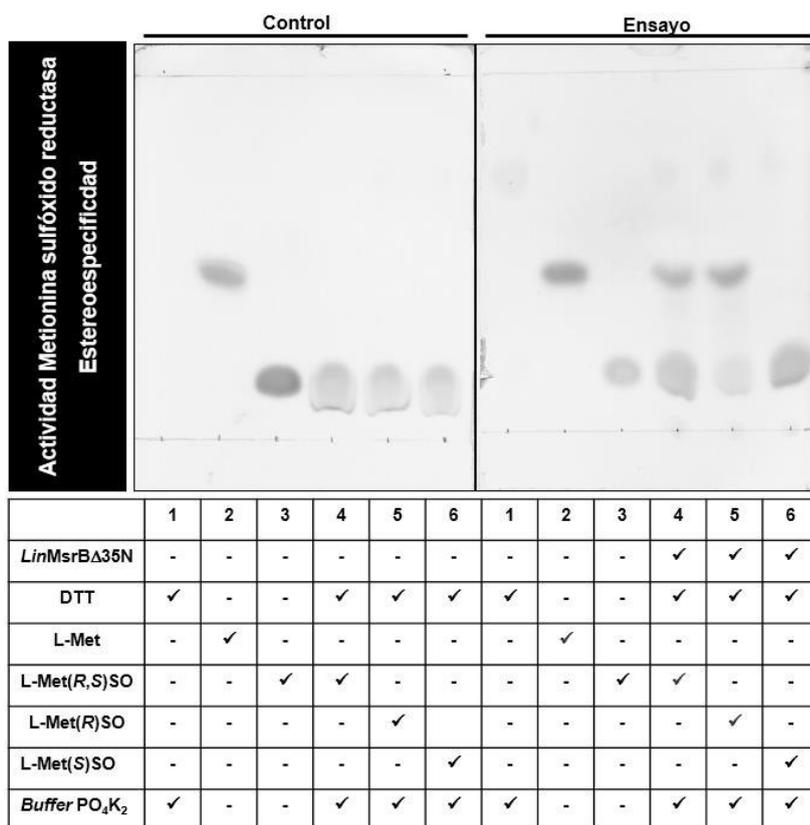


Figura 70 | Evaluación del producto de reacción por TLC. Las mezclas de reacción se detallan en las tablas debajo de cada perfil de migración cromatográfico (panel de arriba: *LinMsrBΔ35N* y panel de abajo: *LinMsrA2*). La fase estacionaria empleada fue sílica recubierta en aluminio (Merck), y la fase móvil fue butanol: ácido acético: agua (60:15:25). La placa se reveló mediante espray de ninhidrina.

Puesta en evidencia la funcionalidad de las reductasas, se decidió evaluar si la presencia y naturaleza del ión metálico afecta la función y/o estructura de la *LinMsrBΔ35N*. Tal como se señaló en el alineamiento de la **Figura 66** las MsrB poseen cuatros residuos de Cys extras que constituyen un sitio de unión al metal (de tipo *cluster* de Zn^{2+}). Al menos 50% de las secuencias putativas de MsrB, incluyendo la enzima de *E. coli*, tienen los cuatros residuos de Cys en dos motivos de tipo CXXC (Olry, A. y col. 2005). El metal que generalmente se encuentra unido a estas proteínas es Zn^{2+} (Boschi-Muller, S. y col. 2005). En vista de estos antecedentes, se evaluó si la presencia y tipo de ión metálico influye sobre la actividad enzimática de la *LinMsrBΔ35N* recombinante. Inicialmente se analizó qué tipo de ión metálico estaba presente en la proteína recombinante producida a partir de cultivos en medio LB. Con los resultados obtenidos por espectrofotometría de llama, se pudo inferir que la proteína así obtenida presenta una ocupancia del 30% por el ión metálico, encontrándose mayoritariamente Zn^{2+} y en menor medida Fe^{2+} (10:1). Luego, con la finalidad de obtener poblaciones homogéneas de la proteína recombinante en presencia (y ausencia) de un tipo de ión metálico en particular, se procedió a la expresión de la proteína mediante la utilización de un medio mínimo suplementado con el ión metálico de interés. Brevemente, a células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con [pET22/*LinMsrBΔ35N*] se las crecieron e indujeron en medio de cultivo M9 (medio mínimo) en ausencia o presencia de 100 μM de los diferentes iones metálicos (Co^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+}) y finalmente se purificaron por IMAC. Las diferentes versiones de la *LinMsrBΔ35N* con los distintos metales ensayados se obtuvieron con un alto grado de pureza (**Figura 70**) y todas las proteínas presentaron entre el 30-40% de ocupancia por el ión metálico (**Tabla 11**). Adicionalmente, las isoformas de *LinMsrBΔ35N* que unen Co^{2+} y Fe^{2+} presentan picos de absorción característicos en los espectros UV-Visible. La *LinMsrBΔ35N* con Fe^{2+} muestra un pico de absorción a 350 nm, mientras que la *LinMsrBΔ35N* con Co^{2+} muestra dos picos de absorción a 372 nm y a 485 nm (**Figura 71**). Es interesante indicar que la adición de EDTA, no modificó los perfiles espectroscópicos de ambas isoformas, pudiendo sugerir que la proteína posee una gran afinidad por el ión metálico, tal como ha sido informado para la selenoproteína MsrB de *Drosophila melanogaster* (Olry, A. y col. 2005). Con las diferentes versiones de la *LinMsrBΔ35N* se efectuó nuevamente una evaluación de la reducción de MetSO mediante TLC. En la **Figura 72** se exponen los perfiles de migración de las diferentes mezclas de reacción. Como puede observarse todas las

isoformas generadas fueron funcionales (pudiendo reducir MetSO a Met) en forma independiente de la presencia o naturaleza de metal unido.

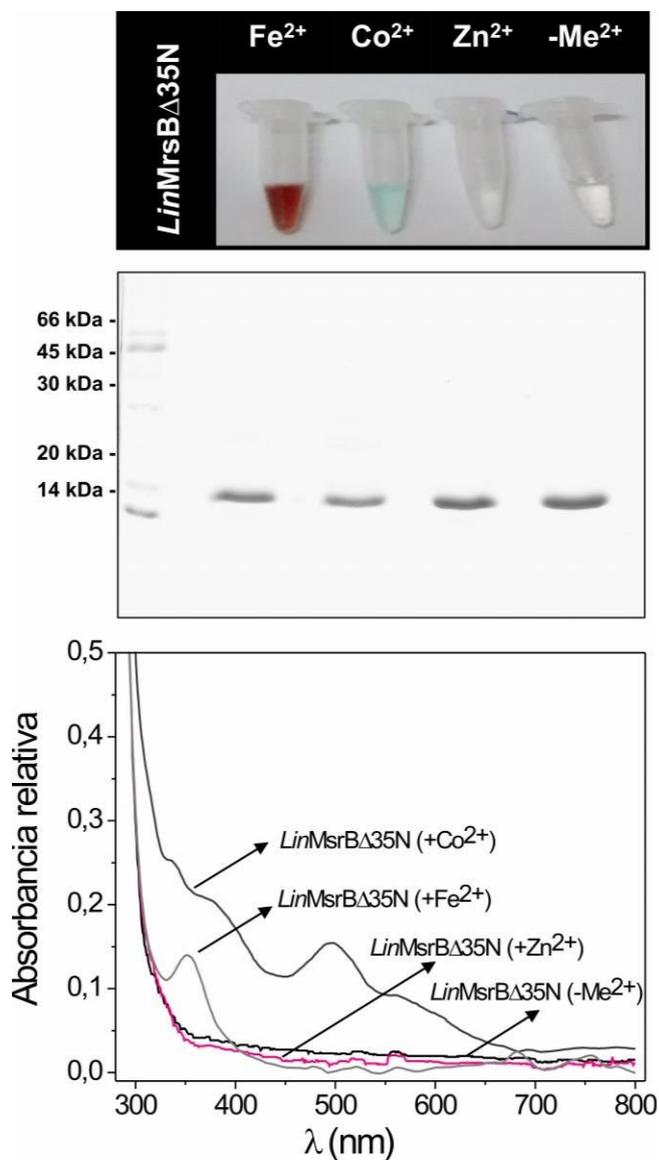


Figura 71 | Substitución del ión metálico en *LinMsrB*Δ35N. Se crecieron células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con [pET22/*LinMsrB*Δ35N] en M9 (medio mínimo), indujeron con 0,1 mM IPTG y en presencia de 0,1 mM de los diferentes metales y finalmente se purificaron por IMAC. Desde el panel superior al panel inferior, se muestran, primero, alícuotas de las distintas versiones de la proteína recombinante (con hierro, cobalto, zinc o sin metal). Segundo, se exhiben los perfiles de migración electroforética de cada uno de las proteínas recombinantes, resueltas en un SDS-PAGE al 15% y teñido con *Coomassie blue*. Finalmente, se presentan los espectros de absorción UV-visible de las mismas. La isoforma de MsrB con Fe²⁺ presenta un pico de absorción a 350 nm y la isoforma con Co²⁺, muestra un pico a 375 nm y otro a 485 nm.

Tabla 11 | Determinación de cobalto, hierro y zinc por espectrometría de absorción atómica. Los metales fueron cuantificados en alícuotas de las diferentes versiones de *LinMsrBΔ35N*. Las proteínas recombinante fueron obtenidas a partir de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con [pET22/*LinMsrBΔ35N*] y crecidas tanto en M9 como en LB. En el medio M9 se crecieron en ausencia o presencia de cada uno de los metales indicados.

	En medio M9				En medio LB
	Fe ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺	sin Me ²⁺	sin Me ²⁺
Me/MsrB	0,30	0,28	0,39	< 0,005 (Zn ²⁺)	0,25 (Zn ²⁺) 0,03 (Fe ²⁺)

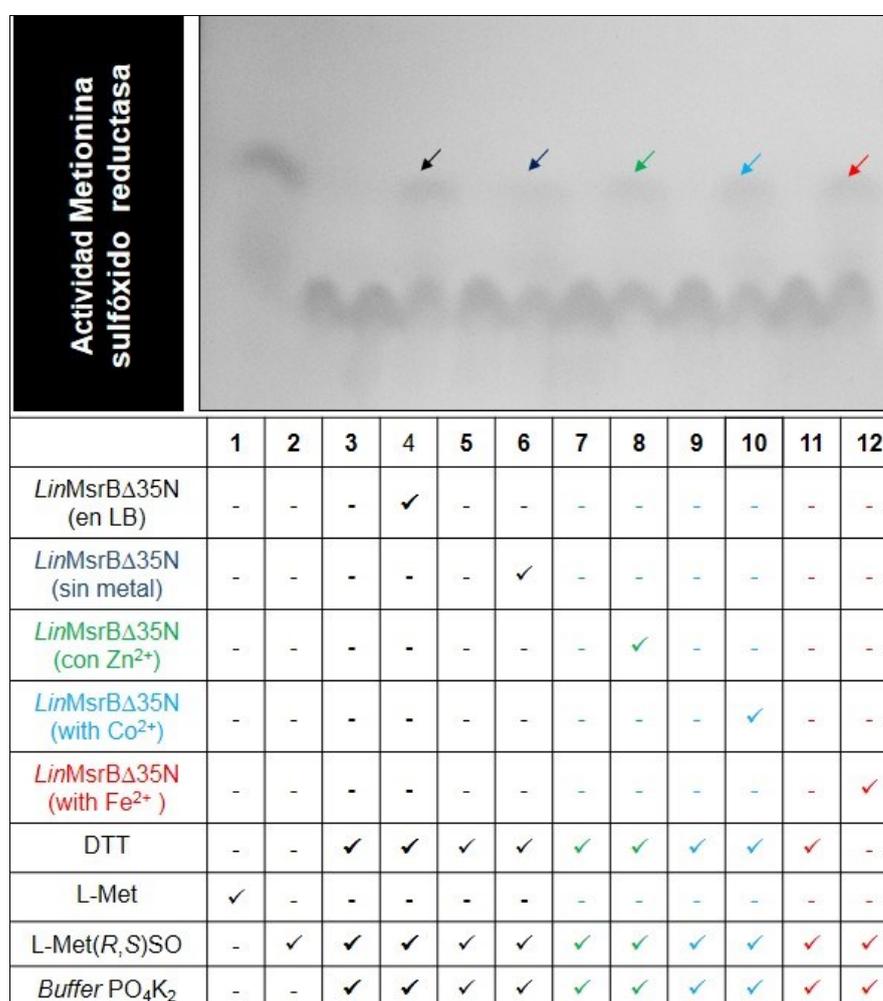


Figura 72 | Funcionalidad de las diferentes isoformas de *LinMsrBΔ35N*. Las mezclas de reacción se detallan en las tablas debajo de cada perfil de migración cromatográfico. La fase estacionaria empleada fue sílica recubierta en aluminio (Merk), y la fase móvil fue butanol: ácido acético: agua (60:15:25). La placa se reveló mediante espray de ninhidrina.

4.4.4. Caracterización cinética de *LinMsrB* Δ 35 y *LinMsrA2*

En la introducción se mencionó que los sustratos reductores naturales de MsrA o MsrB pueden ser tioles de baja masa molecular, como GSH, o proteínas tales como Trx o Grx. Tal como se ha inferido en los capítulos anteriores, *L. interrogans* presentaría, γ -GC y GSH como tioles de baja masa molecular. También, en el capítulo 2 se describió la existencia de un sistema Trx funcional. De acuerdo a esto y para poder evaluar la actividad biológica la *LinMsrB* Δ 35N y *LinMsrA2* de forma cuantitativa, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando un sistema acoplado. Este sistema enzimático permite seguir la reducción de MetSO, siguiendo la oxidación de NADPH a 340 nm. En una primera aproximación se decidió evaluar al sistema Trx como sistema acoplado. La cascada de óxido-reducción consta de las siguientes etapas: (i) reducción dependiente de NADPH de la TrxR, (ii) reducción de la Trx por la TrxR reducida, (iii) reducción de la Msr por la Trx reducida [Trx(SH)₂] y finalmente, (iv) reducción de la L-Met(R,S)SO por estas últimas (**Figura 73**). Sin embargo, en estas condiciones de reacción sólo *LinMsrA2* fue funcional. Los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima variando la concentración de cada sustrato de forma independiente se listan en la **Tabla 12**. Los valores obtenidos señalan que la *LinMsrA2* emplea el sistema Trx como reductor fisiológico, y alternativamente, como sustratos, N-Acetil-MetSO y L-Met(R,S)SO, con la misma eficiencia catalítica ($1,3 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y $1,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente). La *LinMsrA2* exhibió una cinética de saturación de tipo Michaelis-Menten tanto para la *LinTrx* como para el sulfóxido sustrato. Los parámetros cinéticos calculados se muestran en la **Tabla 12**.

En vista de que el sistema Trx no presentó capacidad de reducir a la *LinMsrB* Δ 35N, fue necesario ensayar otros sistemas reductores (para poder determinar la actividad enzimática cuantitativamente). Existen antecedentes de que las Grx pueden reciclar de manera eficiente tanto la MsrA como la MsrB que presenten o carezcan de Cys resolutivas (Vieira Dos Santos, C. y col. 2007; Tarrago, L. y col. 2009) (Lee, E.H. y col. 2015). Sin embargo, ambas Msrs (MsrA y MsrB) de 1-Cys suelen ser reducidas preferencialmente por las Grx en lugar de las Trx (Vieira Dos Santos, C. y col. 2007; Tarrago, L. y col. 2009; Lee, E.H. y col. 2015). De acuerdo con lo expuesto, se ensayó como posible reductor de *LinMsrB* Δ 35N (en sus distintas isoformas) al sistema GSH/Grx (utilizando una Grx promiscua, la *HsaGrx* de humanos). En este sistema reductor la regeneración del GSH fue mantenida a expensas de la GR de *S. cerevisiae*, en

una reacción dependiente de NADPH (Figura 73). Como se puede observar a partir de los datos presentados en la Tabla 12 y Tabla 13, las diferentes isoformas de *LinMsrBΔ35N* (con los diferentes iones metálicos) mostraron eficiencias de catálisis similares respecto a la reducción de L-Met(R,S)SO (empleando *HsaGrx* y GSH como reductores). Es importante remarcar que la eficiencia catalítica de la *LinMsrBΔ35N* obtenida es un orden de magnitud inferior a la presentada por *LinMsrA2* por el mismo sustrato. Esto fue similar a lo reportado para otras Msrs de otros organismos (Lee, B.C. y col. 2011; Drazic, A. y col. 2014).

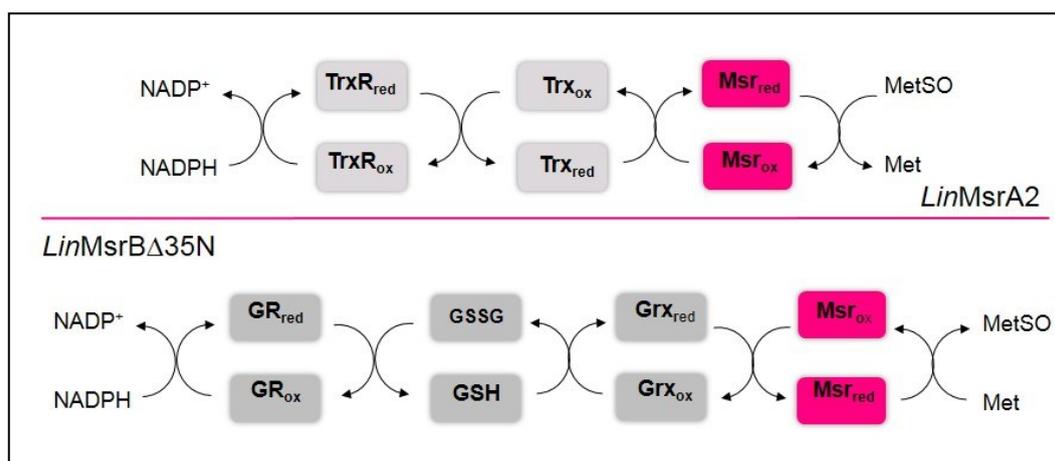


Figura 73 | Flujo de transferencia de electrones en la reducción de MetSO por la *LinMsrA2* y la *LinMsrBΔ35N*. La primera enzima es reciclada por el sistema Trx, mientras que la segunda emplea el sistema dependiente de GSH.

Tabla 12 | Parámetros cinéticos aparentes de las *LinMsrs*. Se trabajó a pH 7,0 y a 30°C.

Sustrato	Co-Sustrato	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
<i>LinMsrBΔ35N</i>				
L-Met(R,S)SO	<i>HsaGrx</i> 25 μM	1600 \pm 30	0,108 \pm 0,008	1,1
<i>LinMsrA2</i>				
L-Met(R,S)SO	<i>LinTrx</i> 20 μM	700 \pm 60	5,7 \pm 0,2	1,4 $\cdot 10^2$
<i>LinTrx</i>	L-Met(R,S)SO 5 mM	1,9 \pm 0,1	4,8 \pm 0,1	4,2 $\cdot 10^4$
N-acetil-Met(R,S)SO	<i>LinTrx</i> 20 μM	1500 \pm 100	11,6 \pm 0,6	1,3 $\cdot 10^2$

Tabla 13 | Eficiencia catalítica para la etapa de reducción de sustrato por las diferentes isoformas de *LinMsrBA35N*. Se trabajó a pH 7,0 y a 30 °C.

	Co-Sustrato	Sustrato	$k_{cat} \cdot K_m^{-1}$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
<i>LinMsrBA35N</i>			1,1
<i>LinMsrBA35N</i> (-Me ²⁺)			5,4.10 ⁻²
<i>LinMsrBA35N</i> (Co ²⁺)	<i>HsaGrx</i> 25 μ M	L-Met(R,S)SO	1,2
<i>LinMsrBA35N</i> (Zn ²⁺)			1,5
<i>LinMsrBA35N</i> (Fe ²⁺)			1,9

Con el objeto de corroborar la hipótesis de que sólo una de las cinco Cys presentes en la secuencia primaria de *LinMsrBA35N* está involucrada en la formación del ácido sulfénico (MsrB-SOH, intermediario del ciclo catalítico), se realizó una evaluación de la presencia de este grupo post-tratamiento de la proteína con MetSO. Brevemente, luego del tratamiento de la proteína se la incubó con 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-HCl). Los aductos formados entre el NBD y los grupos R-SH o R-SOH, presentan un pico de absorción característico a 420 nm y 350 nm, respectivamente. Para el cálculo de las Cys en cualquiera de sus dos estados, se empleó un coeficiente de extinción molar de 13 mM⁻¹. cm⁻¹ (Furdui, C.M. y col. 2014). Este ensayo permitió poner en evidencia que sólo una Cys se haya en estado de tiol accesible (posiblemente que no se encuentra unido al ión metálico) en la enzima, mientras que las otras cuatro estarían involucradas en la coordinación del ión metálico. Por el contrario, luego del tratamiento de la proteína con L-Met(R,S)SO un 50% de la proteína presenta una Cys en forma de ácido sulfénico (resultados no mostrados). La presencia de una Cys como ácido sulfénico (R-SOH) en *LinMsrBA35N* es posible de detectar ya que es más estable debido a la ausencia de una Cys resolutive en la misma. El análisis de estos resultados confirma que sólo una Cys está implicada en la reacción con MetSO, en concordancia con lo predicho por análisis de su secuencia primaria.

Finalmente, y con el fin de estudiar en mayor detalle la reactividad de *LinMsrBA35N* se propuso realizar diferentes ensayos *in vitro*. Se ha informado que el tio-nitro-benzoato (TNB) es un reductor no fisiológico que ha permitido reducir el intermediario ácido sulfénico formado luego de la oxidación de tioles en el ciclo de

catálisis de diferentes proteínas, tales como la 1-Cys AhpE de *Mycobacterium tuberculosis* (Turell, L. y col. 2008; Hugo, M. y col. 2009). A partir del ensayo de reducción de *LinMsrB* Δ 35N-SOH empleado TNB como reductor, se estimaron constantes cinéticas de segundo orden que indican que la etapa de formación del disulfuro mixto entre la MsrB-SOH (en forma de sulfénico) y el TNB es más rápida ($k = 2167 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) que la etapa de reducción del disulfuro mixto MsrB-S-S-TNB (generado por acción de una segunda molécula de TNB) para generar MsrB-SH (la forma de tiol) y DTNB ($k = 48 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figura 74). Desde el punto de vista cinético, estos datos sugieren la necesidad de catálisis de modo que la reducción del disulfuro mixto ocurra más rápido. Esto explicaría la necesidad de la presencia de Grx durante la etapa de reciclaje reductivo de *LinMsrB* Δ 35N mediado GSH.

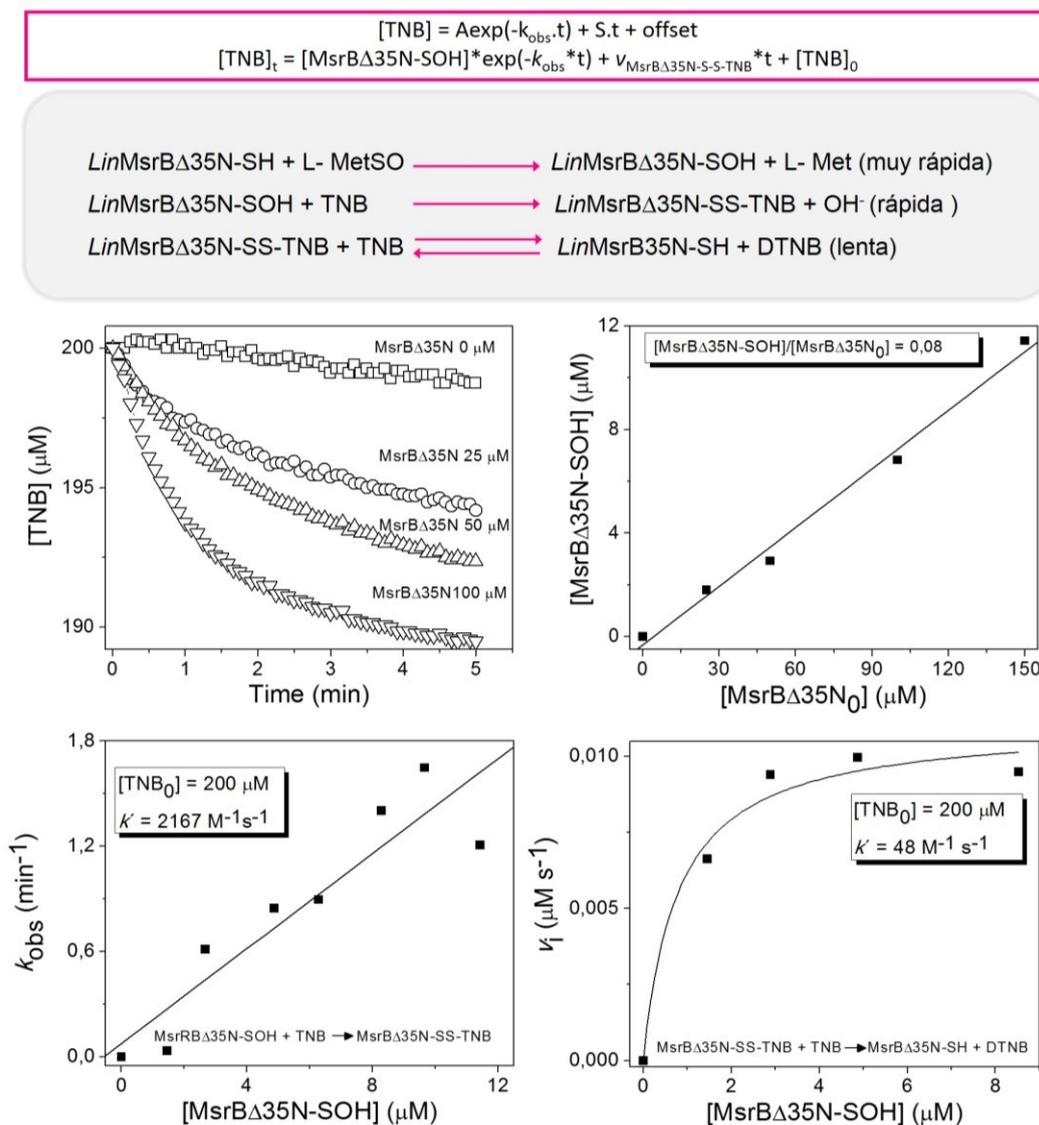


Figura 74 | Reducción de *LinMsrB* Δ 35N-SOH por TNB. La disminución de la concentración de TNB fue registrada a 405 nm, 30 °C y pH 8,0.

4.4.5. Reversión de la inactivación de la *Lincatalasa* causada por HClO

Existen numerosos antecedentes que informan que tanto los residuos de Cys como los de Met son los principales aminoácidos susceptibles a ser afectados como consecuencia del estrés oxidativo (Drazic, A. y col. 2014). Además, los residuos de Met en particular tienen alta reactividad frente a el HClO (Peskin, A.V. y col. 2009; Drazic, A. y col. 2014). La oxidación de Met genera MetSO, lo cual puede generar cambios en la polaridad superficial y un consecuente mal plegado de las proteínas. Esos cambios estructurales en muchos casos se acompañan con pérdidas en la funcionalidad de las proteínas (Drazic, A. y col. 2014). Las Msrs son capaces de reparar reductivamente la MetSO a Met. En el capítulo 1 se detectó que la *Lincatalasa* se inactivaba en presencia de HClO. De acuerdo a esto, los cambios estructurales observados podrían ser resultado de la oxidación en sus residuos de Met, y dicho efecto podría ser revertido por alguna de las Msrs de la bacteria aquí estudiadas. Para responder esta hipótesis se propuso realizar un ensayo *in vitro*, en el cual se incubó la *Lincatalasa* con el HClO, y posteriormente se incubó la mezcla anterior con diferentes concentraciones de *LinMsrBA35N*. Luego de esta incubación se determinó la actividad catalasa resultante. Es importante aclarar que de las Msrs estudiadas se ensayó solamente la MsrB ya que según lo obtenido en el apartado 4.4.2 (y con los predictores) ésta sería de localización periplasmática, y por lo tanto la única de las Msrs que colocalizaría (teóricamente) con la *Lincatalasa*. En el gráfico de la **Figura 75** se puede observar que en presencia de *LinMsrBA35N* la *Lincatalasa* recuperó entre un 20-25 % de actividad. Este resultado señala que una parte de la inactivación observada por la enzima sería a expensas de la oxidación de sus residuos de Met. Esto fue similar a lo observado para el caso de la catalasa de *H. pylori* (Alamuri, P. y col. 2006; Mahawar, M. y col. 2011; Kuhns, L.G. y col. 2013), donde la exposición a HClO causa oxidación de sus residuos de Met y en consecuencia cambios estructurales y pérdida de su actividad. De este modo, y el bajo porcentaje en la recuperación de la funcionalidad de la *Lincatalasa* se debería a la especificidad de cada una de las Msrs para uno solo de los isómeros.

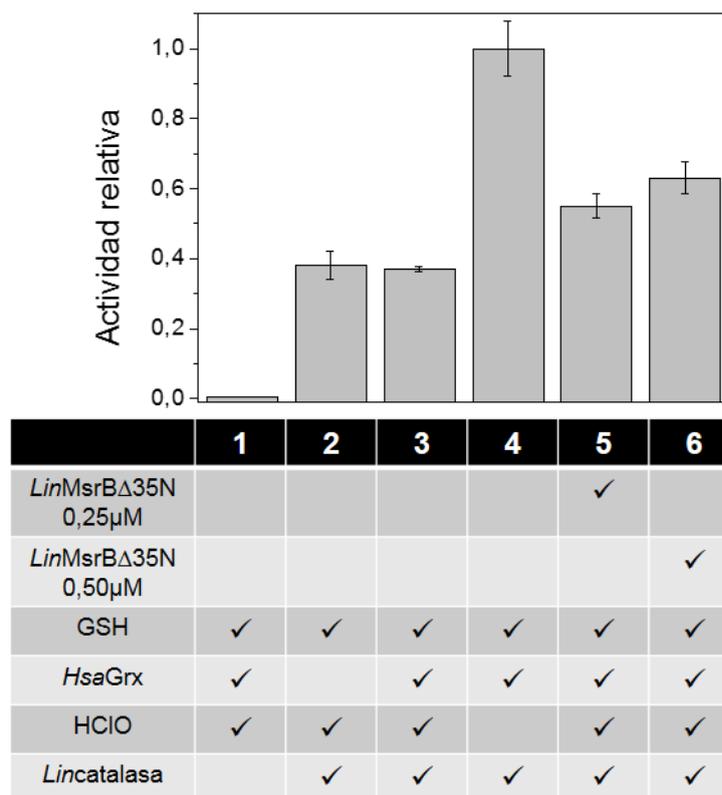


Figura 75 | Ensayo de recuperación de la *Lincatalasa*. La enzima fue sujeta a dos incubaciones sucesivas a 30°C y pH 7,0. En primer lugar se incubó con HClO, luego junto a dos cantidades de MsrB, y finalmente se midió actividad catalasa siguiendo el consumo de H₂O₂ a 240 nm. Como reductor de la MsrB se empleó el par redox GSH/Grx. Las actividades se informaron como relativas a la actividad de la catalasa en ausencia de Msr y HClO (barra 4).

4.4.6. Ensayos de complementación en levaduras

4.4.6.1. Evaluación de la funcionalidad *in vivo* de las Msrs

Para poder evaluar la funcionalidad de las *LinMsrs* (*LinMsrA1*, *LinMsrA2* y *LinMsrB*Δ35N) *in vivo*, se realizaron ensayos de complementación de las levaduras. El marco abierto de lectura de cada una de las Msrs fue clonado en el vector p425-GPD (Mumberg, D. y col. 1995). Las construcciones fueron introducidas en células de *S. cerevisiae* GY202 deficientes en los genes codificantes para los tres tipos de Msr (*MATa his3 leu2 met15 ura3 ΔmsrA:URA3 ΔmsrB::KAN ΔfRmsr::HIS3*) (Le, D.T. y col. 2009). Estas células de levaduras son auxótrofas para los aminoácidos Leu y Met, es decir, son incapaces de sintetizar dichos aminoácidos y requieren de una fuente externa de los mismos. No obstante al transformar las células con el vector p425-GPD, la auxotrofia por Leu es revertida. Los ensayos de complementación se realizaron en

medio mínimo SD agarizado, en presencia de L-Met o L-Met(R,S)SO. Como control se utilizó la misma cepa de levadura transformada con el p425-GPD sin insertos. Los resultados obtenidos mostraron que las cepas de *S. cerevisiae* GY202 complementadas con cada una de las Msrs de *L. interrogans*, así como el control negativo desarrollaron en un medio que contenía L-Met. Cuando la L-Met se reemplazó por la mezcla racémica de L-Met(R,S)SO, sólo proliferaron los clones complementados con los genes codificante para *LinMsrA1*, *LinMsrA2* y *LinMsrBΔ35N*. Este resultado demuestra que las tres enzimas presentan actividad reductasa sobre L-MetSO *in vivo* (**Figura 76**). En adición, la actividad de la *LinMsrA1* y *LinMsrA2* (no así para *LinMsrBΔ35N*) pudo evidenciarse en la placa en la cual se sustituyó L-Met por L-Met(S)SO, donde se observó crecimiento de las levaduras recombinantes (**Figura 76**). Contrariamente, cuando se utilizó L-Met(R)SO se registró proliferación únicamente del clon complementado con el gen codificante para *LinMsrBΔ35N*, no detectándose crecimiento de ninguno de los clones complementados con las MsrA. Así mismo, no se detectó crecimiento de la cepa control en las tres condiciones ensayadas con L-MetSO racémico, L-Met(R)SO o L-Met(S)SO (**Figura 76**). Mediante este ensayo *in vivo*, los resultados obtenidos confirman la funcionalidad de las tres Msrs descritas en el proyecto genoma de *L. interrogans* así como también sus selectividades y especificidades por cada uno de los isómeros. Curiosamente, se puede inferir que pese a no haberse obtenido *LinMsrA1* en forma recombinante y caracterizado cinéticamente *in vitro*, la secuencia génica amplificada por PCR codificaría para una MsrA funcional.

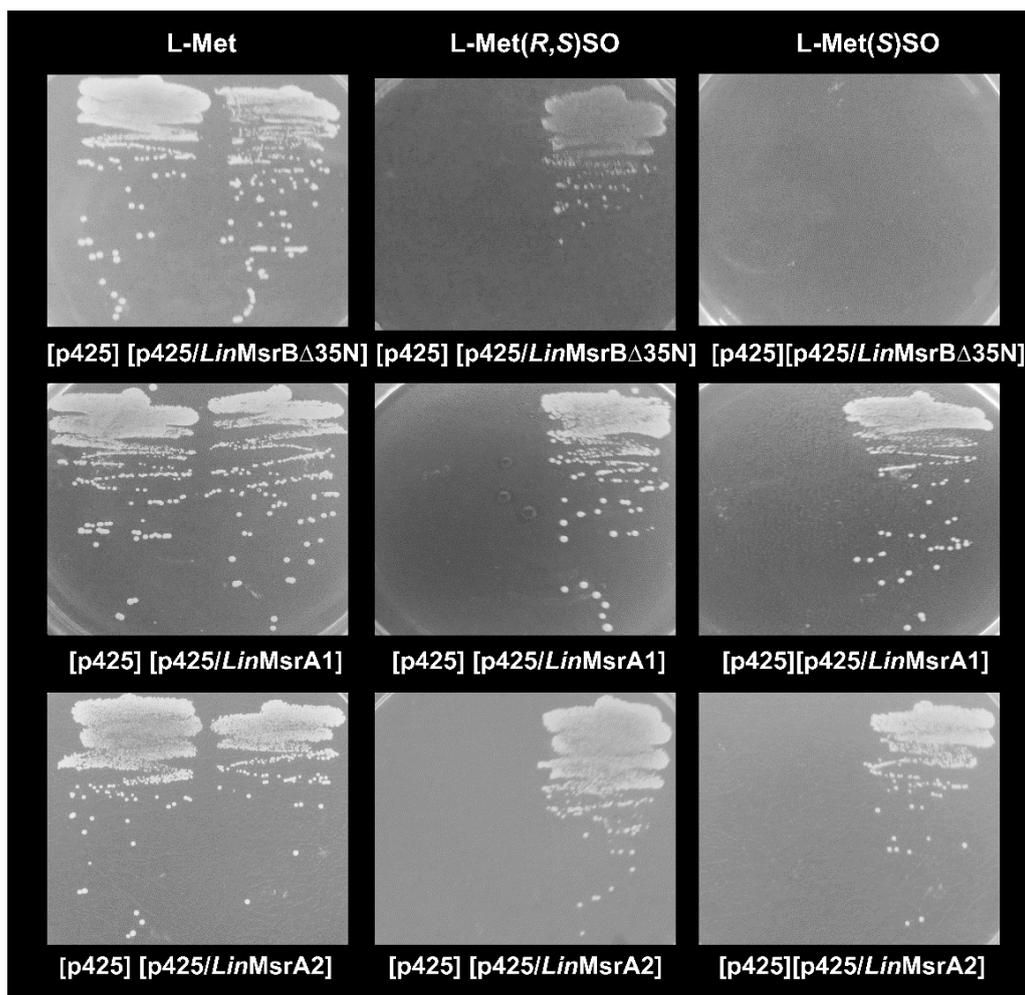


Figura 76 | Funcionalidad de las *LinMsrs* *in vivo*. La cepa GY202 fue transformada con el plásmido p425-GPD vacío, con [p425/*LinMsrB*Δ35N], con [p425/*LinMsrA1*] y con [p425/*LinMsrA2*]. Las células se depositaron en placas de SD-agar (medio definido), conteniendo L-Met 100 μ M, L-Met(R,S)SO 100 μ M o L-Met(S)SO 100 μ M. Los inóculos se normalizaron a 5.10^6 cel.mil⁻¹ e incubaron a 28 °C entre 48-72 h. Todas las cepas recombinantes crecieron con L-Met, sin embargo sólo fueron capaces de desarrollar en presencia de L-Met(R,S)SO aquellas que contenían el transgen de las Msr. En presencia del isómero S de MetSO sólo desarrollaron las cepas transformadas con ambas MsrA.

4.4.6.2. Evaluación de la sensibilidad de las levaduras recombinantes en condiciones de estrés

Con el fin de profundizar sobre la funcionalidad de las Msr de leptospira *in vivo*, se propuso evaluar la sensibilidad de las distintas levaduras recombinantes frente a condiciones de estrés oxidativo. A diluciones seriadas (por factores múltiples de cinco) de las suspensiones celulares (la densidad celular de cada cepa fue normalizada de acuerdo al número de células vivas empleando azul de metileno como colorante vital) se las sembraron en placas de SD-agar a las cuales se les adicionaron HClO o H₂O₂ en

concentraciones de 0,1 o 1 mM (homogénea en el volumen de agar). La cepa parental de *S. cerevisiae* W303-1B (la cual tiene las tres Msrs endógenas) transformada con el plásmido p425-GPD vacío fue empleada como control positivo. Por el contrario, como control negativo se empleó la cepa GY202 (triple mutante) transformada también con el plásmido p425-GPD vacío. Como se expone en el panel de la **Figura 77** en presencia de H₂O₂ 0,1 mM todas las cepas mostraron desarrollo, inclusive la triple mutante sin complementar. En presencia de diez veces más de ese agente, las cepas de levaduras transformantes con *LinMsrA1* y con *LinMsrA2* presentaron mayor desarrollo que la triple mutante (GY202 [p425-GPD]) pero un poco menor que la parental (W303-1B [p425-GPD]). En presencia de ambas concentraciones ensayadas de HClO la cepa de levadura transformada con la *LinMsrA1* proliferó más que las otras restantes, aún más que la parental. Este resultado refuerza lo observado previamente, de que el gen para *LinMsrA1* codifica para una proteína funcional y que la misma podría tener importantes funciones antioxidantes. También fue observado el desarrollo de la cepa transformante con la *LinMsrA2* con concentraciones de 0,1 mM de HClO, aunque su crecimiento fue notablemente menor respecto a la parental. En contraparte, la GY202 [p425/*LinMsrB*Δ35N] sólo creció con la menor concentración de H₂O₂ analizada, lo que podría indicar una menor capacidad antioxidante frente a este estresor, respecto a la tolerancia que exhibida por las *LinMsrAs*.

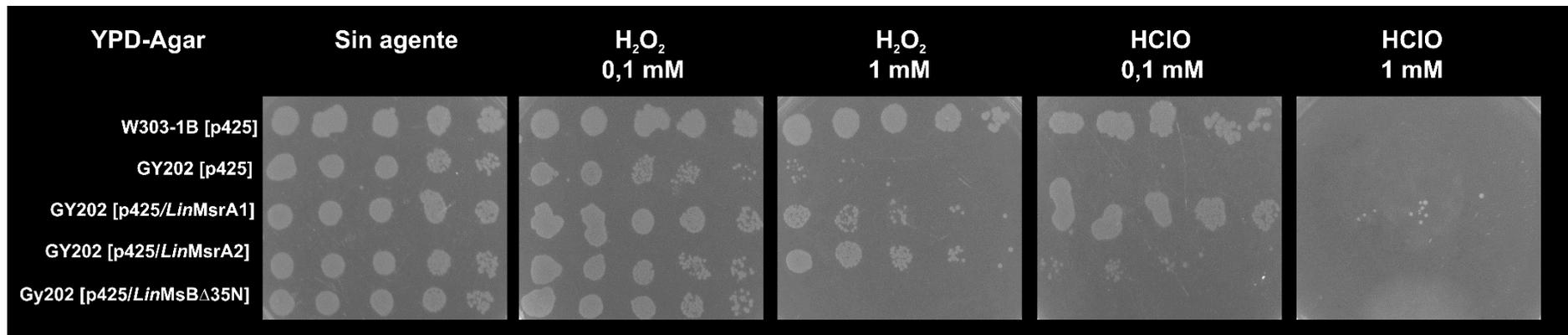


Figura 77 | Sensibilidad de las cepas de *S. cerevisiae* recombinantes frente a agentes oxidantes exógenos. La cepa parental W303-1B de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido p425-GPD vacío, y la cepa GY202 (triple mutante) transformada con el plásmido p425-GPD vacío, con [p425/*LinMsra1*] y con [p425/*LinMsra2*], se normalizaron ($5 \cdot 10^6$ cel.ml⁻¹) e incubaron a 28 °C por 1 h en presencia o ausencia de los agentes oxidantes, H₂O₂ y HClO. Cumplido ese tiempo se realizaron diluciones seriadas 1/5 y finalmente, 10 µl de cada dilución se depositaron en YPD agar (medio complejo) donde se incubaron a 28 °C entre 48 a 72h.

4.4.7. Discusión

Existen enzimas capaces de eliminar EROs antes de que ocurra el daño celular, entre las que se incluyen la catalasa, AhpC y hemo oxigenasa. Además, se ha mencionado el uso de moléculas pequeñas, tales como el GSH, vitaminas, etc., como compuestos con la capacidad de secuestrar EROs (Ezraty, B. y col. 2005). Sin embargo, pese a esas barreras antioxidantes el daño puede ocurrir, y otra estrategia de la que disponen las células para contrarrestar esta situación adversa, es reparar las moléculas dañadas (Romsang, A. y col. 2013). En este último mecanismo, las Msrs son las proteínas encargadas de revertir la oxidación de residuos aminoácidos de Met libres o unidos a proteínas. Mientras las MsrA son específicas para los isómeros S de MetSO, las MsrB los son para los isómeros R (Ezraty, B. y col. 2005; Romsang, A. y col. 2013). En general se ha descrito que ambas enzimas presentan mayor especificidad por los isómeros unidos a proteínas que para los libres (Lee, B.C. y col. 2011).

La especificidad de ambas Msrs (*LinMsrBA35N* y *LinMsrA2*) de *L. interrogans* por cada uno de los isómeros fue evidenciada *in vitro* mediante los ensayos de TLC.

También esa estereoselectividad se evidenció *in vivo* a través de ensayos de complementación en una cepa de levadura mutante en los tres tipos de Msrs endógenas. La caracterización cinética de la *LinMsrA2* ha mostrado eficiencias de catálisis para L-Met(S)SO dentro del orden a las informadas de otras fuentes (Boschi-Muller, S. y col. 2001; Boschi-Muller, S. y col. 2005; Rouhier, N. y col. 2007; Arias, D.G. y col. 2011). Se determinó que el reciclaje de esta enzima es llevado a cabo por la *LinTrx*, similar a lo descrito para la mayoría de las MsrA y MsrB, respectivamente (Olry, A. y col. 2004; Boschi-Muller, S. y col. 2005; Olry, A. y col. 2005). Se ha descrito en la literatura, que las MsrA que presentan dos residuos de Cys catalíticos (en general cada uno se presenta en extremos opuestos de su estructura primaria) y cuando reaccionan con la MetSO, forman un puente disulfuro intramolecular. Esto genera una estructura más compacta, disminuyendo su volumen específico con el consecuente retraso en su movilidad electroforética (Arias, D.G. y col. 2011; Saunders, C.C. y col. 2012). Alternativamente, ha sido reportada la sucesiva formación de un puente disulfuro con la posterior isomerización del mismo para las MsrA que poseen tres residuos de Cys catalíticamente activos. Esto ocurre durante el mecanismo de regeneración (favoreciendo su reciclaje a expensas de la Trx)(Boschi-Muller, S. y col. 2001; Tossounian, M.A. y col. 2015). El primero es formado

entre la Cys catalítica y una de las Cys resolutivas, mientras que el segundo es formado entre ambas Cys resolutivas (Tarrago, L. y col. 2009; Kantorow, M. y col. 2012). Contrariamente con estos antecedentes, en los SDS-PAGE no reductores no se pudo observar cambios en la movilidad electroforética de la *LinMsrA2* en presencia de MetSO. Este resultado podría sugerir, *a priori*, la ausencia de puentes disulfuros intramoleculares y/o intermoleculares durante el ciclo de catálisis de la misma. No obstante, y como se presentó en la **Figura 65**, esta proteína podría presentar una Cys resolutiva alterna (Cys¹²) a la Cys resolutiva conservada en casi todas las MsrA (Cys¹⁹⁵). En vista de esto, se podría hipotetizar que en realidad la Cys resolutiva es la Cys¹² y dado que son Cys vecinales (distanciadas por dos residuos) con la Cys nucleofílica, no se observa cambio en el perfil electroforético ya que no se afectaría marcadamente el radio hidrodinámico de la proteína. Como propuesta a futuro de esta Tesis, se propone la generación de una mutante en la Cys¹² para corroborar esta hipótesis.

La *LinMsrA2* mostró una cinética de saturación tipo Michaelis-Menten, presentando una eficiencia de catálisis menor para la etapa de reducción de la L-Met(*R,S*)SO que para la oxidación de la *LinTrx*. Esto indicaría que la etapa lenta en el ciclo catalítico de esta enzima es la reducción de L-Met(*R,S*)SO. Un comportamiento similar ha sido reportado por otros autores para la MsrA de *E. coli* (Boschi-Muller, S. y col. 2001) y la MsrB de *Neisseria meningitidis* (Olry, A. y col. 2004), entre otros.

Los resultados obtenidos sobre la caracterización funcional de *LinMsrBΔ35N* indicarían que la proteína no muestra formación de disulfuros intramoleculares durante su ciclo de catálisis. Esto concuerda con el análisis de su secuencia primaria donde sólo un residuo de Cys (diferente a los que forman el centro metálico) se haya presente. Esta observación se la ha relacionado con la formación de ácido sulfénico estable luego de la oxidación por MetSO sustrato (a través de la titulación con NBD y a los ensayos realizados con TNB). Esto último ha sido reportado para MsrBs de 1-Cys presentes en otros organismos, lo cual se lo atribuyó a la ausencia de una Cys resolutiva (Tarrago, L. y col. 2009). El reciclaje de ese intermediario sulfénico estable, es el paso limitante en el proceso de regeneración de la Msr oxidada, motivo por el cual resulta de sumo interés la identificación de un sistema reductor en la bacteria que permita que esta reacción ocurra de un modo más eficiente. A modo de hallar un posible candidato en esta etapa, se avanzará en la caracterización de la Grx de

L. interrogans como posible reductor fisiológico de esta proteína. Esto se describirá en el capítulo siguiente.

Alternativamente, se ha descrito que la sustitución de los residuos de Cys (por mutagénesis) que forman el centro metálico en la MsrB de *E. coli* se acompañaron de cambios estructurales con la consecuente pérdida en su actividad Msr (Boschi-Muller, S. y col. 2005). Por el contrario, la sustitución de Zn^{2+} por Co^{2+} en la MsrB1 de mamíferos, generó una proteína con similares niveles de actividad Msr, en concordancia con una similitud estructural de las isoformas obtenidas (Shumilina, E. y col. 2014). No obstante, la presencia del metal podría contribuir al correcto plegamiento de la proteína. Esto puede inferirse dado que las isoformas de *LinMsrBΔ35N* que presentan iones metálicos sustituidos presentan eficiencias catalíticas similares entre sí. Esto se haya en contraposición a la enzima obtenida en ausencia de iones metálicos, la cual presentó la menor eficiencia de catálisis para la reducción de MetSO con respecto a las isoformas que presentaron iones metálicos.

Mediante ensayos cinéticos en estado estacionario, se pudo determinar que el reciclaje catalítico de *LinMsrBΔ35N* oxidada sería realizado principalmente por acción de GSH/Grx (y no por el sistema Trx como se observó para *LinMsrA2*). Esta especificidad de la *LinMsrBΔ35N* por el par redox GSH/Grx fue el punto de partida para comenzar a estudiar las Grx endógenas. En adición a esto, nuevamente se reafirma la idea de que la bacteria tiene un metabolismo dependiente de GSH funcional, y que dicho metabolito sería el que officiaría como *buffer* redox. Esta característica la diferencia de otros organismos patógenos de la familia Leptospiraceae tales como *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi* (Boylan, J.A. y col. 2006) los cuales no presentan un metabolismo dependiente de GSH. En esos patógenos, por lo tanto, no han sido identificadas genes codificantes para Grxs (Parsonage, D. y col. 2010). En adición, los resultados obtenidos interconectan ambas redoxinas en el reciclaje de sendas Msrs, cuya acción conjunta es necesaria para revertir en forma completa la oxidación de residuos de Met.

De manera interesante, y a pesar que la *LinMsrBΔ35N* no fue capaz de reducir el N-Acetil-Met(*R,S*)SO (forma de la MetSO que emula la presencia de un enlace peptídico), se observó que esta Msr pudo revertir parcialmente la inactivación de *Lincatalasa* por el HClO. Esto sugiere que la *LinMsrBΔ35N* posee capacidad de regenerar las Met oxidadas en proteínas. Esa parcialidad en la reversión de la inactivación de la actividad catalasa puede deberse a la necesidad de la acción combinada de Msr y chaperonas (como GroEL). Esto fue previamente descrito en

H. pylori, donde se recuperó significativamente la actividad de la catalasa por la acción conjunta de Msr y chaperonas (Alamuri, P. y col. 2006; Mahawar, M. y col. 2011; Kuhns, L.G. y col. 2013). Debido a que, por ensayos de recuperación de la actividad catalasa *in vitro* y al fraccionamiento celular, sería posible especular que estas proteínas serían interactores *in vivo*.

La *LinMsrBA35N* también fue capaz de reducir la L-Met(*R,S*)SO libre, aunque con una eficiencia de catálisis menor a la de la *LinMsrA2*. Esto último es consistente con lo informado en la bibliografía para estos dos tipos de enzimas (Lee, B.C. y col. 2011). La eficiencia de catálisis que muestra la *LinMsrBA35N* por la L-Met(*R,S*)SO sería de marcada importancia para la bacteria ya que no ha sido identificada en su genoma una secuencia codificante para una proteína del tipo *freeMsr*. La *freeMsr*, identificada en organismos unicelulares como bacterias y levaduras, presenta elevada especificidad, por el isómero *R* de MetSO libre, y de esa manera compensa la baja actividad que las *MsrB* muestran (en general) por ese sustrato, permitiendo una eficiente recuperación de la Met oxidada (Le, D.T. y col. 2009; Lee, B.C. 2010).

Con el fin de realizar evaluaciones de la funcionalidad de estas proteínas *in vivo*, se realizaron ensayos de complementación en levaduras mutantes. Los resultados de estos ensayos mostraron que aquellas levaduras recombinantes complementadas con los genes codificantes para Msr de leptospira presentaron capacidad de desarrollar en presencia de MetSO. Esto indica que las tres proteínas son funcionales *in vivo*. No obstante, la levadura complementada con *LinMsrA2* fue más tolerante frente a agentes oxidantes exógenos que las complementadas con *LinMsrA1* o *LinMsrBA35N* (principalmente). Esto último es consistente con lo descrito para otros organismos (Ezraty, B. y col. 2005; Dhandayuthapani, S. y col. 2009; Romsang, A. y col. 2013).

En virtud de los análisis realizados, se podría considerar que ambos tipos de Msr son necesarias para sobrellevar el daño causado por una situación de estrés oxidativo. Por lo tanto, esto sugiere que estas proteínas estarían relacionadas con la virulencia de *L. interrogans*, en concordancia a lo que ha sido reportado para otras bacterias patógenas (Sasindran, S.J. y col. 2007). En conclusión, la interacción de las proteínas aquí descritas sería de relevancia para que la bacteria pueda sobrellevar la situación de estrés oxidativo, convirtiéndose, además, en posibles indicadores de la patogenicidad bacteriana.

CAPÍTULO 5: Estudios de funcionalidad de una glutaredoxina ditiólica y una monotiólica de *L.interrogans*

4.5.1. Obtención recombinante de una glutaredoxina ditiólica y una glutaredoxina monotiólica de *L. interrogans*

El genoma de *L. interrogans* presenta genes codificantes para una glutaredoxina ditiólica (*Lin2CGrx*) y una glutaredoxina monotiólica (*Lin1CGrx*). La primer Grx, presenta un sitio activo compuesto por los residuos CPYC (**Figura 78**). Ese sitio activo ha sido descrito como el sitio activo canónico para las Grxs ditiólicas estudiadas en una vasta cantidad de organismos (Lillig, C.H. y col. 2008). Por lo tanto esta Grx de *L. interrogans* podría considerarse dentro de las “Grx clásicas” desde este punto de vista. La Cys N-terminal (en posición 9, en el caso de la *Lin2CGrx*), se predice como la Cys reactiva o nucleofílica como en otros miembros de la familia Trx (Discola, K.F. y col. 2009). Se ha descrito que el residuo de Pro ubicado en el motivo canónico de las Grx favorece la estabilidad del anión tiolato formado por la Cys N-terminal. Finalmente, la Cys en la posición 12 es predicha como la Cys resolutive. Como se mencionó en la introducción, esta Cys resolutive es necesaria para la reducción de puentes disulfuros intramoleculares que ocurre por el mecanismo ditiólico, pero no es esencial para la función de las Grx mediante el mecanismo monotiólico, común a todas las Grx (Lillig y col., 2008). La segunda Grx, la *Lin1CGrx*, posee un sitio activo compuesto por los residuos CGFS (**Figura 78**). En base a la arquitectura de los dominios, las Grxs monotiólicas pueden clasificarse como proteínas simple dominio o como proteínas modulares (las cuales contienen uno o más dominios Grx monotiólica como arreglos multidominio) (Lillig, C.H. y col. 2008; Couturier, J. y col. 2015). Teniendo en cuenta esto, la *Lin1CGrx* se ubica dentro de las Grx simple dominio. Por otro lado, todas las Grxs (tanto ditiólicas como monotiólicas) han sido definidas por su capacidad de unir GSH en forma específica. Esta especificidad viene dada por la existencia de un sitio de unión (Lillig, C.H. y col. 2008; Couturier, J. y col. 2015). Los residuos involucrados en la unión de GSH, no son absolutamente idénticos entre las Grx ditiólicas y monotiólicas, sin embargo existen dos regiones conservadas próximas al sitio activo. Estas incluyen el motivo consenso TVP y el motivo GGXDD (Lillig, C.H. y col. 2008). Sin embargo, como puede observarse en el alineamiento de la **Figura 79**, *Lin2CGrx* sólo tiene VP del motivo TVP. En la posición de la Thr presenta una Asn, conservando la característica de ser polares. Curiosamente,

es ausente la región aminoacídica donde se ubicaría el motivo GG (**Figura 78**). Perfiles aminoacídicos similares fueron observados para 2CGrx de otras especies bacterianas incluidas en el alineamiento (a excepción de *E. coli*). Pese a estas diferencias respecto a los motivos consenso, la *Lin2CGrx* fue capaz de unir GSH y mostrar funcionalidad (esto se describirá en detalle más adelante en este capítulo). Contrariamente a la *Lin2CGrx*, *Lin1CGrx* presenta ambos motivos aminoacídicos, presentando una sustitución conservativa en el motivo TVP, donde cambia la Val por Ile. No obstante, se ha descrito una variabilidad en cuanto a este residuo para otras 1CGrx previamente informadas (Gallogly, M.M. y col. 2009; Stroher, E. y col. 2012). En adición, presenta el residuo Asp hacia el extremo C-terminal del motivo GG que también es altamente conservado en estas proteínas (**Figura 78**) (Gallogly, M.M. y col. 2009; Stroher, E. y col. 2012).

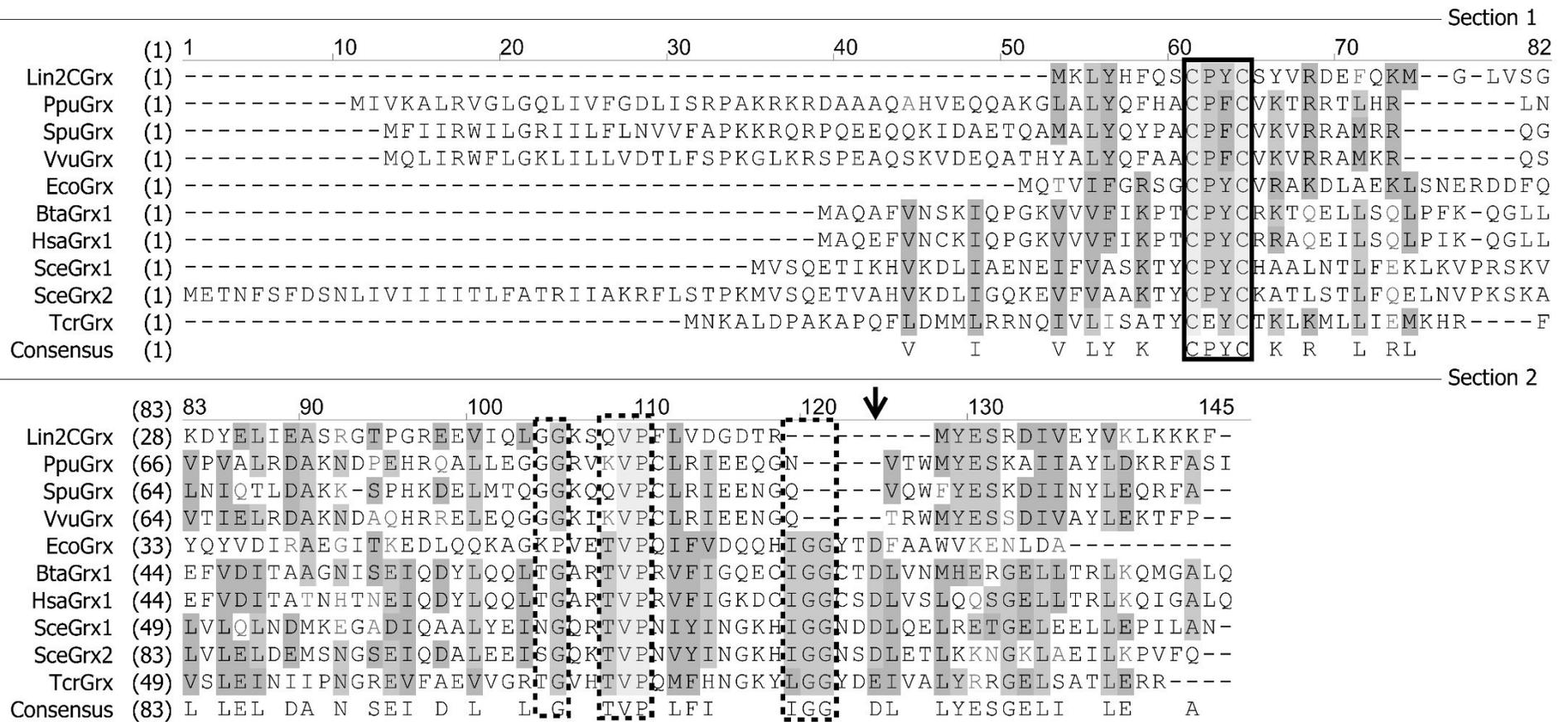


Figura 78 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Lin2CGrx con Grxs ditiólicas de otras fuentes. Las secuencias empleadas en el alineamiento corresponden a las Grxs de: *Pseudomona putida* (NCBI_WP_012313342.1), *Shewanella putrefaciens* (NCBI_WP_014610325.1), *Vibrio vulnificus* (NCBI_YP_004191212.1), la GrxA de *E. coli* (NCBI_EFJ65976.1), la Grx1 de *Homo sapiens* (NCBI_NP_002055.1), la Grx1 y Grx2 de *Sacharomyces cerevisiae* (NCBI_NP_009895.1 y NCBI_NP_010801.1), y la Grx de *Trypanosoma brucei* (NCBI_XP_813413.1). El recuadro en línea continua muestra el motivo redox activo CPYP y el cuadro en líneas de puntos muestra los motivos TVP y GG, involucrados en la interacción con GSH y conservados en diversas especies. Con flecha se indica un residuo de D bastante conservado entre diferentes especies y que también se cree participa en la unión de GSH. El alineamiento se realizó empelando el programa Vector NTI10.0.

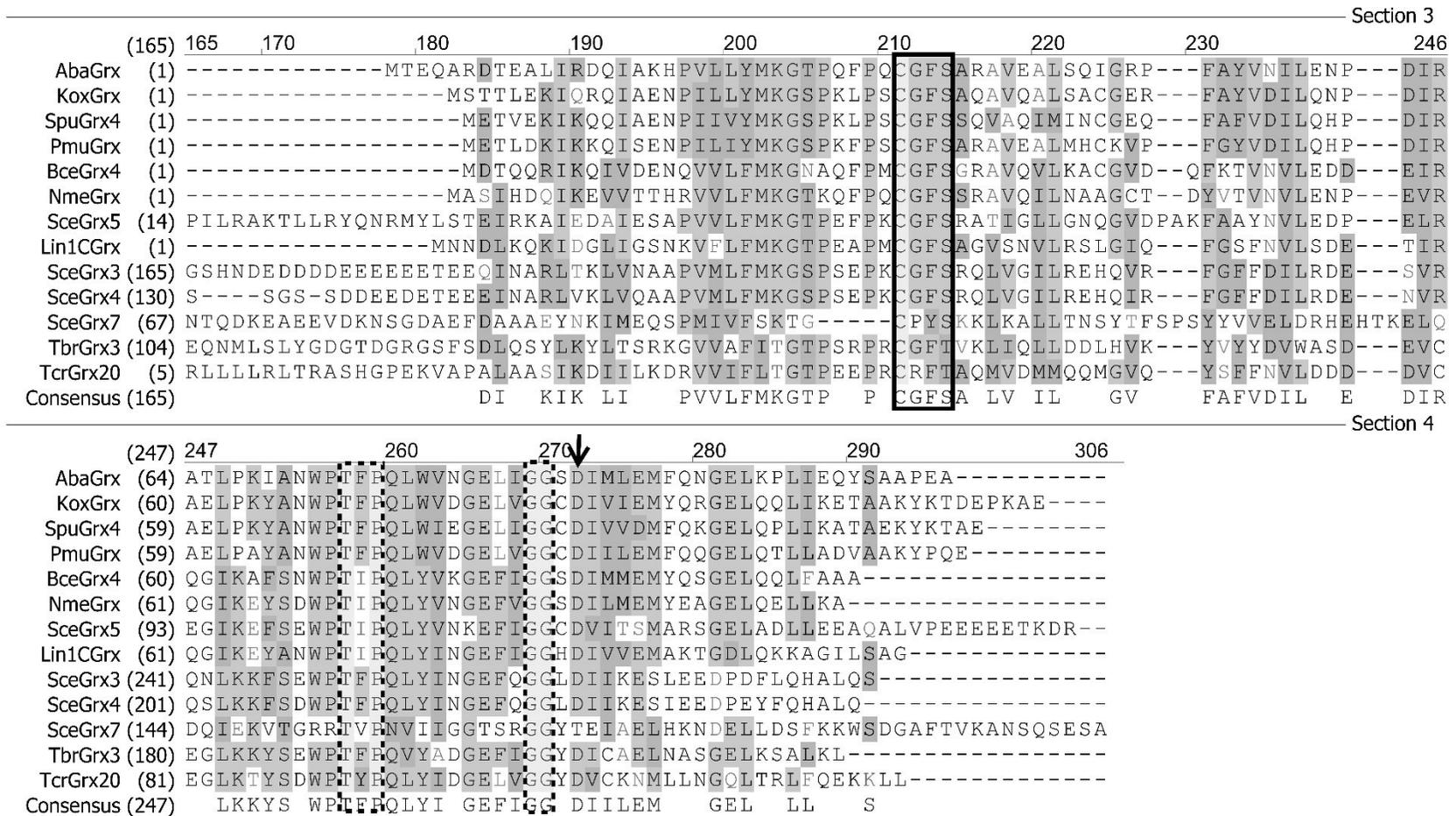


Figura 79 | Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Lin1CGrx con Grxs monotiólicas de otras fuentes. Las secuencias empleadas para realizar el alineamiento corresponden a las Grxs de: *Acinetobacter calcoaceticus/baumannii* (NCBI_WP_000138830.1), *Klebsiella oxytoca* (NCBI_WP_004102692.1), *Shewanella putrefaciens* (NCBI_WP_011789626.1), *Pasteurella multocida* (NCBI_WP_005722395.1), *Burkholderia cepacia* (NCBI_WP_006477066.1), *Neisseria meningitidis* (NCBI_YP_005893621.1) *Saccharomyces cerevisiae* Grx3, Grx4, Grx5, y Grx7 (NCBI_CAA87672.1, NCBI_NP_011101.3, NCBI_NP_015266.1, NCBI_NP_009570.1), *Trypanosoma brucei* (NCBI_XP_844769.1) y *Trypanosoma cruzi* (NCBI_XP_803206.1). Algunas de las secuencias apiladas no se muestran desde el aminoácido inicial, el residuo a partir del cual son apiladas se indica entre paréntesis a la izquierda de cada una. El recuadro en línea continua muestra el motivo redox activo y el cuadro en líneas de puntos muestra los motivos TVP y GG, involucrados en la interacción con GSH y conservados en diversas especies. Con flecha se indica un residuo de D bastante conservado entre diferentes especies y que también se cree participa en la unión de GSH. El alineamiento se realizó empelando el programa Vector NTI 10.0.

Los genes codificantes para ambas Grx (*1cgrx*, LIC11809 y *2cgrx*, LIC11810) fueron amplificados por PCR, a partir de ADN genómico de *L. interrogans* y utilizando oligonucleótidos específicos. Como resultado de la reacción se obtuvieron dos fragmentos del tamaño esperado, 354 (para *Lin1CGrx*) y 324 pb (para *Lin2CGrx*). Los productos de PCR fueron clonados pGEM®-T-*Easy*. Una vez corroborada la identidad de las secuencias clonadas, los genes amplificados fueron subclonados en el vector de expresión pET28c. Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con ambas construcciones ([pET28c/*Lin1CGrx*] y [pET28c/*Lin2CGrx*]) y se realizaron cultivos de estas bacterias. En vista de los antecedentes previos para otras 1CGrx, se propuso la hipótesis acerca de que la *Lin1CGrx* puede unir centros Fe-S como parte de su función biológica. Es por ello, que para asegurar la correcta expresión de la *Lin1CGrx* como holoproteína, al medio LB se lo suplementó al momento de la inducción con Cys 200 μM y citrato ferroso 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La purificación de ambas Grxs recombinantes fue realizada mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Identificadas las fracciones del eluato que contenían a las respectivas proteínas de interés, se realizó un *pool* de las mismas y se concentraron por ultrafiltración. Cabe aclarar que ambas proteínas se obtuvieron con un alto grado de pureza ($> 95\%$, no mostrado).

Curiosamente, luego de la fermentación del cultivo de *E. coli* recombinante transformada con la construcción [pET28c/*Lin1CGrx*] y durante el proceso cromatográfico, se pudo observar que la *Lin1CGrx* ha sido obtenida como holoproteína con una marcada coloración rojiza, característica de proteínas con centros Fe-S (**Figura 80**). Es importante indicar que con el correr de los días post-purificación, las fracciones que presentaban color (presencia del centro Fe-S) fueron volviéndose incoloras. Esto último señala la labilidad de los centros Fe-S a la oxidación (Lillig, C.H. y col. 2005).



Figura 80 | Imagen de la holo-*Lin1CGrx* durante las difentes etapas del proceso de purificación. De izquierda a derecha se muestran: las células de BL21 (DE3) sobre-expresantes de la *Lin1CGrx* post-inducción, el sobrenadante durante la siembra en la columna cromatográfica. Luego, la columna *Hi-Trap Ni²⁺* previa a la elución, y finalmente la proteína recombinante obtenida luego de su purificación por IMAC.

Mediante ensayos de SDS-PAGE no reductor (**Figura 81**) se evaluó el efecto que diferentes agentes redox producen sobre la movilidad electroforética de cada una de las Grxs. Entre los agentes ensayados se incluyen, GSH, GSSG, H₂O₂ y DTT. Los perfiles electroforéticos muestran que mientras la *Lin2CGrx* no exhibió cambios en el perfil electroforético, la *Lin1CGrx* exhibe una movilidad diferenciada en presencia de GSSG y H₂O₂. Ambos agentes causan un retraso en la movilidad electroforética, lo que indicaría la formación de formas de mayor masa molecular. Los cambios registrados indicarían, en primera instancia, la posible formación de dímeros covalentes de la proteína, como ha sido observado en otras Grx monotiólicas (Kelley, J.J. y col. 1997; Comini, M.A. y col. 2008). Fue llamativo observar una menor proporción de la forma dimérica de la *Lin1CGrx* en presencia de GSSG que en presencia de H₂O₂ (**Figura 82**). Esto posiblemente es debido a que el H₂O₂ al reaccionar con la Cys nucleofílica de la proteína genera como producto ácido sulfénico. Este grupo más reactivo puede reaccionar con otra molécula de *Lin1CGrx* que se encuentra en forma de tiolato o condensar con otra *Lin1CGrx* que se encuentra en forma de sulfenato. En ambos casos se estimula la formación de dímeros covalentes entre dos moléculas de *Lin1CGrx* en estas condiciones.

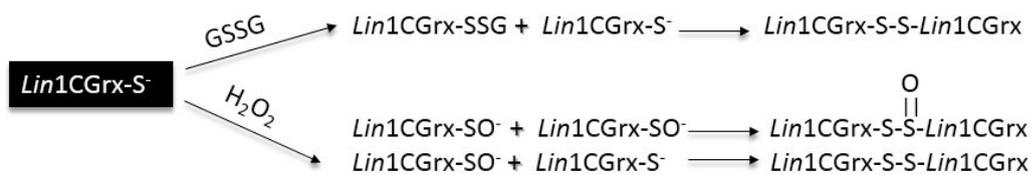
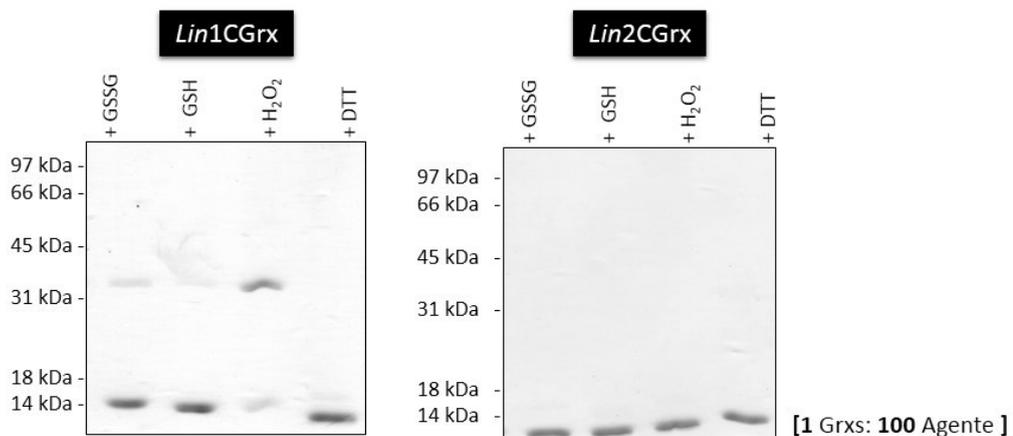


Figura 81 | SDS-PAGE no reductor al 18 % de las *LinGrxs* en diferentes condiciones redox. Las proteínas recombinantes se incuban a 30°C por 10 min en presencia de 100 veces más de diferentes estresores: GSSG, GSH, H₂O₂ o DTT.

4.5.2. Características relacionadas con la estructura de ambas Grxs

4.5.2.1. Determinación de la estructura nativa de las Grxs y coordinación de centros Fe-S por la holoproteína

Se ha descrito que algunas Grxs tanto monotiólicas como ditiólicas, existen en equilibrio dinámico entre monómeros y dímeros no covalentes mediante coordinación con centros Fe-S (Johansson, C. y col. 2007; Mesecke, N. y col. 2008). En algunos casos los monómeros resultan la forma activa mientras que las formas diméricas son inactivas como oxidorreductasas (Johansson, C. y col. 2007). En adición se ha reportado que las 1CGrx presentan capacidad de coordinar centros Fe-S (Comini, M.A. y col. 2013) y son un componente esencial en la biosíntesis de centros Fe-S (Couturier, J. y col. 2015). En virtud de estos antecedentes se decidió conocer la estructura nativa de las Grx de *L. interrogans* y además, analizar la capacidad de la *Lin1CGrx* de coordinar los centros Fe-S. Para evaluar estas propiedades se realizaron corridas de cromatografía de filtración por geles así como también espectros de absorción UV-Visible de las proteínas recombinantes purificadas.

El análisis de cada perfil de elusión indicó que la *Lin2CGrx* eluyó exhibiendo un único pico, correspondiendo a una forma monomérica de masa molecular esperada (14 kDa). De manera similar, la forma apoproteica de *Lin1CGrx* presentó una estructura monomérica, con una masa molecular de 17 kDa (**Figura 82**). En adición, para ninguna de estas proteínas fue posible detectar perfiles de elución siguiendo la absorbancia a 320 y 420 nm (en forma paralela al registro a 280 nm, **Figura 83**). Contrariamente a lo anterior, los cromatogramas de la forma holoproteica de *Lin1CGrx*, exhibieron un pico en el mismo volumen de elusión para las tres longitudes de ondas evaluadas (280, 320 y 420 nm). La masa molecular relativa de la holoproteína calculada fue de 28 kDa y se corresponde con una forma dimérica. Este resultado sugiere que la *Lin1CGrx* presenta una estructura cuaternaria dimérica durante la coordinación del centro Fe-S (esto se pone en evidencia por la absorbancia a 320 y 420 nm). Por otro lado, en la **Figura 83** se presentan los espectros de absorción UV-Vis de la *Lin1CGrx* en su forma holo y apo-proteína. Como puede observarse solamente la forma holo-proteína de *Lin1CGrx* presenta un hombro a 320 nm y dos picos de absorción a 420 nm y 560 nm. Este perfil de absorbancia es característico de los centros Fe-S rómbicos de tipo 2Fe-2S (Ali, V. y col. 2013). A continuación, con la finalidad de corroborar la estequiometría del centro Fe-S unido a *Lin1CGrx* se determinó el

contenido de GSH y Fe. Los resultados de esas mediciones fueron $0,8 \pm 0,1$ mol GSH/mol de *Lin1CGrx* y $0,96 \pm 0,08$ mol Fe/mol de *Lin1CGrx*. Teniendo en cuenta la estructura dimérica de la forma holoproteica de la *Lin1Grx* y los resultados de las mediciones del contenido de GSH y Fe permiten inferir que el centro Fe-S presenta una estructura rómbica de tipo 2Fe-2S coordinado por dos moléculas de GSH y dos moléculas de *Lin1CGrx*. Esta estequiometría de la holoproteína de *Lin1CGrx* es similar a lo descrito para otras Grxs (Feng, Y. y col. 2006; Comini, M.A. y col. 2008).

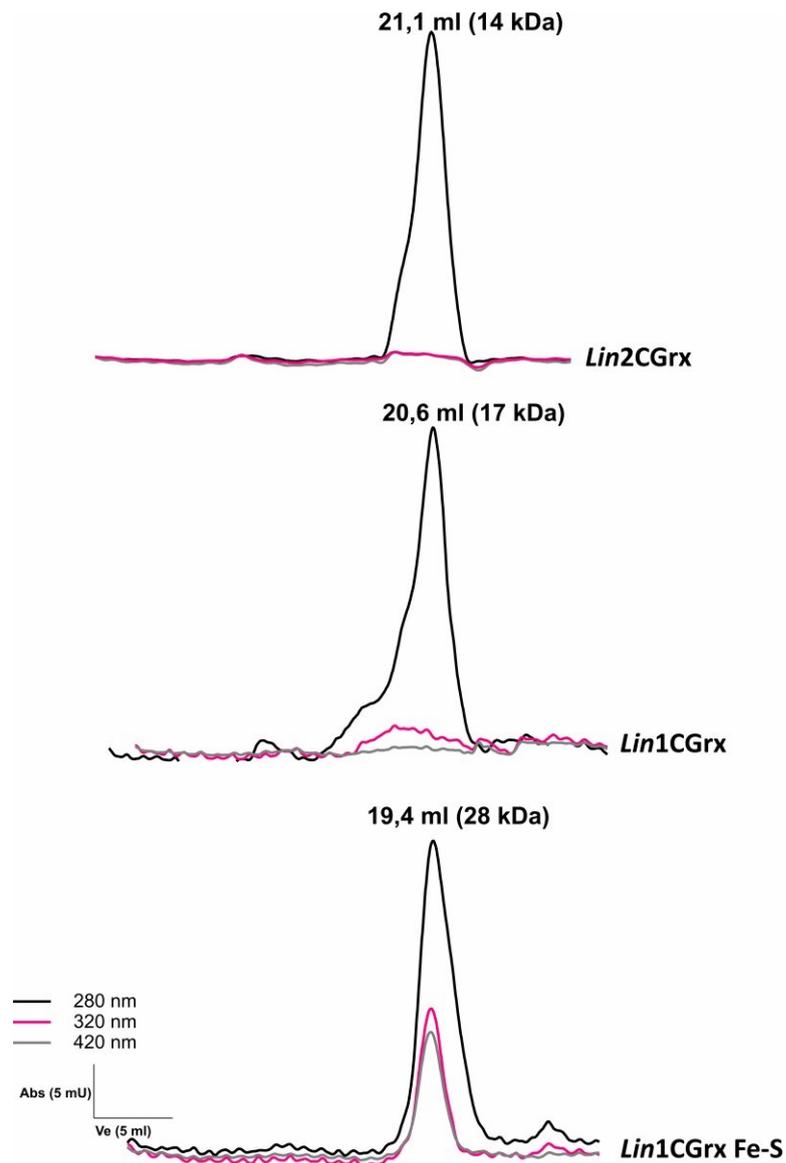


Figura 82 | Perfil de elución de la cromatografía de filtración por geles de las Grxs. A una solución de $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cada una de las enzimas purificadas se le realizó una cromatografía de filtración por gel (*Superdex 200 HR*). Las masas fueron determinadas según una curva de patrones de masa molecular conocida (detallados en Materiales y Métodos). El trazo negro corresponde al perfil a 280 nm (contenido de proteína), mientras que el fucsia y el gris, son los perfiles a 320 y 420 nm, respectivamente (característicos de los centros Fe-S).

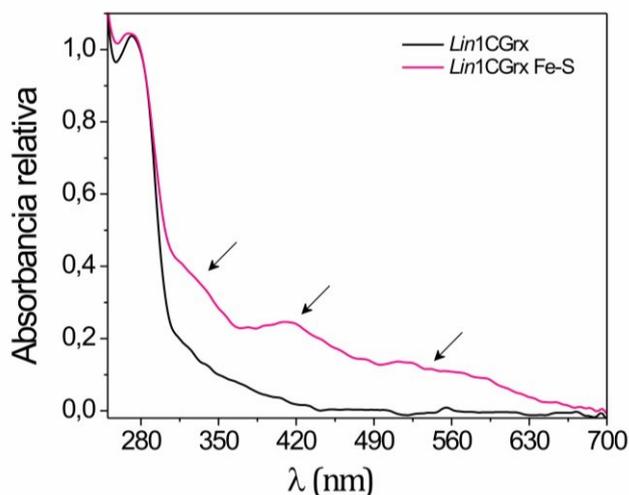


Figura 83 | Espectro UV-Visible de las *LinGrxs* recombinantes. A una solución de 20 μM de cada una de las enzimas purificadas se le realizó un espectro UV-Visible. Perfil espectroscópico de la holo-*Lin1CGrx* (trazo fucsia) y se señalan con flechas un hombro a 320 nm, y un pico a 420 y 560 nm, respectivamente. Estos cambios espectroscópicos son característicos de las proteínas con centros Fe-S. En el mismo gráfico se muestra el perfil espectroscópico de la apo-*Lin1CGrx* (trazo negro).

4.5.2.2. Evaluación de la fluorescencia intrínseca de las Grx recombinantes

Explotando la ocurrencia de aminoácidos aromáticos en las Grx, se evaluó la fluorescencia intrínseca de las proteínas recombinantes. En este caso, la *Lin1CGrx* tiene un Trp, dos Tyr y seis Phe. La *Lin2CGrx* contiene seis Tyr, cuatro Phe y ningún residuo de Trp. Además, ambas Grx tienen un residuo aromático en su sitio activo CGFS (*Lin1CGrx*) y CPYF (*Lin2CGrx*). Para determinar cambios de fluorescencia frente a distintos estados redox, las Grxs recombinantes fueron reducidas con DTT o GSH y oxidadas con GSSG a pH 7,5. Las muestras fueron excitadas a la longitud de onda de 280 nm en un espectrofluorímetro y se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia entre 300–400 nm. Los espectros de emisión correspondientes a ambas Grxs mostraron un incremento en la fluorescencia referido al pico de emisión a ~ 350 nm cuando fueron tratadas con GSH o DTT, en comparación con sus espectros luego de ser oxidadas con GSSG (**Figura 84**). La disminución de la fluorescencia de ambas Grx en sus formas oxidadas podría deberse a que en su forma de disulfuro (intramolecular o mixto con GSH), se genera un cambio conformacional en su estructura. Esto produciría un *quenching* en la fluorescencia de los residuos aromáticos, principalmente aquellos que forman parte del sitio activo.

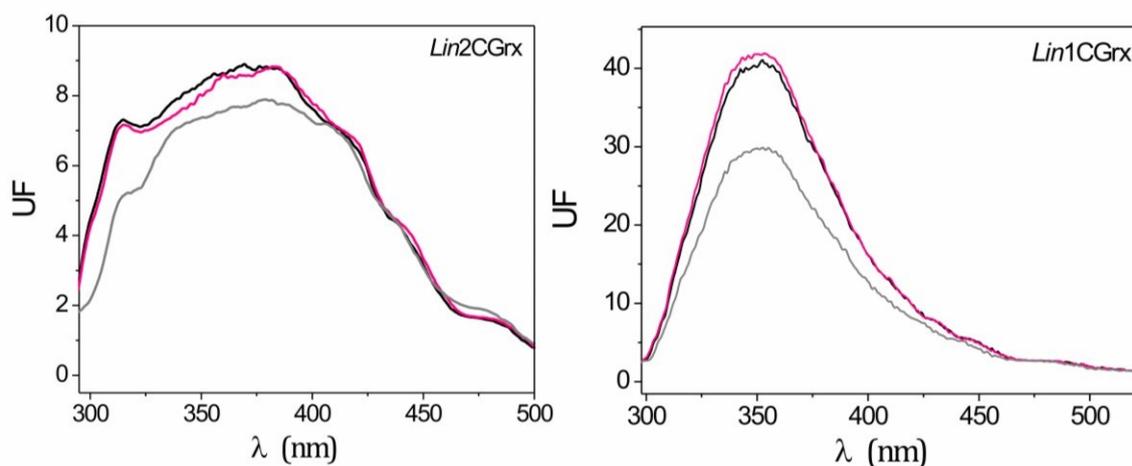


Figura 84| Espectro de emisión de fluorescencia de las Grxs oxidadas y reducidas. Las proteínas recombinantes (5 μ M) se trataron con 1 mM de DTT (línea negra); GSH (línea fucsia) y GSSG (línea gris), respectivamente, a 30 °C y *buffer* fosfato pH 7,0. En el gráfico de la izquierda se muestran los espectros de emisión de la apo-*Lin1CGrx* y a la derecha los de la *Lin2CGrx*.

4.5.2.3. Ensayos de auto-glutationilación de las Grx recombinantes

Para poner de manifiesto la formación de disulfuros mixtos entre las Grx y el GSH fue realizado un ensayo similar al realizado en el apartado 4.2.4.1 para la *LinTrx*. Soluciones de ambas Grx recombinantes fueron tratadas con Di-E-GSSG y subsecuente tratamiento con DTT. Los controles incluidos en este ensayo se corresponden a cada una de las proteínas incubadas solamente con Di-E-GSSG o DTT de manera independiente. Los productos de cada tratamiento fueron resueltos en un SDS-PAGE no reductor y posterior revelado de la marca fluorescente con el escáner *Typhoon*. La única banda fluorescente detectada corresponde a la *Lin1CGrx* tratada con el fluoróforo, señalando de este modo la capacidad de proteína de glutacionilarse (**Figura 85**). La mezcla anterior en presencia de DTT pierde la marca fluorescente, indicando la reversibilidad del proceso (**Figura 85**). Por otro lado, la ausencia de señal de la *Lin1CGrx* en presencia de DTT solamente, descarta la autofluorescencia de la proteína en estas condiciones (**Figura 85**). Contrariamente, la *Lin2CGrx* exhibió leve capacidad de glutacionilarse en forma estable (que persista la marca). Los resultados obtenidos sugieren la idea que la *Lin1CGrx* podrían mediar reacciones de transglutacionilación de proteínas. Señalando, que al igual que la *LinTrx*, podría participar en la regulación redox (mediante la transglutacionilación) de la actividad funcional de proteínas blancos, como ocurre en otros organismos (Hashemy, S.I. 2008).

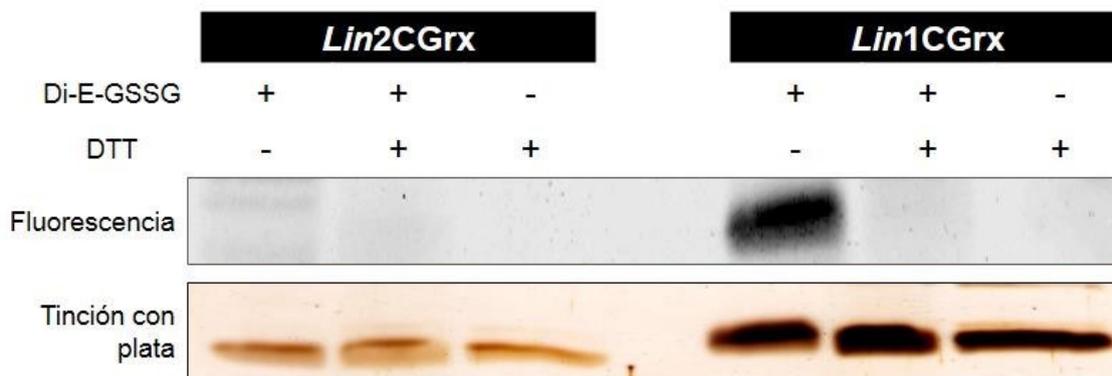


Figura 85 | Auto-glutationilación de las Grxs de *L. interrogans*. Las Grxs (1 μM) se incuban secuencialmente a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min en *buffer* Tris-HCl pH 7,5 con DiE-GSSG 10 μM y posteriormente con DTT 10 mM o en su ausencia. Los ensayos controles de la cada una de las redoxinas en presencia solo de DTT se incuban durante los mismos tiempos y temperaturas que las otras muestras. El panel superior muestra fluorescencia de las muestras registradas con el escáner *Typhoon*. El panel inferior corresponde al control de carga de proteína revelado mediante la tinción con nitrato de plata del SDS-PAGE.

4.5.2.4. Ensayo de S-nitrosilación de la *Lin1CGrx*

Tal como se ha mencionado en el capítulo 2, las Grxs (al igual que las Trxs) han sido involucradas en procesos de glutathionilación y nitrosilación. La *Lin1CGrx* presenta un único residuo de Cys, el cual podría ser capaz de ser modificado por glutathionilación o nitrosilación en forma estable. En vista de esto, se propuso evaluar la habilidad de la *Lin1CGrx* de ser modificada por S-nitrosilación, para lo cual fue realizado el siguiente ensayo. La proteína fue secuencialmente tratada con DTT y GSNO. El exceso de los agentes redox empleados fue eliminado por *Sephadex-G25*. A las muestras obtenidas luego de cada una de las etapas se les realizó un espectro de absorción UV-Visible. La fracción de proteína tratada con DTT (reducida) no presentó cambios en el espectro UV-Vis. Por otro lado, la fracción de proteína reducida y tratada con GSNO, presentó un pico de absorbancia adicional a 335 nm (**Figura 86**). Este pico de absorbancia es característico de la presencia de nitrosotioles. A partir del valor de absorbancia registrado, la concentración de proteína, y un $\epsilon_{335\text{nm}} = 0,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ se estimó el contenido de tioles nitrosilados presente en la proteína. El valor obtenido fue aproximadamente un grupo -SNO por mol de *Lin1CGrx*, indicando que la única Cys presente en la proteína se encontró nitrosilada luego del tratamiento con GSNO. En analogía con lo indicado en el ensayo anterior, la capacidad de nitrosilarse de la Grx, señalaría la posibilidad de que la misma medie reacciones de denitrosilación y

transnitrosilación. Como se mencionó antes, la transferencia o eliminación de un grupo -SNO tiene un rol en los procesos de señalización redox (Gow, A. y col. 2007; Laver, J.R. y col. 2013).

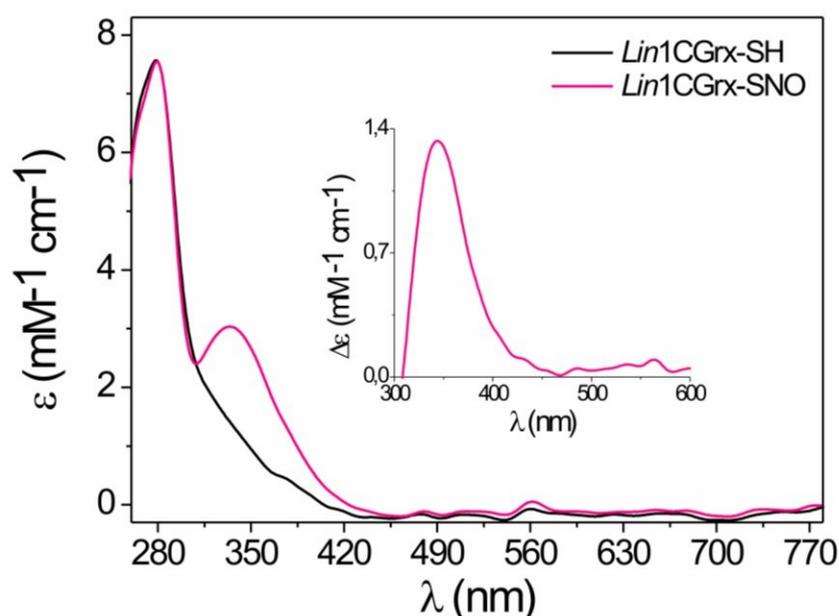


Figura 86 | Evaluación de la nitrosilación de la *Lin1CGrx*. La *Lin1CGrx* (130 μM) se incubó sucesivamente con diferentes agentes redox. En primer lugar se empleó DTT 10 mM y EDTA 2 mM. Luego, se trató con una relación 1:10 de GSNO. Cada incubación fue realizada durante 15 min y a 30 °C. Los excesos de ambos agentes se eliminaron a través de una *Sephadex-G25*. Para determinar la concentración de SNO se usó un $\epsilon_{335\text{nm}} = 0,9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Para determinar la concentración de proteína se empleó $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ teórico de $8,37 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (calculado a partir de la secuencia primaria). En el gráfico interno se representa la diferencia del $\epsilon_{335\text{nm}}$ estimado para la proteína nitrosilada respecto al correspondiente para la proteína reducida.

4.5.3. Determinación de la funcionalidad de las Grx *in vitro*

4.5.3.1. Ensayo de reducción de insulina

El ensayo de reducción de la insulina, descrito por Holmgren en el año 1979, ha sido extensamente usado para evaluar en forma directa la reducción de puentes disulfuros presentes en una proteína (Holmgren, A. 1979). Éste mide semicuantitativamente la velocidad de reducción de dos puentes disulfuros intercatenarios presentes en la insulina. Durante el transcurso de la reacción se forma un precipitado blanco, principalmente como consecuencia de la precipitación de la cadena B libre de la insulina. La turbidez resultante como consecuencia de la precipitación de la cadena B es registrada espectrofotométricamente a 650 nm. La presencia de una redoxina (Trx o Grx) acelera la velocidad de reducción de la insulina

a expensas de DTT (Holmgren, A. 1979). En virtud de lo mencionado, se efectuó este ensayo para evaluar la capacidad de las Grx de *L. interrogans* de reducir disulfuros proteicos. Las reacciones de reducción de insulina a expensas de una u otra Grx fueron realizadas a pH 7,0 y 25°C. Como control negativo se omitió la adición de Grx recombinante a la mezcla de reacción, y como control positivo se sustituyó las Grx por *LinTrx*. Como se muestra en la gráfica de la **Figura 87**, ambas Grx (*Lin1CGrx* y *Lin2CGrx*) carecen de capacidad de reducción de la insulina (la velocidad de reacción fue similar a la de la mezcla de reacción conteniendo insulina y DTT, el control negativo). En contraparte la *LinTrx* exhibió un marcado incremento en la velocidad de reducción de la insulina a expensas de DTT, con respecto al control negativo. Los resultados obtenidos, indican que ambas Grx presentan una muy baja capacidad de reducir disulfuros proteicos (al menos 100 veces) con respecto a *LinTrx*. Las 1CGrx han sido asociadas a procesos de deglutationilación (reducción de disulfuros mixtos entre la proteína y el GSH) pero no en la reducción de directa de disulfuros proteicos (Gao, X.H. y col. 2010; Couturier, J. y col. 2015); estos resultados nos indican que *Lin1CGrx* no es una excepción. Por otro lado, la baja actividad disulfuro reductasa de disulfuros proteicos de la *Lin2CGrx* (respecto a la de la *LinTrx*) es similar a lo reportado para 2CGrxs de otros organismos (Gao, X.H. y col. 2010; Couturier, J. y col. 2015), indicando que, posiblemente, esta proteína esté involucrada en la reducción de disulfuros de tioles de baja masa molecular tales como GSSG y bis- γ -GC, así como de DHA.

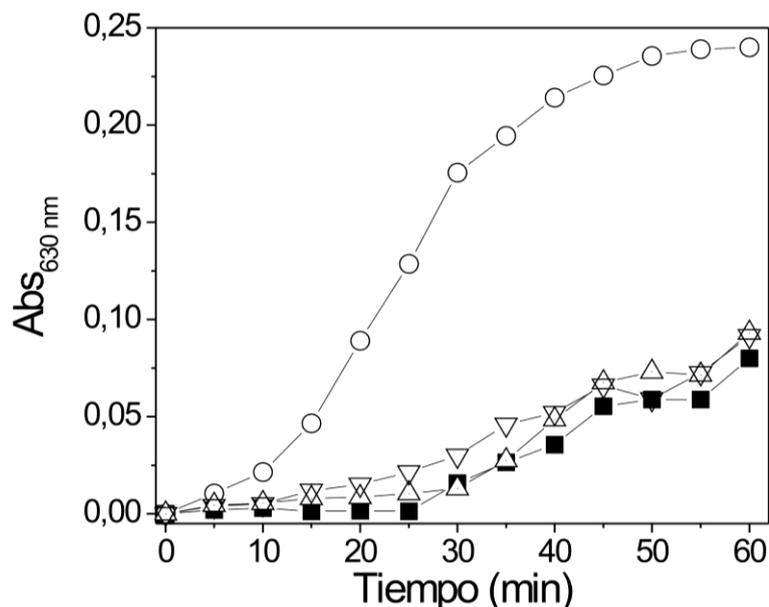


Figura 87 | Reducción de la insulina humana por *LinGrxs*. Las reacciones fueron realizadas en *buffer* fosfato pH 7,0 a 25 °C, en presencia de alguna de las Grxs recombinantes: 100 μ M de *Lin2CGrx* (Δ) o *Lin1CGrx* (∇). En forma paralela se realizó un control positivo donde se reemplazó a las Grxs por (\circ) *LinTrx1* μ M, y un control negativo en ausencia de redoxina (\blacksquare).

4.5.3.2. Ensayo de reducción de disulfuros mixtos no proteicos

La reducción de hidroxietildisulfuro (HED) constituye el ensayo más utilizado para caracterizar a las Grxs como disulfuro reductasa (de disulfuros mixtos con GSH) (Lillig, C.H. y col. 2008). En este ensayo, el HED (forma disulfuro del β -mercaptoetanol) y el GSH reaccionan instantáneamente para formar un disulfuro mixto capaz de ser reducido por las Grxs (Lillig, C.H. y col. 2008). Como intermediario de la reacción se forma un disulfuro mixto entre la Grxs y el GSH, que es finalmente reducido por otra molécula de GSH (Zaffagnini, M. y col. 2012a). El consumo de NADPH, mediado por la GR, durante la reducción del GSSG, permite seguir la reacción en forma continua siguiendo la absorbancia a 340 nm (**Figura 88**).

En vista de estos antecedentes, se analizó la capacidad de ambas Grx de *L. interrogans* de catalizar esta reacción. Los valores obtenidos indican que tanto la forma apoproteica como la holoproteica de la *Lin1CGrx* no presentaron actividad disulfuro reductasa detectable mediante este ensayo. Contrariamente, la *Lin2CGrx* presenta una actividad enzimática específica para la reducción de disulfuros mixtos de 27 ± 3 U.mg⁻¹. Los valores de los parámetros cinéticos calculados para *Lin2CGrx* se muestran en la **Tabla 14**. Es interesante que la *Lin2CGrx* fue capaz de reducir disulfuros mixtos con una actividad comparable a otras 2CGrx de otras fuentes

(Gallogly, M.M. y col. 2008; Couturier, J. y col. 2013; Marquez, V.E. y col. 2014). La escasa actividad disulfuro reductasa de la *Lin1CGrx* en el ensayo de HED concuerda con los resultados determinados para otras 1CGrxs de otras fuentes (Fernandes, A.P. y col. 2005; Filser, M. y col. 2008; Mesecke, N. y col. 2008). En adición, en la **Tabla 14** se muestran los parámetros cinéticos para la reducción de ácido dehidroascórbico (DHA). Esta actividad ha sido reportada para varias Grxs, sin embargo esta actividad enzimática no es exclusiva de este tipo de proteínas (Lillig, C.H. y col. 2008). Otra capacidad a ser evaluada en esta proteína fue la de reducir GSNO a expensas de GSH. Sin embargo, dicha funcionalidad no fue detectada para *Lin2CGrx*.

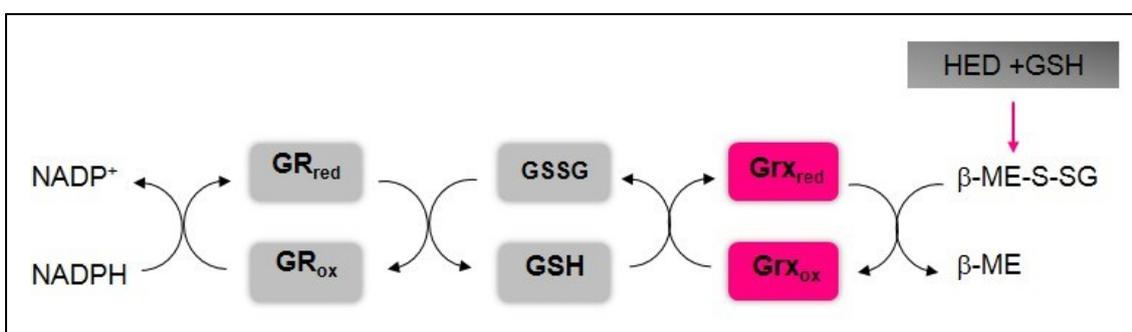


Figura 88 | Esquema del sistema acoplado empleado para la determinación de los parámetros cinéticos que se detallan en la **Tabla 14**.

Tabla 14 | Eficiencia de catálisis aparente para la reducción de disulfuros no proteicos por la *Lin2CGrx*. Las mediciones se realizaron a pH 7,5 y 30 °C.

Sustrato	Co-sustrato	k ($M^{-1}.s^{-1}$)
HED	GSH 3 mM	$1,4.10^3$
GSH	HED 1 mM	$5,1.10^3$
DHA	GSH 3 mM	$4,6.10^2$

Algunas 1CGrxs son capaces de reducir GSSG, aun cuando no son activas (o presentan escasa actividad) en el ensayo de HED, entre estas se encuentra la Grx4 de *E. coli* (Fernandes, A.P. y col. 2005). En estos casos la reducción de la 1CGrx por GSH no sería posible. Se ha encontrado que la TrxR, Trx o 2CGrx podrían ser responsables de la transferencia de equivalentes de reducción (Fernandes, A.P. y col. 2005). Análogo a esto, se propuso que la *Lin1CGrx* podría ser reducida por el sistema Trx homólogo, pudiendo ceder los equivalentes de reducción para la reducción de GSSG. Para evaluar esto, se llevaron a cabo distintas reacciones donde se evaluó el consumo de NADPH en un sistema enzimático acoplado como se muestra en la **Figura 88**. El resultado obtenido

de este ensayo, permite sugerir que el sistema Trx propio de *L. interrogans* podría ser un reductor fisiológico de la *Lin1CGrx*. Cabe destacar que el sistema Trx sería también importante en la regeneración de GSSG a GSH (ver Capítulo 2). Esa propiedad sería relevante desde el punto de vista fisiológico ya que no ha sido identificada una secuencia codificante para GR en el proyecto genoma de esta bacteria.

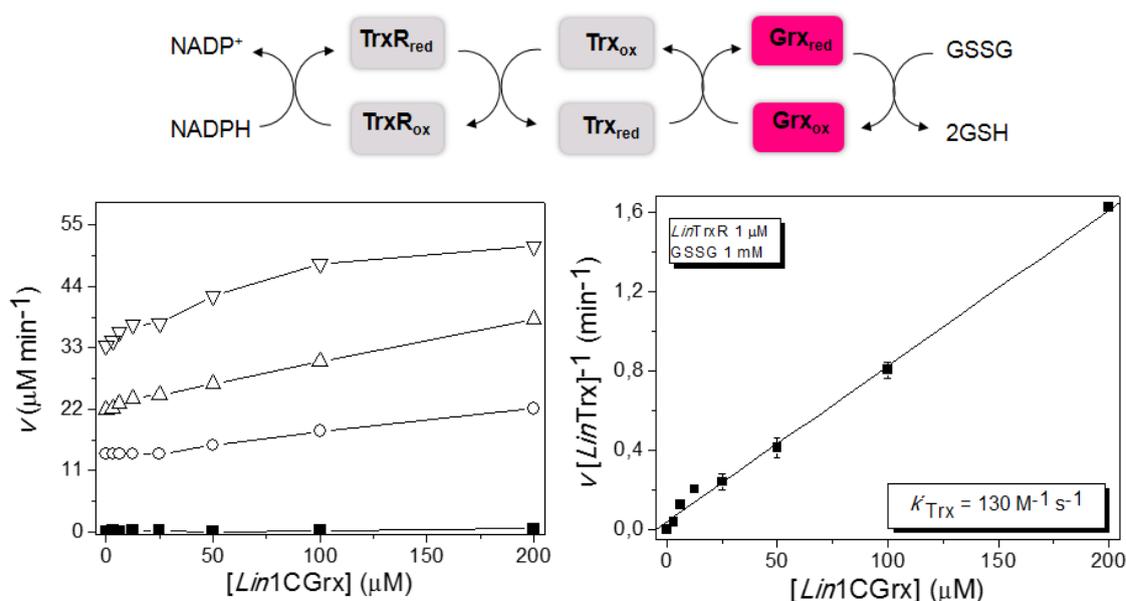


Figura 89 | Actividad GSSG reductasa en la *Lin1CGrx*. En el gráfico de la izquierda se muestra una familia de curvas obtenidas variando la concentración de *Lin1CGrx* (0-200 μM) en presencia de diferentes concentraciones de *LinTrx* (■) 0 μM, (○) 5 μM, (Δ) 10 μM y (∇) 20 μM. A partir de las gráficas anteriores fue estimada una constante de primer orden que se indica al pie de la gráfica (gráfico a la derecha). Las mediciones fueron realizadas a pH 7,5, a 30 °C y la mezcla de reacción empleada se detalla en Materiales y Métodos.

4.5.3.3. Capacidad de *Lin2CGrx* de reducir proteínas involucradas en el metabolismo redox

En vista de que la *Lin2CGrx* presentó nula capacidad de ser reductor de disulfuros proteicos (a través del ensayo de reducción de insulina), se ha propuesto evaluar otras posibles proteínas sustratos propios de *L. interrogans* para esta Grx. Previamente, como se ha descrito en esta Tesis, la *LinAhpC* es una proteína involucrada en la detoxificación de peróxidos e hidroperóxidos en *L. interrogans*. La reducción de esta peroxirredoxina es llevada a cabo por el sistema Trx (como se describió en el capítulo 2). Teniendo en cuenta esto, se evaluó la habilidad de *Lin2CGrx* de transferir equivalentes de reducción a la *LinAhpC* (utilizando GSH como reductor).

Sin embargo, al reemplazar el sistema Trx por el sistema GSH/*Lin2CGrx* no se observó transferencia de los equivalentes de reducción (evaluado como consumo de NADPH).

Teniendo en cuenta que *LinMsrBΔ35N* es reciclada a expensas de Grx y no de Trx (descrito en capítulo 4), se propuso determinar si la *Lin2CGrx* podría ser un posible reductor fisiológico de esta enzima. Cuando se reconstituyó el sistema enzimático acoplado completo utilizando la *Lin2Grx* (en reemplazo de la Grx humana) se pudo evidenciar también transferencia de equivalentes de reducción. Este resultado motivó caracterizar la capacidad de la *Lin2CGrx* como reductor fisiológico de la *LinMsrBΔ35N*. Las curvas de saturación para *Lin2CGrx* [en presencia de L-Met(*R,S*)SO] para *LinMsrBΔ35N* se muestran en la **Figura 90**. En la **Tabla 15** se detallan los parámetros cinéticos obtenidos, señalando que los mismos son dos órdenes de magnitud mayores a los previamente calculados cuando se utilizó la Grx heteróloga (**Tabla 15**).

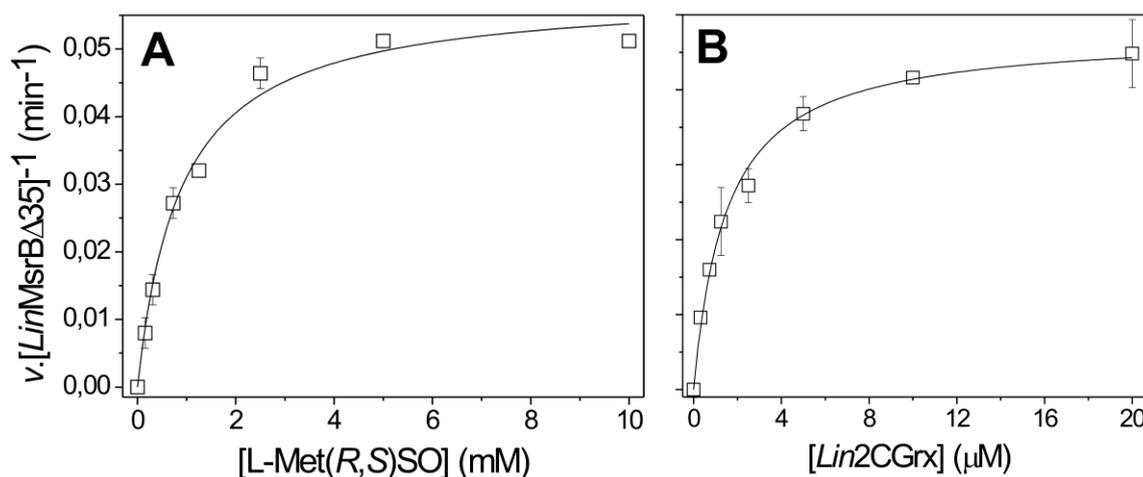


Figura 90 | Curvas de sustrato para *LinMsrBΔ35N*. En **A** se utilizó *LinMsrBΔ35N* 100 μM, *Lin2CGrx* 20 μM y diferentes concentraciones de L-Met(*R,S*)SO. En **B** se empleó *LinMsrBΔ35N* 100 μM y se varió la concentración de *Lin2CGrx*. Ambos ensayos fueron realizados a 30 °C y a pH 7,5.

Tabla 15 | Parámetros cinéticos aparentes de la actividad MetSO de la *LinMsrBΔ35N*. Las reacciones fueron realizadas a pH 7,5 y a 30 °C, empleando para el reciclo de la *LinMsrBΔ35N* la *Lin2CGrx*. N.D. = no detectable.

<i>LinMsrBΔ35N</i>				
Sustrato	Co-sustrato	K_{mapp} (μM)	k_{catapp} (min ⁻¹)	$k_{cat} \cdot K_{m-1}$ (M ⁻¹ ·s ⁻¹)
L-MetSO	<i>Lin2CGrx</i> 20μM	900 ± 100	0,058 ± 0,002	1,1·10 ³
<i>Lin2CGrx</i>	L-MetSO 5 mM	1,5 ± 0,1	0,047 ± 0,001	7,8·10 ²
<i>Lin1CGrx</i>	L-MetSO 5 mM	N.D.	N.D.	N.D.

4.5.4. Determinación de la funcionalidad de la *Lin1CGrx* *in vivo*

4.5.4.1. Ensayos de complementación de levaduras en placa

Para realizar una evaluación de la funcionalidad *in vivo* de la *Lin1CGrx* se utilizó una aproximación empleando ensayos de complementación en células mutantes de *S. cerevisiae*. Las cepas utilizadas fueron mutantes generadas por *knockout* en Grxs monotiólicas derivadas de la cepa parental CML235. Todas las cepas mencionadas presentan auxotrofia por Leu, His y uracilo. En el laboratorio se dispone de cepas de levaduras doble y simple mutantes en las *SceGrx3*, *SceGrx4* y *SceGrx5*. La *SceGrx3* y *SceGrx4* son Grx monotiólicas multidominio, mientras que la *SceGrx5* es una Grx monotiólica de simple dominio (Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 1999; Belli, G. y col. 2002; Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 2002).

La *SceGrx5* es una proteína de localización mitocondrial que participa de la biogénesis de centros [Fe-S]. Su ausencia provoca la inactivación de enzimas con centros Fe-S, acumulación intracelular de Fe, hipersensibilidad a agentes oxidantes externos, niveles elevados de proteínas oxidadas, auxotrofías a numerosos aminoácidos, bajas tasas de crecimiento en medios ricos (Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 1999; Tamarit, J. y col. 2003) e incapacidad de crecer en presencia de glicerol. Por otro lado, las mutantes en *SceGrx3* y *SceGrx4* presentan sensibilidad hacia agentes oxidantes en forma similar a lo observado para la mutante de delección en *SceGrx5*. La ausencia simultánea de en *SceGrx3* y *SceGrx4* (de ubicación tanto nuclear como citoplasmática, respectivamente), provoca que los factores de transcripción Aft1 y Aft2 (asociados a la homeostasis de hierro) se localicen en el núcleo y generen una expresión

constitutiva de esos genes implicados en la captación de hierro (Ojeda, L. y col. 2006). Como consecuencia de ello se acumula hierro intracelular, lo cual induce un incremento en los niveles de EROs generados por la reacción de Fenton (Pujol-Carrion, N. y col. 2010).

A través del análisis *in silico* de la secuencia primaria de la *Lin1CGrx* junto a cada una de estas tres *Grx* en *S. cerevisiae*, se determinaron los siguientes porcentajes de identidad 15, 17 y 34%, los cuales corresponden a la identidad entre la *Lin1CGrx* y la *SceGrx3*, la *SceGrx4* o *SceGrx5*, respectivamente. En virtud de este análisis *in silico* (no se muestran los alineamientos) se decidió trabajar con las cepas de levaduras simple y doble mutante en *SceGrx5*. Por lo tanto, el gen que codifica para *Lin1CGrx* fue subclonado en el vector p425-GPD que permite la expresión de proteínas en *S. cerevisiae* de manera constitutiva. Se realizaron las transformaciones de las cepas deletéreas MML19 ($\Delta grx5$) y MML39 ($\Delta grx4\Delta grx5$) con la construcción recombinante [p425GPD/*Lin1CGrx*]. También se incluyeron como controles negativos cada una de las cepas mutantes transformadas con el plásmido vacío y como control positivo la cepa parental (CL235, la cual carece de las mutaciones mencionadas) también transformada con p425-GPD.

Una vez identificados los clones recombinantes se realizaron los ensayos de complementación. A partir de un cultivo en fase exponencial de cada una de estas cepas recombinantes (normalizados a una densidad celular de $5 \cdot 10^6$ células vivas. ml^{-1}) se realizaron diluciones seriadas y luego volúmenes iguales fueron sembrados en placas de Petri que contenían diferentes condiciones de cultivo. Los ensayos fueron realizados con dos finalidades: (i) evaluar la sensibilidad de las diferentes levaduras recombinantes a condiciones de estrés oxidativo y (ii) evaluar la funcionalidad de las vías metabólicas de aprovechamiento de diversas fuentes de carbono. Como estresor fue empleado 1 mM de H_2O_2 y, como fuente de carbono fermentable glucosa (YPD-agar y SD-agar) y como no fermentable glicerol (YPG-agar y SG-agar).

El empleo de glucosa o glicerol como fuente de carbono depende de características inherentes al metabolismo de *S. cerevisiae*. La glucosa es una fuente de carbono y energía que puede metabolizarse tanto por la glicólisis acoplada al ciclo de Krebs y luego cadena respiratoria, como también por la vía fermentativa, que es independiente del ciclo de Krebs. Por otra parte, en esta levadura el glicerol puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía (Turcotte, B. y col. 2010), pero su aprovechamiento depende exclusivamente de la correcta funcionalidad del ciclo de

Krebs, ya que se trata de una fuente no fermentable (Rodríguez-Manzaneque, M.T. y col. 1999; Turcotte, B. y col. 2010).

La presencia de *Lin1CGrx* no revirtió el fenotipo de la cepa MML39 ($\Delta grx4\Delta grx5$) (datos no se mostrados), por lo tanto la cepa complementada mostró mayor sensibilidad al estrés oxidativo así como también escaso desarrollo en presencia de glicerol como fuente de carbono. Esto podría deberse a que la ausencia de ambas Grxs genera un fenotipo más sensible que no puede ser revertido por la expresión de la *Lin1CGrx*. La menor sobrevivencia de esta mutante, puede explicarse por los efectos deletéreos concomitantes (descritos más arriba en este apartado) que generan la ausencia de ambas Grxs (*SceGrx4* y *SceGrx5*).

Contrariamente a lo anterior, la presencia de *Lin1CGrx* revirtió el fenotipo de la cepa MML19 (**Figura 91**). Los resultados obtenidos muestran la existencia de una complementación del fenotipo en comparación a la cepa control (transformada con el vector p425-GPD vacío) y la cepa parental (CML235 transformada con el vector p425-GPD vacío). Estos resultados indican que la presencia de la *Lin1CGrx* contribuye al crecimiento de la levadura mutante en presencia de ambas fuentes de carbono, y a niveles similares que la cepa parental. En adición, la complementación con *Lin1CGrx* incrementó la resistencia a la condición de estrés oxidativo (generado por la presencia de H_2O_2 exógeno). De este modo, se puede concluir que la *Lin1CGrx* revierte el fenotipo de la cepa mutante, señalando que la misma podría cumplir funciones similares a la *SceGrx5*.

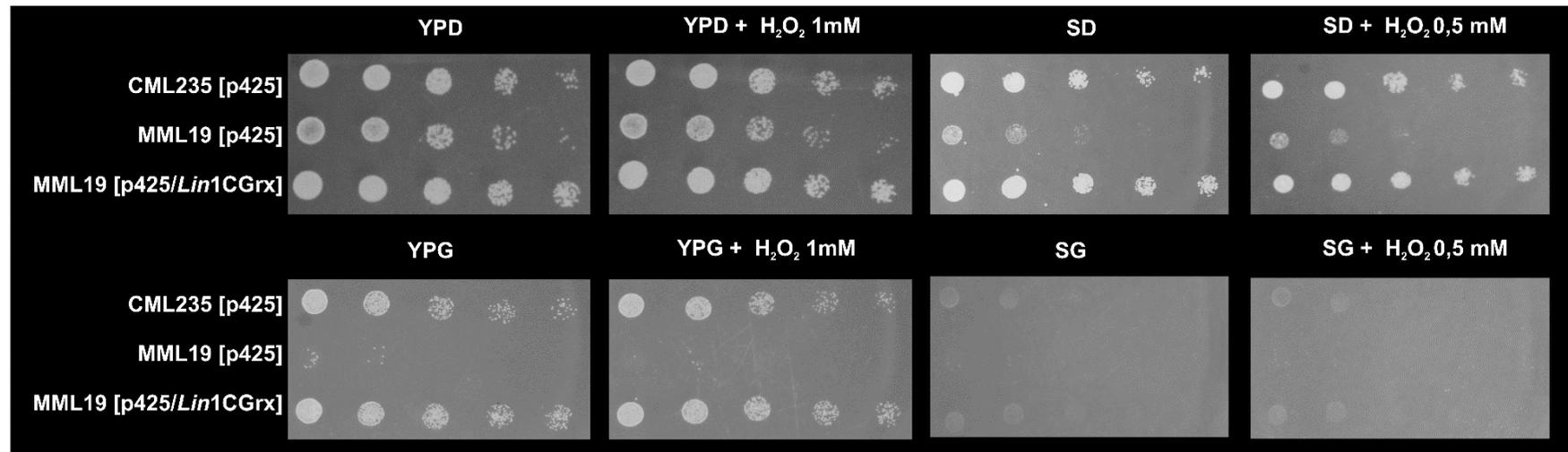


Figura 91 | Ensayos de complementación de la cepa de levadura MML19 ($\Delta grx5$) transformada con la *Lin1CGrx*. A partir de un cultivo en fase exponencial con una densidad celular normalizada de $5 \cdot 10^6$ células. ml^{-1} se realizaron 4 diluciones seriadas y luego volúmenes iguales fueron sembrados en placas conteniendo diferentes medios de cultivo. Se evaluó la proliferación de las levaduras en medio rico (YPD-agar), medio mínimo (SD-agar), y en presencia de otra fuente de carbono como glicerol (YPG o SG). Además, en cada uno de los medios citados se determinó la sensibilidad de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* recombinantes al estrés oxidativo generado por H_2O_2 . Los controles utilizados fueron la cepa "parental" (control positivo) y la cepa MML19 (control negativo), ambas transformadas con el vector p425-GPD vacío. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta observar el desarrollo de colonias (48-96 h)

4.5.4.2. Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

Como fue mencionado en el apartado anterior la *ScxGrx5* está involucrada en el ensamblado de los centros Fe-S. Por lo tanto en su ausencia se inactivan enzimas que requieren centros Fe-S para su actividad enzimática (como por ejemplo la aconitasa y la succinato deshidrogenasa) (Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 2002). Esto permitiría explicar la menor tasa de consumo de oxígeno que exhiben estas cepas de levaduras mutantes en la *Grx5*. En relación a lo descrito, en el siguiente ensayo se pretende evaluar si la complementación con *Lin1CGrx* podría contribuir al ensamblado de centros Fe-S en enzimas que forman parte del ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones. A modo de corroborar esta hipótesis, se realizó una medición de la tasa de consumo de O_2 . Esto es una forma indirecta de la “salud” metabólica que presentan las diferentes cepas recombinantes. En la **Figura 92** se pone de manifiesto que la complementación con *Lin1CGrx* revierte el fenotipo de la cepa mutante (la cual presenta una muy baja tasa de consumo de O_2) alcanzando una tasa de consumo de O_2 que es similar a la de la cepa parental.

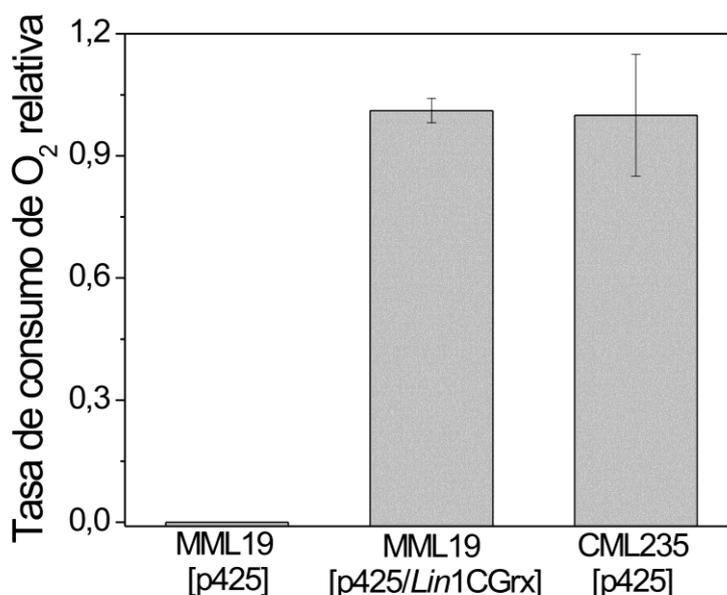


Figura 92 | Respiración celular en cepas recombinantes de *S. cerevisiae*. Se emplearon cultivos en fase exponencial de las cepas de *S. cerevisiae* mutante MML19, transformadas con el plásmido vacío y con la *Lin1CGrx*, así como también la parental (CML235) transformada con el plásmido vacío. Previo a las mediciones se normalizó la densidad celular de las levaduras a una $DO_{630nm} = 0,6$, las diluciones necesarias fueron realizadas en el mismo medio empleado para crecerlas (SD-líquido). Las tasas de consumo de O_2 se realizaron empleando un electrodo tipo Clark, siguiendo las indicaciones del fabricante y a una temperatura de 28 °C. Los valores obtenidos se relativizaron al valor obtenido para cepa parental (CLM235 [p425]).

4.5.5. Análisis de la expresión de *Lin1CGrx* en *L. interrogans*

Con el objetivo de evaluar los niveles de *Lin1CGrx* en células de *L. interrogans* se prosiguió a su detección empleando anticuerpos policlonales contra PICOT20 de *Trypanosoma cruzi* (dato no publicado). La *Lin1CGrx* presenta 31% de identidad con *TcrPICOT20* lo que permitió el reconocimiento cruzado de la proteína de interés. Con los anticuerpos mencionados se realizó un ensayo de *western blot* sobre extractos totales de leptospiros crecidas en fase exponencial, a las cuales se las incubaron por 30 min a 28 °C en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de agentes redox. Como se puede apreciar en la **Figura 93**, el anticuerpo contra *Lin1CGrx* detectó bandas en cada uno de los extractos a partir de bacterias sin tratar y tratadas. Las bandas identificadas en todos los casos, se corresponden con una masa molecular de ~17 kDa. Este tamaño se correlaciona con la masa molecular de la apoproteína *Lin1CGrx* obtenida en forma recombinante. A excepción del tratamiento con 0,1 y 1 mM de CySNO, ninguno de los estresores empleados afectó la abundancia relativa a nivel celular de la proteína.

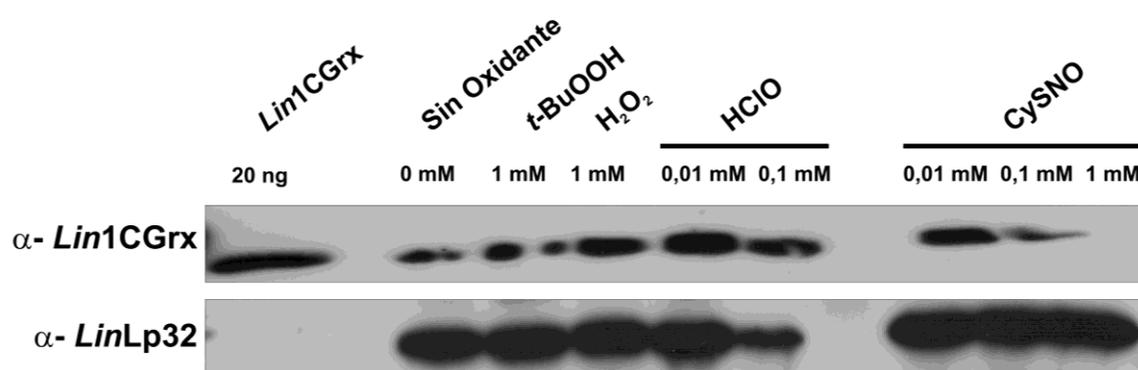


Figura 93 | Modulación del contenido de *Lin1CGrx* en extractos celulares de *L. interrogans*. Se incubaron suspensiones bacterianas ($OD_{420\text{ nm}} \sim 0,135$) en PBS, a 28 °C por 30 min en presencia de los estresores y cantidades indicadas en la imagen, o en su ausencia (ensayo control). Las muestras se lisaron por calentamiento en presencia de *buffer* de muestra para SDS-PAGE reductor 1X y se sembraron en un gel al 18 %. Luego, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con α -*Lin1CGrx* (1/1000) y α -*LinLp32* (1/5000). Como anticuerpo secundario se empleó una dilución 1/10000 de un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP comercial (Thermo Scientific). Finalmente, las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia y su identidad se determinó por comparación con un marcador de masa molecular.

4.5.6. Discusión

Las Grxs pertenecen a una amplia familia de tiol oxidorreductasas que regulan y mantienen el estado redox celular junto a la Trx (Lillig, C.H. y col. 2008; Couturier, J. y col. 2015). Las Grxs están mayormente involucradas en la glutationilación o deglutationilación de proteínas, mientras que las Trxs están, en mayor medida,

implicadas en la reducción de puentes disulfuros proteicos (Dalle-Donne, I. y col. 2007; Dalle-Donne, I. y col. 2009; Couturier, J. y col. 2015). Estas modificaciones post-traduccionales modulan la función de proteínas, ya sea como mecanismo de regulación, en procesos de señalización o bien, como un mecanismo protector de la oxidación irreversible de los residuos de Cys (Dalle-Donne, I. y col. 2007; Dalle-Donne, I. y col. 2009; Couturier, J. y col. 2015). De acuerdo al número de residuos de Cys en el sitio activo han sido clasificadas en monotiólicas (CGFS, CSYS, CPYS) o ditiólicas (CPY/FC). Tanto las Grxs ditiólicas como monotiólicas pueden unir centros Fe-S (Alves, R. y col. 2009; Couturier, J. y col. 2009). En las Grxs que unen centros Fe-S la actividad disulfuro reductasa puede ser innecesaria o secundaria. Las Grxs pueden participar como *delivery* de centros Fe-S a diferentes proteínas blancas. En relación a la importancia que revisten estas proteínas en la homeostasis celular, se presentó en este capítulo el estudio de las Grxs identificadas en *L. interrogans*. En el proyecto genoma de *L. interrogans* han sido identificadas, una secuencia codificante para una 2CGrx así como también una secuencia codificante para una 1CGrx. La *Lin2CGrx* presenta en su sitio activo el motivo conservado CPYC de las Grxs clásicas.

En relación a las propiedades funcionales, *Lin2CGrxs* mostró capacidad de reducir disulfuros mixtos con GSH (ensayo de reducción de HED) así como DHA. Esto último, podría indicar la posible presencia de este metabolito (y su par, ascorbato) en la *L. interrogans*. Los resultados obtenidos indicaron además, que *LinMsrB* Δ 35N es eficientemente reducida por la *Lin2CGrx*, convirtiéndose ésta en un posible reductor fisiológico. Futuros ensayos podrían explicar el mecanismo de esta reacción. Según lo reportado por Tarrago, L. y col. (2009), en la mayoría de las 1CysMsrB la reducción de la Cys reactiva, de la forma de sulfénico a la forma tiol, podría ser catalizada por las Grxs a través dos mecanismos. Un mecanismo implicaría la reducción por acción directa de la Grx (en forma similar al mecanismo catalítico de las Trx) (Tarrago, Laugier et al. 2009). Otro mecanismo podría involucrar la reducción de la MsrB glutationilada, luego de la reducción del ácido sulfénico por el GSH con la concomitante acción de la *Lin2CGrx* en el reciclo de la *LinMsrB* Δ 35N oxidada (**Figura 94**) (Tarrago, Laugier et al. 2009). Esto último está asociado a la capacidad ampliamente descrita de las Grx de deglutationilar proteínas. (Gallogly, M.M. y col. 2007).

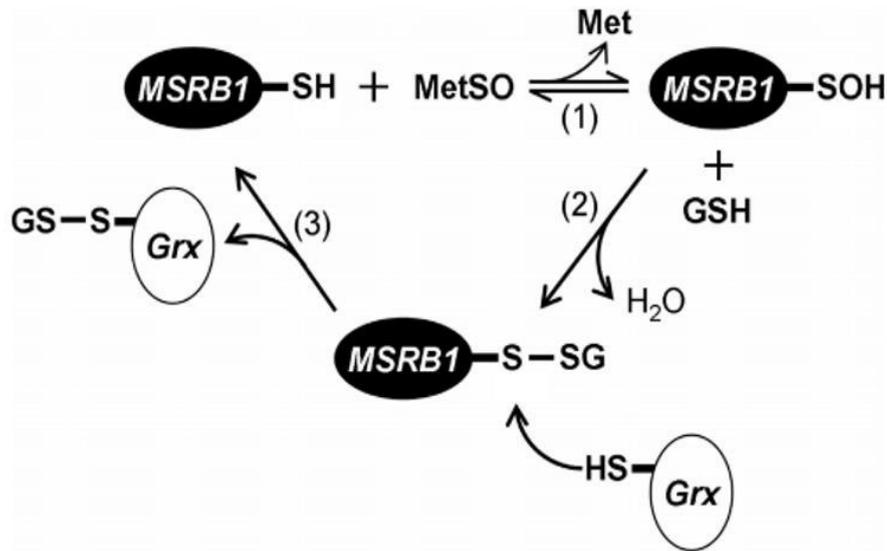


Figura 94 | Esquema del mecanismo de reducción de MsrB (de 1Cys) mediada por Grxs. (1) Reducción de MetSO con liberación de Met, y formación de un intermediario sulfénico estable en la Cys catalítica. (2) Ataque del sulfénico por GSH con liberación de una molécula de H₂O y formación de un aducto con GSH, (3) el cual es resuelto por la Grx a través de la Cys N-terminal del sitio activo. Imagen tomada de Tarrago, L. y col. (2009).

Como se mencionó en el capítulo 1, se pudo detectar actividad Grx en los extractos celulares de *L. interrogans* al realizar el clásico ensayo de HED. En este capítulo se describió que de las Grxs obtenidas en forma recombinante, solo la *Lin2CGrx* presentó actividad disulfuro reductasa mediante ese ensayo. Este resultado permite inferir que la actividad detectada a partir de los extractos proteicos de *L. interrogans* sería a expensas de *Lin2CGrx*, indicando la presencia de esta proteína en la bacteria. Por otro lado, los ensayos de *western blot* permitieron la identificación de la *Lin1CGrx*. En virtud de estos estudios, se puede confirmar la presencia de ambas Grxs en esta bacteria.

La *Lin1CGrx* es una Grx monotiólica simple dominio que, al contraste de *Lin2CGrx*, mostró muy baja actividad disulfuro reductasa. Esta proteína exhibió capacidad de unir centros Fe-S *in vivo*. La apo-*Lin1CGrx* presentó una estructura nativa monomérica, mientras que la holo-*Lin1CGrx* mostró una estructura homodimérica. El centro Fe-S coordinado a la *Lin1CGrx* presenta una estructura del tipo rómbica, común en este tipo de proteínas (Bandyopadhyay, S. y col. 2008; Comini, M.A. y col. 2008; Iwema, T. y col. 2009; Tarrago, L. y col. 2009). Los resultados obtenidos sugieren que la *Lin1CGrx* tendría un rol crítico en el metabolismo del Fe. Este supuesto fue sustentado por el hecho de que la expresión de esta proteína en cepas mutantes de levaduras en

Grx5 revirtió su fenotipo mutante, presentando un desarrollo similar a la cepa parental. La *SceGrx5* forma parte de la maquinaria mitocondrial involucrada en la síntesis y ensamblado de los centros de Fe-S. Su ausencia causa (entre otras) inactivación de enzimas que requieren de centros Fe-S para su actividad (Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 2002). Por lo tanto, la probable homología funcional de la *Lin1CGrx* con la *SceGrx5* la convertiría en una proteína de notable importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Esto último es debido, a que la bacteria presenta un metabolismo aeróbico (Adler, B. 2014) y entre las enzimas que requieren centros Fe-S para ser funcionales se encuentran la aconitasa (LIC 20249) y la succinato deshidrogenasa (LIC12003). Como se mencionó previamente, la funcionalidad de esas enzimas ha disminuido drásticamente en levaduras mutantes en *Grx5*, conduciendo a una menor tasa de desarrollo (Rodríguez-Manzanaque, M.T. y col. 2002). En forma similar, se podría plantear que la ausencia de la *Lin1CGrx* podría causar un fenotipo que presente menor tasa de crecimiento (o ser letal) en *Leptospiras*.

Como fue mencionado en la introducción, los centros Fe-S constituyen los cofactores inorgánicos más versátiles, los cuales participan en reacciones de transferencia de electrones, catálisis y procesos regulatorios (Lill, R. 2009). Existen diversos tipos de centros Fe-S siendo los más simples químicamente (y abundantes) los tipo rómbicos [2Fe-2S] y cúbicos [4Fe-4S] (Jang, S. 2010). Los primeros son los tipos de centros Fe-S que coordinan las Grx en su gran mayoría (Bandyopadhyay, S. y col. 2008; Comini, M.A. y col. 2008; Iwema, T. y col. 2009; Tarrago, L. y col. 2009) (incluyendo a *Lin1CGrx*, como se describe en este capítulo). Los centros Fe-S son integrados en proteínas a través de coordinación de los iones de Fe con residuos de Cys o His. A pesar de su relativa simplicidad en su estructura y composición, la síntesis y ensamblado en apo-proteínas es un proceso altamente complejo y coordinado. En las bacterias existen dos maquinarias encargadas de la biogénesis de proteínas Fe-S, estas son ISC y SUF. En *E.coli*, la primera maquinaria de biogénesis es activa en condiciones normales, mientras que la segunda (SUF) es activa en situaciones de estrés, así como también bajo condiciones limitantes de Fe. *L. interrogans* requiere Fe para su crecimiento, y la disponibilidad de éste disminuye durante la infección en el hombre (Lo, M. y col. 2010). De acuerdo a esto último, y en analogía con lo descrito para *E. coli*, podría explicarse que las secuencias identificadas en el proyecto genoma de este patógeno fuesen las codificantes para los componentes de la maquinaria SUF. Brevemente, en un sistema SUF la biogénesis es iniciada por la Cys desulfurasa SufS, la

cual transfiere el S a un conservado residuo de Cys en SufE, la cual lo une en la forma de persulfito (-SSH). Los dadores de Fe y electrones en este sistema permanecen desconocidos. Los centros Fe-S “transitorios” son transferidos a una proteína *scaffold* para su ensamblado y subsecuente transferencia de los centros preformados a apo-proteínas (Lill, R. 2009; Bandyopadhyay, S. y col. 2013). Entre las proteínas *scaffold* se pueden nombrar: SufU, SufA, SufB (que forma un complejo estable con SufC-SufD). SufC es una ATPasa, la cual puede facilitar la disociación del centro Fe-S de SufB y la subsecuente transferencia a una apo-proteína (Lill, R. 2009). Los genes hallados en *L. interrogans* codificarían para una putativa SufS- SufE (LIC11054) y SufB (LIC11220). Además *L. interrogans* presenta secuencias codificantes para NifU (LIC10635), los cuales junto con la *Lin1CGrx* podrían transferir eficientemente los centros Fe-S a proteínas aceptoras, actuando como chaperonas en el ensamblado en proteínas *scaffold* tipo U tal como ha sido informado por Bandyopadhyay, S. y col. (2013). Aunque también ha sido reportado que Nfu y Grx sirven como *scaffold* primarios en sistemas de tipo SUF (Bandyopadhyay, S. y col. 2013).

La identificación de un gen codificante para BolA (LIC11808 y LIC11806) en el genoma de *L. interrogans*, indica que podría existir una interacción entre ésta y la *Lin1CGrx*, similar a lo que ha sido informado para organismos eucariotas y procariotas (Yeung, N. y col. 2011; Li, H. y col. 2012; Frey, A.G. y col. 2016). La interacción entre estas proteínas puede facilitar la incorporación de Fe-S en proteínas que funcionan en los mecanismos de ensamblado de centros Fe-S. Tal como se mencionó previamente esta especie patógena presentaría una maquinaria de síntesis de centro Fe-S tipo SUF. Por lo tanto, la *Lin1CGrx* también podría interactuar con SufE (cuya secuencia ha sido identificada en el genoma del patógeno). Por lo tanto, la interacción entre las tres proteínas podría (de manera similar a lo que ocurre en otros organismos) facilitar la conversión de la holo-Grx a apo-Grx con la subsecuente transferencia de los centros Fe-S a apo-proteínas, y confiriéndoles funcionalidad (Yeung, N. y col. 2011; Couturier, J. y col. 2014). Entre estas, además de las mencionadas anteriormente, podría citarse a la ferredoxina, previamente estudiada en este organismo (Catalano-Dupuy, D.L. y col. 2011; Soldano, A. y col. 2014).

Adicionalmente, fue puesto de manifiesto la capacidad de ambas Grxs (1CGrx y 2CGrx) de S-glutationilarse. En virtud de ello, se podría inferir una capacidad de las mismas para transferir GSH o eliminarlo (a partir de disulfuros mixtos) de otras proteínas. En otras palabras, podrían estar involucradas en reacciones

deglutinationilación y transglutinationilación. Así mismo, se determinó una modificación en el grupo -SH (en la única Cys disponible en su secuencia primaria) de la *Lin1CGrx* por una reacción de S-nitrosilación. En analogía, al proceso de S-glutinationilación, la *Lin1CGrx* podría participar de reacciones de transnitrosilación con otras proteínas. Ambas modificaciones post-traduccionales permiten regular la estructura y función de otras proteínas en respuesta a una situación de estrés, o bien mediar mecanismos de señalización (Wu, C. y col. 2011; Sengupta, R. y col. 2013). Los ensayos cinéticos señalaron que *Lin2CGrx* no presenta actividad reductasa sobre GSNO. Esto podría ser un indicio de que la misma no asistiría reacciones de denitrosilación.

Se detectó *Lin1CGrx* mediante *western blot* en los extractos bacterianos en condiciones basales de cultivo. Su contenido celular no se modificó significativamente bajo condiciones de estrés oxidativo por peróxidos y HClO. Contrariamente, en presencia de CysNO fue registrada una marcada disminución del contenido celular de la proteína. Los ensayos realizados podrían sugerir que en presencia de NO (derivado de la CysNO) se produce la nitrosilación de los centros Fe-S unido a diversas proteínas (como *Lin1CGrx*). Esta modificación de los centros Fe-S, no sólo podría traer aparejada la pérdida de la función de algunas de las proteínas blanco, sino que también podría generar la desproporción de los centros Fe-S. Esto último conllevaría a la liberación del Fe, aumentando su concentración libre. Este aumento del Fe libre, mediante la reacción de Fenton, generaría una situación de estrés oxidativo más exacerbada estimulando el daño a diferentes componentes celulares. Como se mencionó anteriormente, esto conduce a la expresión de proteasas y chaperonas (Gray, M.J. y col. 2013), lo que trae aparejado la degradación de las diversas proteínas dañadas.

En conclusión, en este capítulo fueron estudiadas las propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias de las Grx (ditiólica y monotiólicas) identificadas en *L. interrogans*. Los resultados obtenidos que se presentaron en este capítulo representan los primeros datos sobre la existencia de estas proteínas en este patógeno. Dentro de los interrogantes generados durante el trabajo de Tesis se incluye la identificación de proteínas blancas de estas proteínas, como también la posible implicancia de estas Grx en la homeostasis de los centros Fe-S *in vivo*. Es por ello que los resultados aquí obtenidos son sólo un punto de partida para profundizar en el entendimiento de la bioquímica redox y fisiología de este patógeno.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de Tesis se pudieron enunciar las siguientes conclusiones:

- Se determinó actividad de diferentes enzimas en extractos proteicos provenientes de cultivos de ambas especies de leptospiras. *L. interrogans* presentó mayores valores de actividades enzimáticas que *L. biflexa*; para catalasa, GCL, GR y GST. Sin embargo, mostró similar actividad TrxR y Grx que la especie no patógena. La única entidad que exhibió mayor actividad en *L. biflexa* fue la GS. Estas mediciones constituyeron el punto de partida para indagar sobre el escenario metabólico de óxido-reducción en estas bacterias.
- Se optimizaron los sistemas de expresión para permitir la obtención en forma recombinante de diferentes enzimas de Leptospiras, relacionadas con su metabolismo redox. En la mayoría de los casos, los sistemas de expresión logrados permitieron obtener las enzimas fusionadas a una cola de poli-His lo que permitió su purificación en un único paso y con elevado grado de pureza. En otros casos, la purificación a homogeneidad y en forma soluble de las proteínas implicó un proceso un poco más complejo. Este último, incluyó la fusión de la proteína a un *cassette* hacia el extremo N-terminal. Este *cassette* estaba compuesto por una cola de poli-His fusionada a la MBP y hacia el C-terminal el sitio canónico de reconocimiento de la TEV proteasa. La purificación en estos casos ocurrió en cuatro pasos: i) IMAC, ii) corte proteolítico con TEV proteasa, iii) cromatografía de afinidad por amilosa e iv) IMAC, nuevamente.

Sobre la *Lincatalasa*:

- La *Lincatalasa* fue expresada en forma recombinante y presentó una estructura homotetramérica.
- Las características funcionales evaluadas indicaron que la *Lincatalasa* podría ser una enzima bifuncional aunque posea una estructura primaria similar a otras catalasas monofuncionales.
- El *t*-BuOOH así como también el HClO ejercieron un efecto inhibitorio sobre la enzima. La inactivación a expensas del HClO trajo aparejado

cambios es la estructura de la proteína, con la consecuente formación de agregados de elevada masa molecular.

- También pudo informarse que la CySNO provocó nitrosilación reversible sobre el grupo hemo de la proteína, sin que eso genere cambios en su actividad (en presencia de H₂O₂), ni en su estructura oligomérica.
- Los ensayos de *western blot* revelaron la presencia de la proteína en extractos bacterianos. Su contenido celular no se modificó significativamente en presencia de H₂O₂, *t*-BuOOH, y una casi indetectable disminución fue observada en presencia de CySNO. Contrariamente, una respuesta dual fue registrada en presencia de HClO. Esto significó, un aumento del contenido de la proteína a nivel celular a bajas concentraciones del agente, y una proteólisis a elevadas concentraciones.

Sobre el sistema tiorredoxina:

- La *LinTrxR*, la *LbiTrxR1* y la *LbiTrxR2*, fueron obtenidas en forma recombinante. Presentaron una estructura homodimérica, y en cada subunidad se detectó una molécula de FAD (como grupo prostético).
- La *LinTrxR* y la *LbiTrxR1* exhibieron actividad disulfuro reductasa (de manera NADPH dependiente), siendo capaces de emplear DTNB y *LinTrx* como sustratos. También fueron capaces de reducir sustratos no disulfuros como MBQ y K₃Fe(CN)₆, aunque su eficiencia de catálisis fue entre dos y tres órdenes de magnitud inferior respecto a los anteriores. No obstante no fueron capaces de reducir disulfuros de baja masa molecular, tales como, GSSG, lipoamida, cistina y bis- γ -GC.
- Se determinó que el NADP⁺ presenta un mecanismo de inhibición competitivo respecto al NADPH y un mecanismo de tipo mixto respecto a la *LinTrx*. Este resultado señala que ambos sustratos se unirían a sitios diferentes en las dos TrxR estudiadas.
- La *LinTrxR* y la *LbiTrxR1* fueron inhibidas por iones de metales pesados como: Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ y Hg²⁺. También se inhibió su actividad DTNB reductasa en presencia de mercurocromo, azul de metileno, quercetina y piocianina.
- Se demostró que el azul de metileno es un sustrato subversivo para la enzima, y se puso en evidencia un efecto sinérgico entre la *LinTrxR* y la *LinTrx*, para la reducción del mismo.

- La *LbiTrxR2* no mostró funcionalidad en los ensayos *in vitro*. Esto se lo asoció a la ausencia en su secuencia primaria de residuos necesarios para la unión de la coenzima reducida. La única evidencia de funcionalidad de la misma fue determinada a partir de un ensayo de inhibición en disco, donde células de *E. coli* sobre expresantes en *LbiTrxR2* mostraron mayor desarrollo en presencia de H_2O_2 y *t*-BuOOH, respecto al ensayo control.
- La *LinTrx* fue obtenida en forma recombinante y presentó una estructura monomérica.
- La *LinTrx* fue eficiente en la reducción de disulfuros de baja masa molecular (contrariamente a su par redox) así como también, en la reducción de γ -GCSNO (pero no CysNO ni GSNO).
- El sistema Trx fue eficiente en mediar la transferencia de electrones a la *LinAhpC* para la reducción de peróxidos. Las eficiencias de catálisis estimadas se encontraron dentro del mismo orden de magnitud a las reportadas previamente con un sistema Trx heterólogo.
- Se evaluó la capacidad de la *LinTrx* de *S*-nitrosilarse y *S*-glutacionilarse, indicando un posible rol de la misma en mecanismos post-traduccionales.

Sobre los cultivos de Leptospiras:

- *L. interrogans* presentó mayor actividad catalasa que *L. biflexa*. La actividad catalasa detectada en la especie patógena se inhibió en presencia de *t*-BuOOH (similar a lo obtenido en los ensayos *in vitro*)
- *L. interrogans* presentó similar tolerancia frente a ambos peróxidos, aunque exhibió una mayor capacidad de detoxificar H_2O_2 que *t*-BuOOH. Por el contrario, *L. biflexa* mostró mayor tolerancia a *t*-BuOOH que a H_2O_2 , probablemente debido a la baja actividad catalasa determinada para esta especie bacteriana.
- La *LinTrxR*, la *LinTrxR1* y la *LinAhpC* fueron detectadas en extractos celulares bacterianos con una elevada abundancia relativa.
- En ensayos de *western blot* se observó un aumento en la intensidad de la señal de la *LinAhpC* en ambas especies bacterianas luego de su exposición a H_2O_2 y a *t*-BuOOH. Resultado consistente, para la especie patógena, con la capacidad detectada *in vitro* para reducir ambos peróxidos.
- *L. interrogans* exhibió mayor número de tioles totales, tanto en forma basal como en condiciones estrés en comparación con *L. biflexa*.

- Se registró sobre-oxidación de *LinAhpC*, con la consecuente disminución de la forma dimérica (disulfuro activo) con la concentración de peróxido, y un concomitante incremento de la misma en su forma monomérica. En relación con esto se determinó además, que la *LinAhpC* carece de actividad chaperona *in vivo* bajo condiciones de estrés oxidativo, debido a su incapacidad para formar oligómeros de alta masa molecular.
- Es de remarcar la disminución percibida en el crecimiento de *L. interrogans* en presencia de azul de metileno. En los ensayos *in vitro* se evaluó inhibición de la *LinTrxR* a expensas de éste, lo cual señala la posibilidad de que esta enzima pueda considerarse como un potencial blanco molecular para el diseño de fármacos.

Sobre la *LinGCL*:

- La enzima se obtuvo en forma recombinante y presentó una estructura monomérica.
- Se estableció que la *LinGCL* utiliza como sustratos al Glu, Cys y ATP. Alternativamente empleó como sustratos a: Ser, Cistina, Asp (aunque en menor proporción) y GTP-Mg²⁺ (con la misma eficiencia que ATP-Mg²⁺).
- Se detectó actividad de la enzima con γ -GC, Glu y ATP-Mg²⁺ (o GTP-Mg²⁺).
- Se pudo observar inhibición de la actividad enzimática de la *LinGCL* (en presencia de Glu, Cys y ATP-Mg²⁺ o GTP-Mg²⁺) tanto por GSH como por γ -GC.
- La inhibición por γ -GC fue de tipo reversible competitiva lineal respecto a ambos aminoácidos sustratos de la enzima (Cys y Glu). Sin embargo, no presentó un efecto inhibitorio respecto al ATP.
- El contenido de tioles totales se incrementó en las células de *E. coli* que expresan a la *LinGCL*.

Sobre las Msrs:

- Dos tipos de Msrs (*LinMsrA2* y *LinMsrB*) fueron obtenidas en forma recombinante (no así la otra isoforma de MsrA, *LinMsrA1*) y ambas presentaron una estructura nativa monomérica.

- Ambas Msrs aceptaron DTT como reductor y mostraron especificidad por cada uno de los isómeros de L-Met(*R,S*)SO. La *LinMsrA2* fue específica para el isómero *S* y la *LinMsrB* lo fue para el isómero *R*.
- *LinMsrA2* empleó la *LinTrx* como posible reductor fisiológico, y alternativamente, a N-Acetil-MetSO y L-Met(*R,S*)SO, con la misma eficiencia catalítica.
- La *LinMsrB* usó el par *Lin2CGrx*/GSH como reductor fisiológico y empleó como sustrato, únicamente, a L-Met(*R,S*)SO.
- Las isoformas de *LinMsrB* con los distintos iones metálicos fueron funcionales (pudiendo reducir MetSO a Met) en forma independiente de la presencia o naturaleza de metal.
- La *LinMsrB* permitió revertir parcialmente la inactivación de la *Lincatalasa* a expensas de HClO. Esto señala que una parte de la inactivación observada por la enzima sería a expensas de la oxidación de sus residuos de Met.
- Ensayos de complementación de cepas de levaduras mutantes en sus tres Msrs endógenas, confirmaron la funcionalidad de las tres Msrs (inclusive la *LinMsrA1* no obtenida en forma recombinante) descritas en el proyecto genoma de *L. interrogans*. También, permitieron corroborar sus selectividades y especificidades por cada uno de los isómeros.
- Las cepas de levaduras transformadas con *LinMsrA1* y con *LinMsrA2* presentaron mayor desarrollo que la triple mutante en presencia de H₂O₂.
- Curiosamente, la cepa de levadura transformada con la *LinMsrA1* proliferó más que las restantes (aún más que la parental) en presencia de HClO, señalando además una actividad antioxidante para esta isoforma de MsrA.

Sobre las Grxs:

- Tanto *Lin2CGrx* como *Lin1CGrx* fueron obtenidas en forma recombinante.
- La *Lin2CGrx* y la apo-*Lin1CGrx* mostraron una estructura monomérica, mientras que la holo-*Lin1CGrx* tiene una estructura dimérica.
- Se determinó una estructura rómbica tipo 2Fe-2S para el centro Fe-S coordinado por la *Lin1CGrx*.
- *Lin1CGrx* exhibió un retraso en la movilidad electroforética en presencia de GSSG y H₂O₂. Los cambios registrados indicarían la posible formación de dímeros covalentes por la proteína.

- Se detectó una banda fluorescente correspondiente a la formación de un disulfuro mixto entre la *Lin1CGrx* y Di-E-GSSG, señalando de este modo, la capacidad de la proteína de glutationilarse.
- La *Lin1CGrx* reducida y tratada con GSNO presentó aproximadamente un grupo -SNO por mol, indicando que la única Cys identificada en su secuencia primaria puede ser nitrosilada.
- Ambas Grxs presentan muy baja capacidad de reducir los disulfuros proteicos (como los de la insulina bovina) con respecto a *LinTrx*.
- La *Lin2CGrx* mostró actividad disulfuro reductasa utilizando GSH y HED como sustratos. Por otro lado, *Lin1CGrx* no exhibió actividad significativa empleando el mismo ensayo.
- La *Lin2CGrx* catalizó la reducción del ácido dehidroascórbico (DHA).
- La *Lin1CGrx* fue reducida por el sistema Trx homólogo, permitiendo la transferencia de los equivalentes de reducción al GSSG.
- La *Lin1CGrx* complementó el fenotipo de una cepa de levadura mutante en *SceGr5* (1CGrx), permitiendo su crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono, y a niveles similares que la cepa parental. Así mismo, incrementó la resistencia a la condición de estrés oxidativo (generado por la presencia de H₂O₂ exógeno).
- La complementación con *Lin1CGrx* de la cepa mutante, mostró una tasa de consumo de O₂ similar a la de la cepa parental, señalando su posible contribución en el ensamblado de centros Fe-S en enzimas que forman parte del ciclo de Krebs y cadena transportadora de electrones.
- Un ensayo de *western blot* reveló la presencia de la *Lin1CGrx* en *L. interrogans*. Los estresores ensayados no modificaron su abundancia celular a excepción de la CySNO.

En su conjunto, los resultados de este trabajo de Tesis proporcionan un aporte al entendimiento del metabolismo redox presente en *L. interrogans*, a la relación estructura/función y a la interacción de entre las enzimas involucradas en el mismo. Así mismo, constituyen el punto de partida hacia nuevos estudios de los mecanismos de regulación de las enzimas que forman parte de los sistemas antioxidantes, así como la implicancia de éstos como factores de virulencia y patogenicidad para la bacteria modelo de estudio.

El siguiente esquema resume el panorama del metabolismo redox presente en *L. interrogans*. Se incluyen las enzimas cuya funcionalidad ha sido puesto de manifiesto, así como también algunos componentes, que con los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, fue posible inferir su presencia (sustentados, en algunos casos, con la identificación de secuencias codificantes en el genoma de la bacteria).

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, J.J., Ford, J.L. y Phillips, M.A. (2002). *Substrate binding determinants of Trypanosoma brucei gamma-glutamylcysteine synthetase*. *Biochemistry* 41(8): 2741-2750.
- Adler, B. (2014). *Current Topics in Microbiology and Immunology: Leptospira and Leptospirosis*. New York. United States, Springer. 387.
- Adler, B. y de la Pena Moctezuma, A. (2010). *Leptospira and leptospirosis*. *Vet Microbiol* 140(3-4): 287-296.
- Alamuri, P. y Maier, R.J. (2006). *Methionine sulfoxide reductase in Helicobacter pylori: interaction with methionine-rich proteins and stress-induced expression*. *J Bacteriol* 188(16): 5839-5850.
- Ali, V. y Nozaki, T. (2013). *Iron-Sulphur Clusters, Their Biosynthesis, and Biological Functions in Protozoan Parasites*. En: *Advances in Parasitology*, Elsevier. 83: 1-92.
- Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A. y Herrero, E. (2009). *Evolution based on domain combinations: the case of glutaredoxins*. *BMC Evol Biol* 9: 66.
- Amineni, U., Pradhan, D. y Marisetty, H. (2010). *In silico identification of common putative drug targets in Leptospira interrogans*. *J Chem Biol* 3(4): 165-173.
- Anand, P. y Stamler, J.S. (2012). *Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease*. *J Mol Med (Berl)* 90(3): 233-244.
- Apontoweil, P. y Berends, W. (1975). *Glutathione biosynthesis in Escherichia coli K 12. Properties of the enzymes and regulation*. *Biochim Biophys Acta* 399(1): 1-9.
- Apontoweil, P. y Berends, W. (1975a). *Isolation and initial characterization of glutathione-deficient mutants of Escherichia coli K 12*. *Biochim Biophys Acta* 399(1): 10-22.
- Aran, M., Caporaletti, D., Senn, A.M., Tellez de Inon, M.T., Girotti, M.R., Llera, A.S. y Wolosiuk, R.A. (2008). *ATP-dependent modulation and autophosphorylation of rapeseed 2-Cys peroxiredoxin*. *Febs J* 275(7): 1450-1463.
- Aran, M., Ferrero, D.S., Pagano, E. y Wolosiuk, R.A. (2009). *Typical 2-Cys peroxiredoxins-modulation by covalent transformations and noncovalent interactions*. *Febs J* 276(9): 2478-2493.
- Arias, D.G., Cabeza, M.S., Erben, E.D., Carranza, P.G., Lujan, H.D., Tellez Inon, M.T., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2011). *Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from Trypanosoma spp*. *Free Radic Biol Med* 50(1): 37-46.
- Arias, D.G., Carranza, P.G., Lujan, H.D., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2008). *Immunolocalization and enzymatic functional characterization of the thioredoxin system in Entamoeba histolytica*. *Free Radic Biol Med* 45(1): 32-39.
- Arias, D.G., Gutierrez, C.E., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2007). *Thioredoxin-linked metabolism in Entamoeba histolytica*. *Free Radic Biol Med* 42(10): 1496-1505.
- Arias, D.G., Marquez, V.E., Chiribao, M.L., Gadelha, F.R., Robello, C., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2013). *Redox metabolism in Trypanosoma cruzi: functional characterization of tryparedoxins revisited*. *Free Radic Biol Med* 63: 65-77.

- Arias, D.G., Pineyro, M.D., Iglesias, A.A., Guerrero, S.A. y Robello, C. (2015). *Molecular characterization and interactome analysis of Trypanosoma cruzi tryparedoxin II*. J Proteomics 120: 95-104.
- Arias, D.G., Regner, E.L., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2012). *Entamoeba histolytica thioredoxin reductase: molecular and functional characterization of its atypical properties*. Biochim Biophys Acta 1820(12): 1859-1866.
- Arias, D.G., Reinoso, A., Sasoni, N., Hartman, M.D., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2014). *Kinetic and structural characterization of a typical two-cysteine peroxiredoxin from Leptospira interrogans exhibiting redox sensitivity*. Free Radic Biol Med 77: 30-40.
- Ariyanayagam, M.R. y Fairlamb, A.H. (1999). *Entamoeba histolytica lacks trypanothione metabolism*. Molecular and biochemical parasitology 103(1): 61-69.
- Arner, E.S. y Holmgren, A. (2000). *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. Eur J Biochem 267(20): 6102-6109.
- Austin, J.E., Barbieri, J.T., Corin, R.E., Grigas, K.E. y Cox, C.D. (1981). *Distribution of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities among Treponema pallidum and other spirochetes*. Infect Immun 33(2): 372-379.
- Azócar-Aedo, L., Smits, H.L. y Montic, G. (2014). *Leptospirosis in dogs and cats: epidemiology, clinical disease, zoonotic implications and prevention*. Archivos de medicina veterinaria 46
- Baker, L.M., Raudonikiene, A., Hoffman, P.S. y Poole, L.B. (2001). *Essential thioredoxin-dependent peroxiredoxin system from Helicobacter pylori: genetic and kinetic characterization*. J Bacteriol 183(6): 1961-1973.
- Bandyopadhyay, S., Chandramouli, K. y Johnson, M.K. (2013). *Iron-Sulphur Cluster Biosynthesis*. Biochem Soc Trans. 36: 1112-1119.
- Bandyopadhyay, S., Gama, F., Molina-Navarro, M.M., Gualberto, J.M., Claxton, R., Naik, S.G., Huynh, B.H., Herrero, E., Jacquot, J.P., Johnson, M.K. y Rouhier, N. (2008). *Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters*. Embo J 27(7): 1122-1133.
- Banerjee, R. (2008). Redox Biochemistry. Hoboken, New Jersey, Wiley Interscience.
- Bao, R., Zhang, Y., Zhou, C.Z. y Chen, Y. (2009). *Structural and mechanistic analyses of yeast mitochondrial thioredoxin Trx3 reveal putative function of its additional cysteine residues*. Biochim Biophys Acta 1794(4): 716-721.
- Barranco-Medina, S., Lazaro, J.J. y Dietz, K.J. (2009). *The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function*. FEBS Lett 583(12): 1809-1816.
- Belli, G., Polaina, J., Tamarit, J., De La Torre, M.A., Rodriguez-Manzaneque, M.T., Ros, J. y Herrero, E. (2002). *Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein*. J Biol Chem 277(40): 37590-37596.
- Ben-Menachem, G., Himmelreich, R., Herrmann, R., Aharonowitz, Y. y Rottem, S. (1997). *The thioredoxin reductase system of mycoplasmas*. Microbiology 143 (Pt 6): 1933-1940.

- Boschi-Muller, S., Azza, S. y Branlant, G. (2001). *E. coli* methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci* 10(11): 2272-2279.
- Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. y Branlant, G. (2005). *The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases*. *Biochim Biophys Acta* 1703(2): 231-238.
- Boylan, J.A., Hummel, C.S., Benoit, S., Garcia-Lara, J., Treglown-Downey, J., Crane, E.J., 3rd y Gherardini, F.C. (2006). *Borrelia burgdorferi* bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response. *Mol Microbiol* 59(2): 475-486.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown, G.C. (1995). *Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide*. *Eur J Biochem* 232(1): 188-191.
- Buchholz, K., Schirmer, R.H., Eubel, J.K., Akoachere, M.B., Dandekar, T., Becker, K. y Gromer, S. (2008). *Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(1): 183-191.
- Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P.A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D.P., Peterson-Burch, B., Coppel, R.L., Rood, J.I., Davies, J.K. y Adler, B. (2006). *Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(39): 14560-14565.
- Canale-Parola, E. (1977). *Physiology and evolution of spirochetes*. *Bacteriol Rev* 41(1): 181-204.
- Carlberg, I. y Mannervik, B. (1985). *Glutathione reductase*. En: *Methods Enzymol*, Elsevier B.V. 113: 484-490.
- Carvalho, E., Barbosa, A.S., Gomez, R.M., Oliveira, M.L., Romero, E.C., Goncales, A.P., Morais, Z.M., Vasconcellos, S.A. y Ho, P.L. (2010). *Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases*. *Curr Microbiol* 60(2): 134-142.
- Catalano-Dupuy, D.L., Musumeci, M.A., Lopez-Rivero, A. y Ceccarelli, E.A. (2011). *A highly stable plastidic-type ferredoxin-NADP(H) reductase in the pathogenic bacterium Leptospira interrogans*. *PLoS One* 6(10): e26736.
- Catalano-Dupuy, D.L., Musumeci, M.A., López-Rivero, A. y Ceccarelli, E.A. (2011). *A highly stable plastidic-type Ferredoxin-NADP (H) reductase in the pathogenic bacterium leptospira interrogans*. *PLoS One* 6(10): e26736.
- Cerqueira, G.M. y Picardeau, M. (2009). *A century of Leptospira strain typing*. *Infect Genet Evol* 9(5): 760-768.
- Cinco, M. (2010). *New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences*. *New Microbiol* 33(4): 283-292.
- Circu, M.L. y Aw, T.Y. (2010). *Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis*. *Free Radic Biol Med* 48(6): 749-762.

- Collet, J.F. y Messens, J. (2010). *Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins*. *Antioxid Redox Signal* 13(8): 1205-1216.
- Comini, M.A., Krauth-Siegel, R.L. y Bellanda, M. (2013). *Mono- and dithiol glutaredoxins in the trypanothione-based redox metabolism of pathogenic trypanosomes*. *Antioxid Redox Signal* 19(7): 708-722.
- Comini, M.A., Rettig, J., Dirdjaja, N., Hanschmann, E.M., Berndt, C. y Krauth-Siegel, R.L. (2008). *Monothiol glutaredoxin-1 is an essential iron-sulfur protein in the mitochondrion of African trypanosomes*. *J Biol Chem* 283(41): 27785-27798.
- Cooper, C.E. (1999). *Nitric oxide and iron proteins*. *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 290-309.
- Copeland, R.A. (2005). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. *Methods Biochem Anal* 46: 1-265.
- Coppo, L., Montano, S.J., Padilla, A.C. y Holmgren, A. (2016). *Determination of glutaredoxin enzyme activity and protein S-glutathionylation using fluorescent eosin-glutathione*. *Anal Biochem* 499: 24-33.
- Corin, R.E., Boggs, E. y Cox, C.D. (1978). *Enzymatic degradation of H₂O₂ by Leptospira*. *Infect Immun* 22(3): 672-675.
- Corin, R.E. y Cox, C.D. (1980). *Characterization of leptospiral catalase and peroxidase*. *Can J Microbiol* 26(2): 121-129.
- Couturier, J., Jacquot, J.P. y Rouhier, N. (2009). *Evolution and diversity of glutaredoxins in photosynthetic organisms*. *Cell Mol Life Sci* 66(15): 2539-2557.
- Couturier, J., Jacquot, J.P. y Rouhier, N. (2013). *Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses*. *Front Plant Sci* 4: 518.
- Couturier, J., Przybyla-Toscano, J., Roret, T., Didierjean, C. y Rouhier, N. (2015). *The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions?* *Biochim Biophys Acta* 1853(6): 1513-1527.
- Couturier, J., Wu, H.C., Dhalleine, T., Pegeot, H., Sudre, D., Gualberto, J.M., Jacquot, J.P., Gaymard, F., Vignols, F. y Rouhier, N. (2014). *Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of Arabidopsis thaliana BolA2 and SufE1*. *Mol Plant* 7(1): 187-205.
- Chelikani, P., Fita, I. y Loewen, P.C. (2004). *Diversity of structures and properties among catalases*. *Cell Mol Life Sci* 61(2): 192-208.
- Chen, Y., Shertzer, H.G., Schneider, S.N., Nebert, D.W. y Dalton, T.P. (2005). *Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels*. *J Biol Chem* 280(40): 33766-33774.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D. y Milzani, A. (2009). *Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans*. *Trends Biochem Sci* 34(2): 85-96.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R. y Milzani, A. (2007). *S-glutathionylation in protein redox regulation*. *Free Radic Biol Med* 43(6): 883-898.
- Davis, J.S., Balinsky, J.B., Harington, J.S. y Shepherd, J.B. (1973). *Assay, purification, properties and mechanism of action of gamma-glutamylcysteine synthetase from the liver of the rat and Xenopus laevis*. *Biochem J* 133(4): 667-678.

- Dhandayuthapani, S., Jagannath, C., Nino, C., Saikolappan, S. y Sasindran, S.J. (2009). *Methionine sulfoxide reductase B (MsrB) of Mycobacterium smegmatis plays a limited role in resisting oxidative stress*. Tuberculosis (Edinb) 89 Suppl 1: S26-32.
- Diaz, A., Loewen, P.C., Fita, I. y Carpena, X. (2012). *Thirty years of heme catalases structural biology*. Arch Biochem Biophys 525(2): 102-110.
- Dickinson, D.A. y Forman, H.J. (2002). *Cellular glutathione and thiols metabolism*. Biochem Pharmacol 64(5-6): 1019-1026.
- Discola, K.F., de Oliveira, M.A., Rosa Cussiol, J.R., Monteiro, G., Barcena, J.A., Porras, P., Padilla, C.A., Guimaraes, B.G. y Netto, L.E. (2009). *Structural aspects of the distinct biochemical properties of glutaredoxin 1 and glutaredoxin 2 from Saccharomyces cerevisiae*. J Mol Biol 385(3): 889-901.
- Drazic, A. y Winter, J. (2014). *The physiological role of reversible methionine oxidation*. Biochim Biophys Acta 1844(8): 1367-1382.
- Dringen, R. y Gutterer, J.M. (2002). *Glutathione reductase from bovine brain*. Methods Enzymol 348: 281-288.
- Dubbs, J.M. y Mongkolsuk, S. (2012). *Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria*. J Bacteriol 194(20): 5495-5503.
- Edwards, K. (2016). *New Twist on an Old Favorite: Gentian Violet and Methylene Blue Antibacterial Foams*. Adv Wound Care (New Rochelle) 5(1): 11-18.
- Ellinghausen, H.C. y McCullough, W.G. (1965). *Nutrition of Leptospira Pomona and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80*. Am J Vet Res 26: 45-51.
- Eshghi, A., Lourdault, K., Murray, G.L., Bartpho, T., Sermswan, R.W., Picardeau, M., Adler, B., Snarr, B., Zuerner, R.L. y Cameron, C.E. (2012). *Leptospira interrogans catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence*. Infect Immun 80(11): 3892-3899.
- Etienne, F., Spector, D., Brot, N. y Weissbach, H. (2003). *A methionine sulfoxide reductase in Escherichia coli that reduces the R enantiomer of methionine sulfoxide*. Biochem Biophys Res Commun 300(2): 378-382.
- Ezraty, B., Aussel, L. y Barras, F. (2005). *Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes*. Biochim Biophys Acta 1703(2): 221-229.
- Fang, F.C. (2004). *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol 2(10): 820-832.
- Feng, Y., Zhong, N., Rouhier, N., Hase, T., Kusunoki, M., Jacquot, J.P., Jin, C. y Xia, B. (2006). *Structural insight into poplar glutaredoxin C1 with a bridging iron-sulfur cluster at the active site*. Biochemistry 45(26): 7998-8008.
- Fernandes, A.P., Fladvad, M., Berndt, C., Andresen, C., Lillig, C.H., Neubauer, P., Sunnerhagen, M., Holmgren, A. y Vlamis-Gardikas, A. (2005). *A novel monothiol glutaredoxin (Grx4) from Escherichia coli can serve as a substrate for thioredoxin reductase*. J Biol Chem 280(26): 24544-24552.
- Filipovska, A. y Murphy, M.P. (2006). *Overview of protein glutathionylation*. Current protocols in toxicology Chapter 6: Unit6 10.

- Filser, M., Comini, M.A., Molina-Navarro, M.M., Dirdjaja, N., Herrero, E. y Krauth-Siegel, R.L. (2008). *Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of Trypanosoma brucei monothiol glutaredoxin-1*. *Biol Chem* 389(1): 21-32.
- Flohe, L., Hecht, H.J. y Steinert, P. (1999). *Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism*. *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 966-984.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M. y Torres, M. (2003). *Signal Transduction by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Pathways and Chemical Principles*. New York. United States, Kluwer Academic Publisher.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M. y Torres, M. (2004). *Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers*. *Am J Physiol Cell Physiol* 287.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005). *Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context*. *Plant, Cell & Environment* 28(8): 1056-1071.
- Franklin, C.C., Backos, D.S., Mohar, I., White, C.C., Forman, H.J. y Kavanagh, T.J. (2009). *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. *Mol Aspects Med* 30(1-2): 86-98.
- Frey, A.G., Palenchar, D.J., Wildemann, J.D. y Philpott, C.C. (2016). *A Glutaredoxin-BolA Complex Serves as an Iron-Sulfur Cluster Chaperone for the Cytosolic Cluster Assembly Machinery*. *J Biol Chem*.
- Friguet, B. (2006). *Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress*. *FEBS Lett* 580(12): 2910-2916.
- Furdui, C.M. y Poole, L.B. (2014). *Chemical approaches to detect and analyze protein sulfenic acids*. *Mass Spectrom Rev* 33(2): 126-146.
- Fusari, C., Demonte, A.M., Figueroa, C.M., Aleanzi, M. y Iglesias, A.A. (2006). *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase*. *Anal Biochem* 352(1): 145-147.
- Gallogly, M.M. y Mieyal, J.J. (2007). *Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress*. *Curr Opin Pharmacol* 7(4): 381-391.
- Gallogly, M.M., Starke, D.W., Leonberg, A.K., Ospina, S.M. y Mieyal, J.J. (2008). *Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: implications for intracellular roles*. *Biochemistry* 47(42): 11144-11157.
- Gallogly, M.M., Starke, D.W. y Mieyal, J.J. (2009). *Mechanistic and kinetic details of catalysis of thiol-disulfide exchange by glutaredoxins and potential mechanisms of regulation*. *Antioxid Redox Signal* 11(5): 1059-1081.
- Gao, X.H., Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Michelet, L., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P. y Lemaire, S.D. (2010). *Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii: kinetics and specificity in deglutathionylation reactions*. *FEBS Lett* 584(11): 2242-2248.
- Gasselhuber, B., Jakopitsch, C., Zámocký, M., Furtmüller, P.G. y Obinger, C. (2016). *Mechanistic Aspects of Catalase-peroxidase*. En: *Heme Peroxidases*. (Raven, E. y Dunford, B.), RSC Metallobiology Series.

- Gaston, B.M., Carver, J., Doctor, A. y Palmer, L.A. (2003). *S-nitrosylation signaling in cell biology*. Mol Interv 3(5): 253-263.
- Ghisaidoobe, A.B. y Chung, S.J. (2014). *Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Forster resonance energy transfer techniques*. Int J Mol Sci 15(12): 22518-22538.
- Gietz, R.D. y Schiestl, R.H. (2007). *High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method*. Nat Protoc 2(1): 31-34.
- Giles, G.I. y Jacob, C. (2002). *Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress*. Biol Chem 383(3-4): 375-388.
- Giles, N.M., Watts, A.B., Giles, G.I., Fry, F.H., Littlechild, J.A. y Jacob, C. (2003). *Metal and redox modulation of cysteine protein function*. Chem Biol 10(8): 677-693.
- Gopal, S., Borovok, I., Ofer, A., Yanku, M., Cohen, G., Goebel, W., Kreft, J. y Aharonowitz, Y. (2005). *A multidomain fusion protein in Listeria monocytogenes catalyzes the two primary activities for glutathione biosynthesis*. J Bacteriol 187(11): 3839-3847.
- Gould, N., Doulias, P.T., Tenopoulou, M., Raju, K. y Ischiropoulos, H. (2013). *Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation*. J Biol Chem 288(37): 26473-26479.
- Gow, A., Doctor, A., Mannick, J. y Gaston, B.M. (2007). *S-Nitrosothiol measurements in biological systems*. Journal of Chromatography B 851(1): 140-151.
- Gray, M.J., Wholey, W.Y. y Jakob, U. (2013). *Bacterial responses to reactive chlorine species*. Annu Rev Microbiol 67: 141-160.
- Green, S.S., Goldberg, H.S. y Blendon, D.C. (1967). *Enzyme patterns in the study of leptospira*. Appl Microbiol 15(5): 1104-1113.
- Griffith, O.W. y Mulcahy, R.T. (1999). *The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 73: 209-267, xii.
- Gromes, R. Post-translational regulation and evolution of plant γ -glutamate cysteine ligase. Doctor of Natural Sciences, Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg.
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E.D., Rybin, V., Scheffzek, K. y Rausch, T. (2008). *The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants*. Plant J 54(6): 1063-1075.
- Guegan, R., Camadro, J.M., Saint Girons, I. y Picardeau, M. (2003). *Leptospira spp. possess a complete haem biosynthetic pathway and are able to use exogenous haem sources*. Mol Microbiol 49(3): 745-754.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. y Jakoby, W.B. (1974). *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem 249(22): 7130-7139.
- Hall, A., Karplus, P.A. y Poole, L.B. (2009). *Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions*. Febs J 276(9): 2469-2477.
- Halliwell, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol 141(2): 312-322.

- Hang, C.S., Moore, W.R. y Meister, A. (1987). *On the active site thiol of γ -glutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 2464-2468.
- Hartman, M.D., Figueroa, C.M., Piattoni, C.V. y Iglesias, A.A. (2014). *Glucitol dehydrogenase from peach (*Prunus persica*) fruits is regulated by thioredoxin h*. Plant Cell Physiol 55(6): 1157-1168.
- Hashemy, S.I. (2008). Regulation of human thioredoxin and glutaredoxin systems by oxidation and s-nitrosylation, Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik (MBB)/Department of Medical Biochemistry and Biophysics.
- Hayashi, K., Maekawa, I., Tanaka, K., Ijyuin, S., Shiwa, Y., Suzuki, I., Niimura, Y. y Kawasaki, S. (2013). *Purification and characterization of oxygen-inducible haem catalase from oxygen-tolerant *Bifidobacterium asteroides**. Microbiology 159(Pt 1): 89-95.
- Hell, R. y Bergmann, L. (1990). *λ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization*. Planta 180(4): 603-612.
- Hernandez, H.H., Jaquez, O.A., Hamill, M.J., Elliott, S.J. y Drennan, C.L. (2008). *Thioredoxin reductase from *Thermoplasma acidophilum*: a new twist on redox regulation*. Biochemistry 47(37): 9728-9737.
- Herrero, E. y de la Torre-Ruiz, M.A. (2007). *Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions*. Cell Mol Life Sci 64(12): 1518-1530.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. y Stamler, J.S. (2005). *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. Nat Rev Mol Cell Biol 6(2): 150-166.
- Hibi, T., Hisada, H., Nakatsu, T., Kato, H. y Oda, J. (2002). *Escherichia coli B gamma-glutamylcysteine synthetase: modification, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 58(Pt 2): 316-318.
- Hibi, T., Nii, H., Nakatsu, T., Kimura, A., Kato, H., Hiratake, J. y Oda, J. (2004). *Crystal structure of gamma-glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(42): 15052-15057.
- Hirt, R.P., Muller, S., Embley, T.M. y Coombs, G.H. (2002). *The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives*. Trends Parasitol 18(7): 302-308.
- Hofmann, B., Hecht, H.J. y Flohe, L. (2002). *Peroxiredoxins*. Biol Chem 383(3-4): 347-364.
- Holmgren, A. (1977). *Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction*. J Biol Chem 252(13): 4600-4606.
- Holmgren, A. (1979). *Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action*. J Biol Chem 254(18): 9113-9119.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M.E., Hudemann, C. y Lillig, C.H. (2005). *Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems*. Biochem Soc Trans 33(Pt 6): 1375-1377.
- Holtgreffe, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C. y Scheibe, R. (2008). *Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-*

- phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications*. *Physiol Plant* 133(2): 211-228.
- Hospenthal, D.R. y Murray, C.K. (2003). *In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2646-2648.
- Hugo, M., Turell, L., Manta, B., Botti, H., Monteiro, G., Netto, L.E., Alvarez, B., Radi, R. y Trujillo, M. (2009). *Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics*. *Biochemistry* 48(40): 9416-9426.
- Hurd, T.R., Filipovska, A., Costa, N.J., Dahm, C.C. y Murphy, M.P. (2005). *Disulphide formation on mitochondrial protein thiols*. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6): 1390-1393.
- Hussein, A.S. y Walter, R.D. (1995). *Purification and characterization of gamma-glutamylcysteine synthetase from Ascaris suum*. *Molecular and biochemical parasitology* 72(1-2): 57-64.
- Iwema, T., Picciocchi, A., Traore, D.A., Ferrer, J.L., Chauvat, F. y Jacquamet, L. (2009). *Structural basis for delivery of the intact [Fe2S2] cluster by monothiol glutaredoxin*. *Biochemistry* 48(26): 6041-6043.
- Jacquot, J.P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Marechal, P., Miginiac-Maslow, M. y Meyer, Y. (1994). *Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli*. *J Mol Biol* 235(4): 1357-1363.
- Jang, H.H., Kim, S.Y., Park, S.K., Jeon, H.S., Lee, Y.M., Jung, J.H., Lee, S.Y., Chae, H.B., Jung, Y.J., Lee, K.O., Lim, C.O., Chung, W.S., Bahk, J.D., Yun, D.J. y Cho, M.J. (2006). *Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions*. *FEBS Lett* 580(1): 351-355.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J. y Lee, S.Y. (2004). *Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. *Cell* 117(5): 625-635.
- Jang, S. (2010). *The metabolism of iron-sulfur clusters during hydrogen peroxide stress in E. coli*, University of Illionis at Urbana- Champaign.
- Janowiak, B.E. y Griffith, O.W. (2005). *Glutathione synthesis in Streptococcus agalactiae. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities*. *J Biol Chem* 280(12): 11829-11839.
- Janowiak, B.E., Hayward, M.A., Peterson, F.C., Volkman, B.F. y Griffith, O.W. (2006). *Gamma-glutamylcysteine synthetase-glutathione synthetase: domain structure and identification of residues important in substrate and glutathione binding*. *Biochemistry* 45(35): 10461-10473.
- Jeon, S.J. y Ishikawa, K. (2002). *Identification and characterization of thioredoxin and thioredoxin reductase from Aeropyrum pernix K1*. *European journal of biochemistry* 269(22): 5423-5430.

- Johansson, C., Kavanagh, K.L., Gileadi, O. y Oppermann, U. (2007). *Reversible sequestration of active site cysteines in a 2Fe-2S-bridged dimer provides a mechanism for glutaredoxin 2 regulation in human mitochondria*. J Biol Chem 282(5): 3077-3082.
- Johnsson, K., Froland, W.A. y Schultz, P.G. (1997). *Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 272(5): 2834-2840.
- Jonsson, T.J., Murray, M.S., Johnson, L.C., Poole, L.B. y Lowther, W.T. (2005). *Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin*. Biochemistry 44(24): 8634-8642.
- Jouve, H.M., Tessier, S. y Pelmont, J. (1982). *Purification and properties of the Proleus mirabilis catalase*. Can. J. Biochem. Cell Biol. 61(1): 8-14.
- Jun, K.O., Song, C.H., Kim, Y.B., An, J., Oh, J.H. y Choi, S.K. (2009). *Activation of translation via reduction by thioredoxin-thioredoxin reductase in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 583(17): 2804-2810.
- Kantorow, M., Lee, W. y Chauss, D. (2012). *Focus on Molecules: methionine sulfoxide reductase A*. Exp Eye Res 100: 110-111.
- Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Muller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. y Becker, K. (2001). *Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in Drosophila melanogaster*. Science 291(5504): 643-646.
- Kanzok, S.M., Rahlfs, S., Becker, K. y Schirmer, R.H. (2002). *Thioredoxin, thioredoxin reductase, and thioredoxin peroxidase of malaria parasite Plasmodium falciparum*. Methods Enzymol 347: 370-381.
- Kasozi, D.M., Gromer, S., Adler, H., Zocher, K., Rahlfs, S., Wittlin, S., Fritz-Wolf, K., Schirmer, R.H. y Becker, K. (2011). *The bacterial redox signaller pyocyanin as an antiplasmodial agent: comparisons with its thioanalog methylene blue*. Redox Rep 16(4): 154-165.
- Kelley, J.J., Caputo, T.M., Eaton, S.F., Laue, T.M. y Bushweller, J.H. (1997). *Comparison of backbone dynamics of reduced and oxidized Escherichia coli glutaredoxin-1 using 15N NMR relaxation measurements*. Biochemistry 36(16): 5029-5044.
- Kelly, B.S., Antholine, W.E. y Griffith, O.W. (2002). *Escherichia coli gamma-glutamylcysteine synthetase. Two active site metal ions affect substrate and inhibitor binding*. J Biol Chem 277(1): 50-58.
- Kim, H.Y. (2012). *Glutaredoxin serves as a reductant for methionine sulfoxide reductases with or without resolving cysteine*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai): 623-627.
- Kim, J. y Copley, S.D. (2013). *The orphan protein bis-gamma-glutamylcysteine reductase joins the pyridine nucleotide disulfide reductase family*. Biochemistry 52(17): 2905-2913.
- Kim, S.Y., Jang, H.H., Lee, J.R., Sung, N.R., Lee, H.B., Lee, D.H., Parka, D.J., Kanga, C.H., Chunga, W.S., Lima, C.O., Yuna, D.J., Kima, W.Y., Lee, K.O. y Lee, S.Y. (2009). *Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress*. Plant Science 177(3): 227-232.
- Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J. y Zimmermann, H. (1992). *γ -Glutamylcysteinylserine - A New Homologue of Glutathione in Plants of the Family Poaceae*. Bot. Acta 105 105.

- Ko, A.I., Goarant, C. y Picardeau, M. (2009). *Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen*. Nat Rev Microbiol 7(10): 736-747.
- Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H. y Schirmer, R.H. (2005). *Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia*. Angew Chem Int 44(5): 690-715.
- Krejsa, C.M., Franklin, C.C., White, C.C., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L. y Kavanagh, T.J. (2010). *Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress*. J Biol Chem 285(21): 16116-16124.
- Kristiansen, J.E., Dastidar, S.G., Palchoudhuri, S., Roy, D.S., Das, S., Hendricks, O. y Christensen, J.B. (2015). *Phenothiazines as a solution for multidrug resistant tuberculosis: From the origin to present*. Int Microbiol 18(1): 1-12.
- Krnajski, Z., Gilberger, T.W., Walter, R.D. y Muller, S. (2001). *The malaria parasite Plasmodium falciparum possesses a functional thioredoxin system*. Mol Biochem Parasitol 112(2): 219-228.
- Kuhns, L.G., Mahawar, M., Sharp, J.S., Benoit, S. y Maier, R.J. (2013). *Role of Helicobacter pylori methionine sulfoxide reductase in urease maturation*. Biochem J 450(1): 141-148.
- Kumagai, H., Nakayama, R. y Tochikura, T. (1982). *γ -Glutamylcysteine Synthetase from Proteus mirabilis*. Agricultural and Biological Chemistry 46 (5): 1301-1309.
- Kumar, J.K., Tabor, S. y Richardson, C.C. (2004). *Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 101(11): 3759-3764.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227(5259): 680-685.
- Laver, J.R., McLean, S., Bowman, L.A., Harrison, L.J., Read, R.C. y Poole, R.K. (2013). *Nitrosothiols in bacterial pathogens and pathogenesis*. Antioxid Redox Signal 18(3): 309-322.
- Laver, J.R., McLean, S., Bowman, L.A., Harrison, L.J., Read, R.C. y Poole, R.K. (2013). *Nitrosothiols in bacterial pathogens and pathogenesis*. Antioxid Redox Signal 18(3): 309-322.
- Le, D.T., Lee, B.C., Marino, S.M., Zhang, Y., Fomenko, D.E., Kaya, A., Hacıoglu, E., Kwak, G.H., Koc, A., Kim, H.Y. y Gladyshev, V.N. (2009). *Functional analysis of free methionine-R-sulfoxide reductase from Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 284(7): 4354-4364.
- Lee, B.C. (2010). *Methionine-R-sulfoxide reductases and biological importance of free methionine sulfoxide reduction*.
- Lee, B.C. y Gladyshev, V.N. (2011). *The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry*. Free Radic Biol Med 50(2): 221-227.
- Lee, E.H., Kwak, G.H., Kim, M.J., Kim, H.Y. y Hwang, K.Y. (2014). *Structural analysis of 1-Cys type selenoprotein methionine sulfoxide reductase A*. Arch Biochem Biophys 545: 1-8.
- Lee, E.H., Lee, K., Kwak, G.H., Park, Y.S., Lee, K.J., Hwang, K.Y. y Kim, H.Y. (2015). *Evidence for the dimerization-mediated catalysis of methionine sulfoxide reductase A from Clostridium oremlandii*. PLoS One 10(6): e0131523.

- Lehmann, J.S., Matthias, M.A., Vinetz, J.M. y Fouts, D.E. (2014). *Leptospiral pathogenomics*. *Pathogens* 3(2): 280-308.
- Levett, P.N. (2001). *Leptospirosis*. *Clin Microbiol Rev* 14(2): 296-326.
- Li, H., Mapolelo, D.T., Randeniya, S., Johnson, M.K. y Outten, C.E. (2012). *Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BolA2*. *Biochemistry* 51(8): 1687-1696.
- Li, W., Li, Z., Yang, J. y Ye, Q. (2011). *Production of glutathione using a bifunctional enzyme encoded by gshF from Streptococcus thermophilus expressed in Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*: 261-268.
- Lill, R. (2009). *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. *Nature* 460(7257): 831-838.
- Lillig, C.H., Berndt, C. y Holmgren, A. (2008). *Glutaredoxin systems*. *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1304-1317.
- Lillig, C.H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lonn, M.E., Hudemann, C., Bill, E. y Holmgren, A. (2005). *Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8168-8173.
- Lillig, C.H. y Holmgren, A. (2007). *Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease*. *Antioxid Redox Signal* 9(1): 25-47.
- Lo, M., Murray, G.L., Khoo, C.A., Haake, D.A., Zuerner, R.L. y Adler, B. (2010). *Transcriptional response of Leptospira interrogans to iron limitation and characterization of a PerR homolog*. *Infect Immun* 78(11): 4850-4859.
- Loewen, P. (1996). *Probing the structure of catalase HP11 of Escherichia coli--a review*. *Gene* 179(1): 39-44.
- Loi, V.V., Rossius, M. y Antelmann, H. (2015). *Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria*. *Front Microbiol* 6: 187.
- Louvel, H., Bommezzadri, S., Zidane, N., Boursaux-Eude, C., Creno, S., Magnier, A., Rouy, Z., Medigue, C., Saint Girons, I. y Bouchier, C. (2006). *Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in Leptospira spp.* *J Bacteriol* 188(22): 7893-7904.
- Louvel, H. y Picardeau, M. (2007). *Genetic manipulation of Leptospira biflexa*. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 12: Unit 12E 14.
- Lowther, W.T., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. y Matthews, B.W. (2002). *The mirrored methionine sulfoxide reductases of Neisseria gonorrhoeae pilB*. *Nat Struct Biol* 9(5): 348-352.
- Lu, J. y Holmgren, A. (2014). *The thioredoxin antioxidant system*. *Free Radic Biol Med* 66: 75-87.
- Lu, J., Papp, L.V., Fang, J., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B. y Holmgren, A. (2006). *Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity*. *Cancer Res* 66(8): 4410-4418.
- Lu, J., Vlamis-Gardikas, A., Kandasamy, K., Zhao, R., Gustafsson, T.N., Engstrand, L., Hoffner, S., Engman, L. y Holmgren, A. (2013). *Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione*. *Faseb J* 27(4): 1394-1403.

- Lushchak, V.I. (2014). *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. Chem Biol Interact 224: 164-175.
- Macheroux, P. *UV-Visible Spectroscopy as a Tool to Study Flavoproteins*. En: Flavoprotein Protocols, Stephen K. Chapman Graeme A. Reid 131.
- Macheroux, P. (1999). *UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins*. Methods in Molecular Biology 131: 1-7.
- Mahawar, M., Tran, V., Sharp, J.S. y Maier, R.J. (2011). *Synergistic roles of Helicobacter pylori methionine sulfoxide reductase and GroEL in repairing oxidant-damaged catalase*. J Biol Chem 286(21): 19159-19169.
- Maniatis, T., Fritsch, E. y Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A laboratory Manual. United States.
- Mannervik, B. (2001). *Measurement of glutathione reductase activity*. Curr Protoc Toxicol Chapter 7: Unit7 2.
- Marquez, V.E., Arias, D.G., Chiribao, M.L., Faral-Tello, P., Robello, C., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2014). *Redox metabolism in Trypanosoma cruzi. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin dependent cellular pathways*. Biochimie 106: 56-67.
- Marquez, V.E., Arias, D.G., Piattoni, C.V., Robello, C., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2010). *Cloning, expression, and characterization of a dithiol glutaredoxin from Trypanosoma cruzi*. Antioxid Redox Signal 12(6): 787-792.
- Martínez, M.C. y Andriantsitohaina, R. (2009). *Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease*. Antioxid Redox Signal 11(3): 669-702.
- Mashino, T. y Fridovich, I. (1988). *Reactions of hypochlorite with catalase*. Biochim Biophys Acta 956(1): 63-69.
- Masip, L., Veeravalli, K. y Georgiou, G. (2006). *The many faces of glutathione in bacteria*. Antioxid Redox Signal 8(5-6): 753-762.
- Matsumura, T., Okamoto, K., Iwahara, S., Hori, H., Takahashi, Y., Nishino, T. y Abe, Y. (2008). *Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization*. J Biol Chem 283(1): 284-293.
- McCord, J.M. (2000). *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med 108(8): 652-659.
- Mesecke, N., Mittler, S., Eckers, E., Herrmann, J.M. y Deponte, M. (2008). *Two novel monothiol glutaredoxins from Saccharomyces cerevisiae provide further insight into iron-sulfur cluster binding, oligomerization, and enzymatic activity of glutaredoxins*. Biochemistry 47(5): 1452-1463.
- Metzler, D.E. y Metzler, C.M. (2003). *Transition Metals in Catalysis and Electron Transport*. En: Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. United States Elsevier. 2.
- Meuwly, P., Thibault, P. y Rauser, W.E. (1993). *gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium*. FEBS Lett 336(3): 472-476.

- Mihaljevic, B., Katusin-Razem, B. y Razem, D. (1996). *The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response*. *Free Radic Biol Med* 21(1): 53-63.
- Mishanina, T.V., Libiad, M. y Banerjee, R. (2015). *Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways*. *Nature chemical biology* 11(7): 457-464.
- Mishra, S. y Imlay, J. (2012). *Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?* *Arch Biochem Biophys*: 145-160.
- Moller, I.M., Jensen, P.E. y Hansson, A. (2007). *Oxidative modifications to cellular components in plants*. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459-481.
- Moskovitz, J., Singh, V.K., Requena, J., Wilkinson, B.J., Jayaswal, R.K. y Stadtman, E.R. (2002). *Purification and characterization of methionine sulfoxide reductases from mouse and Staphylococcus aureus and their substrate stereospecificity*. *Biochem Biophys Res Commun* 290(1): 62-65.
- Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R. y Aslund, F. (1999). *Importance of redox potential for the in vivo function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274(36): 25254-25259.
- Muhlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., Lillig, C.H. y Lill, R. (2010). *Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster*. *Cell Metab* 12(4): 373-385.
- Muller, S., Gilberger, T.W., Krnajski, Z., Luersen, K., Meierjohann, S. y Walter, R.D. (2001). *Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite Plasmodium falciparum*. *Protoplasma* 217(1-3): 43-49.
- Mumberg, D., Muller, R. y Funk, M. (1995). *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds*. *Gene* 156(1): 119-122.
- Murgia, R., Garcia, R. y Cinco, M. (2002). *Leptospire are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions*. *Infect Immun* 70(12): 7172-7175.
- Nascimento, A.L., Ko, A.I., Martins, E.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Ho, P.L., Haake, D.A., Verjovski-Almeida, S., Hartskeerl, R.A., Marques, M.V., Oliveira, M.C., Menck, C.F., Leite, L.C., Carrer, H., Coutinho, L.L., Degraeve, W.M., Dellagostin, O.A., El-Dorry, H., Ferro, E.S., Ferro, M.I., Furlan, L.R., Gamberini, M., Gigliotti, E.A., Goes-Neto, A., Goldman, G.H., Goldman, M.H., Harakava, R., Jeronimo, S.M., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Kimura, E.T., Kuramae, E.E., Lemos, E.G., Lemos, M.V., Marino, C.L., Nunes, L.R., de Oliveira, R.C., Pereira, G.G., Reis, M.S., Schriefer, A., Siqueira, W.J., Sommer, P., Tsai, S.M., Simpson, A.J., Ferro, J.A., Camargo, L.E., Kitajima, J.P., Setubal, J.C. y Van Sluys, M.A. (2004). *Comparative genomics of two Leptospira interrogans serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis*. *J Bacteriol* 186(7): 2164-2172.
- Nascimento, A.S., Catalano-Dupuy, D.L., Bernardes, A., Neto Mde, O., Santos, M.A., Ceccarelli, E.A. y Polikarpov, I. (2007). *Crystal structures of Leptospira interrogans FAD-containing ferredoxin-NADP⁺ reductase and its complex with NADP⁺*. *BMC Struct Biol* 7: 69.
- Nordberg, J. y Arner, E.S. (2001). *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. *Free Radic Biol Med* 31(11): 1287-1312.

- Oie, S., Hironaga, K., Koshiro, A., Konishi, H. y Yoshii, Z. (1983). *In vitro susceptibilities of five Leptospira strains to 16 antimicrobial agents*. *Antimicrob Agents Chemother* 24(6): 905-908.
- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R. y Winge, D.R. (2006). *Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281(26): 17661-17669.
- Olry, A., Boschi-Muller, S. y Branlant, G. (2004). *Kinetic characterization of the catalytic mechanism of methionine sulfoxide reductase B from Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* 43(36): 11616-11622.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Yu, H., Burnel, D. y Branlant, G. (2005). *Insights into the role of the metal binding site in methionine-R-sulfoxide reductases B*. *Protein Sci* 14(11): 2828-2837.
- Organization, W.H. y Society, I.L. (2003). *Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. Malta, World Health Organization: 122.
- Palcic, M. y Dunford, H.B. (1979). *Spectral studies of human erythrocyte catalase*. *Can J Biochem* 57(4): 321-329.
- Pan, J.L. y Bardwell, J.C. (2006). *The origami of thioredoxin-like folds*. *Protein Sci* 15(10): 2217-2227.
- Panek, H.R. y O'Brian, M.R. (2004). *KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 186(23): 7874-7880.
- Parsonage, D., Desrosiers, D.C., Hazlett, K.R., Sun, Y., Nelson, K.J., Cox, D.L., Radolf, J.D. y Poole, L.B. (2010). *Broad specificity AhpC-like peroxiredoxin and its thioredoxin reductant in the sparse antioxidant defense system of Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(14): 6240-6245.
- Parsonage, D., Karplus, P.A. y Poole, L.B. (2008). *Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(24): 8209-8214.
- Pascual, M.B., Mata-Cabana, A., Florencio, F.J., Lindahl, M. y Cejudo, F.J. (2010). *Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress*. *J Biol Chem* 285(45): 34485-34492.
- Patel, M.P., Marcinkeviciene, J. y Blanchard, J.S. (1998). *Enterococcus faecalis glutathione reductase: purification, characterization and expression under normal and hyperbaric O₂ conditions*. *FEMS Microbiol Lett* 166(1): 155-163.
- Peskin, A.V., Turner, R., Maghzal, G.J., Winterbourn, C.C. y Kettle, A.J. (2009). *Oxidation of methionine to dehydromethionine by reactive halogen species generated by neutrophils*. *Biochemistry* 48(42): 10175-10182.
- Philpott, C.C., Protchenko, O., Kim, Y.W., Boretsky, Y. y Shakoury-Elizeh, M. (2002). *The response to iron deprivation in Saccharomyces cerevisiae: expression of siderophore-based systems of iron uptake*. *Biochem Soc Trans* 30(4): 698-702.
- Picardeau, M., Bulach, D.M., Bouchier, C., Zuerner, R.L., Zidane, N., Wilson, P.J., Creno, S., Kuczek, E.S., Bommezzadri, S., Davis, J.C., McGrath, A., Johnson, M.J., Boursaux-Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R.L., Rood, J.I., Lajus, A., Davies, J.K., Medigue, C. y Adler, B. (2008). *Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis*. *PLoS One* 3(2): e1607.

- Pichorner, H., Jessner, G. y Ebermann, R. (1993). *tBOOH acts as a suicide substrate for catalase*. Arch Biochem Biophys. 300: 258-264.
- Pineyro, M.D., Parodi-Talice, A., Portela, M., Arias, D.G., Guerrero, S.A. y Robello, C. (2011). *Molecular characterization and interactome analysis of Trypanosoma cruzi tryparedoxin 1*. J Proteomics 74(9): 1683-1692.
- Poole, R.K. (2005). *Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria*. Biochem Soc Trans 33(Pt 1): 176-180.
- Potter, A.J., Trappetti, C. y Paton, J.C. (2012). *Streptococcus pneumoniae uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity*. J Bacteriol 194(22): 6248-6254.
- Pujol-Carrion, N. y de la Torre-Ruiz, M.A. (2010). *Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of Saccharomyces cerevisiae play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance*. Appl Environ Microbiol 76(23): 7826-7835.
- Rafii, F., Lunsford, P., Hehman, G. y Cerniglia, C.E. (1999). *Detection and purification of a catalase-peroxidase from Mycobacterium sp. Pyr-1*. FEMS Microbiol Lett 173(2): 285-290.
- Rahlfs, S., Schirmer, R.H. y Becker, K. (2002). *The thioredoxin system of Plasmodium falciparum and other parasites*. Cell Mol Life Sci 59(6): 1024-1041.
- Rahman, I., Kode, A. y Biswas, S.K. (2006). *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. Nat Protoc 1(6): 3159-3165.
- Rao, P.J., Larson, A.D. y Cox, C.D. (1964). *Catalase Activity in Leptospira*. J Bacteriol 88: 1045-1048.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radic Biol Med 26(9-10): 1231-1237.
- Regner, E.L., Thompson, C.S., Iglesias, A.A., Guerrero, S.A. y Arias, D.G. (2014). *Biochemical characterization of thioredoxin reductase from Babesia bovis*. Biochimie 99: 44-53.
- Ren, S.X., Fu, G., Jiang, X.G., Zeng, R., Miao, Y.G., Xu, H., Zhang, Y.X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.F., Jiang, H.Q., Jia, J., Tu, Y.F., Jiang, J.X., Gu, W.Y., Zhang, Y.Q., Cai, Z., Sheng, H.H., Yin, H.F., Zhang, Y., Zhu, G.F., Wan, M., Huang, H.L., Qian, Z., Wang, S.Y., Ma, W., Yao, Z.J., Shen, Y., Qiang, B.Q., Xia, Q.C., Guo, X.K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R.L., Wen, Y.M., Shi, M.H., Chen, Z., Xu, J.G. y Zhao, G.P. (2003). *Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing*. Nature 422(6934): 888-893.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Jeong, W., Chang, T.S., Yang, K.S. y Woo, H.A. (2005). *Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins*. Curr Opin Cell Biol 17(2): 183-189.
- Rhee, S.G. y Woo, H.A. (2011). *Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones*. Antioxid Redox Signal 15(3): 781-794.
- Richman, P.G. y Meister, A. (1975). *Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione*. J Biol Chem 250(4): 1422-1426.

- Riener, C.K., Kada, G. y Gruber, H.J. (2002). *Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine*. *Anal Bioanal Chem* 373(4-5): 266-276.
- Ritz, D. y Beckwith, J. (2001). *Roles of thiol-redox pathways in bacteria*. *Annu Rev Microbiol* 55: 21-48.
- Rodriguez-Manzaneque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A. y Herrero, E. (1999). *Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19(12): 8180-8190.
- Rodriguez-Manzaneque, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J. y Herrero, E. (2002). *Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes*. *Mol Biol Cell* 13(4): 1109-1121.
- Romsang, A., Atichartpongkul, S., Trinachartvanit, W., Vattanaviboon, P. y Mongkolsuk, S. (2013). *Gene expression and physiological role of Pseudomonas aeruginosa methionine sulfoxide reductases during oxidative stress*. *J Bacteriol* 195(15): 3299-3308.
- Ronsein, G.E., Winterbourn, C.C., Di Mascio, P. y Kettle, A.J. (2014). *Cross-linking methionine and amine residues with reactive halogen species*. *Free Radical Biology and Medicine* 70: 278-287.
- Rouhier, N., Kauffmann, B., Tete-Favier, F., Palladino, P., Gans, P., Branlant, G., Jacquot, J.P. y Boschi-Muller, S. (2007). *Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases*. *J Biol Chem* 282(5): 3367-3378.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D. y Jacquot, J.P. (2008). *The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation*. *Annu Rev Plant Biol* 59: 143-166.
- Sakolvaree, Y., Maneewatch, S., Jiemsup, S., Klaysing, B., Tongtawe, P., Srimanote, P., Saengjaruk, P., Banyen, S., Tapchaisri, P., Chonsa-nguan, M. y Chaicumpa, W. (2007). *Proteome and immunome of pathogenic Leptospira spp. revealed by 2DE and 2DE-immunoblotting with immune serum*. *Asian Pac J Allergy Immunol* 25(1): 53-73.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. United States.
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A. y Schneider, G. (2001). *Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9533-9538.
- Sasindran, S.J., Saikolappan, S. y Dhandayuthapani, S. (2007). *Methionine sulfoxide reductases and virulence of bacterial pathogens*. *Future Microbiol* 2(6): 619-630.
- Saunders, C.C. y Stites, W.E. (2012). *An electrophoretic mobility shift assay for methionine sulfoxide in proteins*. *Anal Biochem* 421(2): 767-769.
- Sengupta, R. y Holmgren, A. (2012). *The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation*. *Biochim Biophys Acta* 1820(6): 689-700.
- Sengupta, R. y Holmgren, A. (2013). *Thioredoxin and thioredoxin reductase in relation to reversible S-nitrosylation*. *Antioxid Redox Signal* 18(3): 259-269.

- Shumilina, E., Dobrovolska, O., Del Conte, R., Holen, H.W. y Dikiy, A. (2014). *Competitive cobalt for zinc substitution in mammalian methionine sulfoxide reductase B1 overexpressed in E. coli: structural and functional insight*. J Biol Inorg Chem 19(1): 85-95.
- Singh, R., Wiseman, B., Deemagarn, T., Jha, V., Switala, J. y Loewen, P.C. (2008). *Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs)*. Arch Biochem Biophys 471(2): 207-214.
- Siriwong, S., Thumanu, K., Hengpratom, T. y Eumkeb, G. (2015). *Synergy and Mode of Action of Cefazidime plus Quercetin or Luteolin on Streptococcus pyogenes*. Evid Based Complement Alternat Med 2015: 759459.
- Soldano, A., Yao, H., Rivera, M., Ceccarelli, E.A. y Catalano-Dupuy, D.L. (2014). *Heme-iron utilization by Leptospira interrogans requires a heme oxygenase and a plastidic-type ferredoxin-NADP(+) reductase*. Biochim Biophys Acta 1840(11): 3208-3217.
- Srikram, A., Zhang, K., Bartpho, T., Lo, M., Hoke, D.E., Sermswan, R.W., Adler, B. y Murray, G.L. (2011). *Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant*. J Infect Dis 203(6): 870-879.
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P.W., Brooks, H.B., Radding, J.A., McGee, J. y Weidner, J. (2004). *Mechanism of Action assays for Enzymes*.
- Stroher, E. y Millar, A.H. (2012). *The biological roles of glutaredoxins*. Biochem J 446(3): 333-348.
- Stryer, L., Holmgren, A. y Reichard, P. (1967). *Thioredoxin. A localized conformational change accompanying reduction of the protein to the sulfhydryl form*. Biochemistry 6(4): 1016-1020.
- Suputtamongkol, Y., Pongtavornpinyo, W., Lubell, Y., Suttinont, C., Hoontrakul, S., Phimda, K., Losuwanaluk, K., Suwanchaoen, D., Silpasakorn, S., Chierakul, W. y Day, N. (2010). *Strategies for diagnosis and treatment of suspected leptospirosis: a cost-benefit analysis*. PLoS Negl Trop Dis 4(2): e610.
- Tamarit, J., Belli, G., Cabisco, E., Herrero, E. y Ros, J. (2003). *Biochemical characterization of yeast mitochondrial Grx5 monothiol glutaredoxin*. J Biol Chem 278(28): 25745-25751.
- Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Marechal, P., Rouhier, N., Lemaire, S.D. y Rey, P. (2009). *Regeneration mechanisms of Arabidopsis thaliana methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins*. J Biol Chem 284(28): 18963-18971.
- Titov, V.Y., Petrenko, Y.M. y Vanin, A.F. (2008). *Mechanism of inhibition of catalase by nitro and nitroso compounds*. Biochemistry (Mosc) 73(1): 92-96.
- Toennies, G. y Kolb, J.J. (1941). *METHIONINE STUDIES: VI. dl-METHIONINE SULFONE*. J. Biol. Chem. 140: 131-134.
- Tossounian, M.A., Pedre, B., Wahni, K., Erdogan, H., Vertommen, D., Van Molle, I. y Messens, J. (2015). *Corynebacterium diphtheriae methionine sulfoxide reductase a exploits a unique mycothiol redox relay mechanism*. J Biol Chem 290(18): 11365-11375.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D. y Huang, P. (2008). *Redox regulation of cell survival*. Antioxid Redox Signal 10(8): 1343-1374.

- Tu, Z. y Anders, M.W. (1998). *Identification of an important cysteine residue in human glutamate-cysteine ligase catalytic subunit by site-directed mutagenesis*. *Biochem J* 336 (Pt 3): 675-680.
- Tu, Z. y Anders, M.W. (1998a). *Expression and characterization of human glutamate-cysteine ligase*. *Arch Biochem Biophys* 354(2): 247-254.
- Turcotte, B., Liang, X.B., Robert, F. y Soontorngun, N. (2010). *Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast*. *FEMS Yeast Res* 10(1): 2-13.
- Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J.M., Duran, R., Freeman, B.A., Radi, R. y Alvarez, B. (2008). *Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin*. *Biochemistry* 47(1): 358-367.
- Urig, S., Lieske, J., Fritz-Wolf, K., Irmeler, A. y Becker, K. (2006). *Truncated mutants of human thioredoxin reductase 1 do not exhibit glutathione reductase activity*. *FEBS Lett* 580(15): 3595-3600.
- Vaitukaitis, J., Robbins, J.B., Nieschlag, E. y Ross, G.T. (1971). *A method for producing specific antisera with small doses of immunogen*. *J Clin Endocrinol Metab* 33(6): 988-991.
- Van Laer, K., Hamilton, C.J. y Messens, J. (2013). *Low-molecular-weight thiols in thiol-disulfide exchange*. *Antioxid Redox Signal* 18(13): 1642-1653.
- Vanin, A.F. y Van Faassen, E. (2011). *Chemical equilibria between S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands*. En: *Radicals for Life: the various forms of nitric oxide*. United States, Elsevier: 223.
- Vergauwen, B., De Vos, D. y Van Beeumen, J.J. (2006). *Characterization of the bifunctional gamma-glutamate-cysteine ligase/glutathione synthetase (GshF) of Pasteurella multocida*. *J Biol Chem* 281(7): 4380-4394.
- Vergauwen, B., Elegheert, J., Dansercoer, A., Devreese, B. y Savvides, S.N. (2010). *Glutathione import in Haemophilus influenzae Rd is primed by the periplasmic heme-binding protein HbpA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(30): 13270-13275.
- Vergauwen, B., Verstraete, K., Senadheera, D.B., Dansercoer, A., Cvitkovitch, D.G., Guedon, E. y Savvides, S.N. (2013). *Molecular and structural basis of glutathione import in Gram-positive bacteria via GshT and the cystine ABC importer TcyBC of Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* 89(2): 288-303.
- Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis-Bourguet, E., Rouhier, N. y Rey, P. (2007). *Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B*. *FEBS Lett* 581(23): 4371-4376.
- Vieira, M.L., Fernandes, L.G., Domingos, R.F., Oliveira, R., Siqueira, G.H., Souza, N.M., Teixeira, A.R., Atzingen, M.V. y Nascimento, A.L. (2014). *Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen-host interactions*. *FEMS Microbiol Lett* 352(2): 129-139.
- Wang, G., Conover, R.C., Benoit, S., Olczak, A.A., Olson, J.W., Johnson, M.K. y Maier, R.J. (2004). *Role of a bacterial organic hydroperoxide detoxification system in preventing catalase inactivation*. *J Biol Chem* 279(50): 51908-51914.
- Watson, W.H., Pohl, J., Montfort, W.R., Stuchlik, O., Reed, M.S., Powis, G. y Jones, D.P. (2003). *Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif*. *J Biol Chem* 278(35): 33408-33415.

- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C. y Brot, N. (2002). *Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function*. Arch Biochem Biophys 397(2): 172-178.
- Weydert, C.J. y Cullen, J.J. (2010). *Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue*. Nat Protoc 5(1): 51-66.
- Williams, C.H. (1995). *Mechanism and structure of thioredoxin reductase from Escherichia coli*. Faseb J 9(13): 1267-1276.
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Muller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K. y Schirmer, R.H. (2000). *Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved*. Eur J Biochem 267(20): 6110-6117.
- Winyard, P.G., Moody, C.J. y Jacob, C. (2005). *Oxidative activation of antioxidant defence*. Trends Biochem Sci 30(8): 453-461.
- Wolff, D.G., Castiblanco-Valencia, M.M., Abe, C.M., Monaris, D., Morais, Z.M., Souza, G.O., Vasconcellos, S.A., Isaac, L., Abreu, P.A. y Barbosa, A.S. (2013). *Interaction of Leptospira elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities*. PLoS One 8(11): e81818.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. y Poole, L.B. (2003a). *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci 28(1): 32-40.
- Wooldridge, K.G. y Williams, P.H. (1993). *Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria*. FEMS Microbiol Rev 12(4): 325-348.
- Wu, C., Parrott, A.M., Liu, T., Jain, M.R., Yang, Y., Sadoshima, J. y Li, H. (2011). *Distinction of thioredoxin transnitrosylation and denitrosylation target proteins by the ICAT quantitative approach*. J Proteomics 74(11): 2498-2509.
- Xue, F., Dong, H., Wu, J., Wu, Z., Hu, W., Sun, A., Troxell, B., Yang, X.F. y Yan, J. (2010). *Transcriptional responses of Leptospira interrogans to host innate immunity: significant changes in metabolism, oxygen tolerance, and outer membrane*. PLoS Negl Trop Dis 4(10): e857.
- Yang, C.W., Hung, C.C., Wu, M.S., Tian, Y.C., Chang, C.T., Pan, M.J. y Vandewalle, A. (2006). *Toll-like receptor 2 mediates early inflammation by leptospiral outer membrane proteins in proximal tubule cells*. Kidney Int 69(5): 815-822.
- Yang, C.W., Wu, M.S., Pan, M.J., Hsieh, W.J., Vandewalle, A. y Huang, C.C. (2002). *The Leptospira outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells*. J Am Soc Nephrol 13(8): 2037-2045.
- Yeung, N., Gold, B., Liu, N.L., Prathapam, R., Sterling, H.J., Willams, E.R. y Butland, G. (2011). *The E. coli monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes*. Biochemistry 50(41): 8957-8969.
- Yutthanasirikul, R., Nagano, T., Jimbo, H., Hihara, Y., Kanamori, T., Ueda, T., Haruyama, T., Konno, H., Yoshida, K., Hisabori, T. y Nishiyama, Y. (2016). *Oxidation of a Cysteine Residue in Elongation Factor EF-Tu Reversibly Inhibits Translation in the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. J Biol Chem 291(11): 5860-5870.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Groni, H., Marchand, C.H., Puppo, C., Gontero, B., Cassier-Chauvat, C., Decottignies, P. y Lemaire, S.D. (2012). *Glutathionylation in*

the photosynthetic model organism Chlamydomonas reinhardtii: a proteomic survey.
Mol Cell Proteomics 11(2): M111 014142.

- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Couturier, J.R., Gao, X.H., Rouhier, N., Trost, P. y Lemaire, S.P. (2012a). *Glutaredoxin s12: unique properties for redox signaling.* Antioxid Redox Signal 16(1): 17-32.
- Zamocky, M., Furtmuller, P.G. y Obinger, C. (2008). *Evolution of catalases from bacteria to humans.* Antioxid Redox Signal 10(9): 1527-1548.
- Zhang, H. y Forman, H.J. (2012). *Glutathione synthesis and its role in redox signaling.* Semin Cell Dev Biol 23(7): 722-728.
- Zhang, Z., Peng, X., Li, S., Zhang, N., Wang, Y. y Wei, H. (2014). *Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes.* PLoS One 9(3): e90531.
- Zhong, L. y Holmgren, A. (2000). *Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations.* J Biol Chem 275(24): 18121-18128.
- Zuerner, R.L., Herrmann, J.L. y Saint Girons, I. (1993). *Comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity.* J Bacteriol 175(17): 5445-5451.

Bioq. Natalia Sasoni
Tesisista

Dr. Diego Gustavo Arias
Director

Dr. Sergio Adrián Guerrero
Co-director