

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO

Defensa antioxidante bacteriana.
Determinantes funcionales
de la superóxido dismutasa

Presentada por

Bioq. Cecilia B. Di Capua

Director: Dr. Néstor Cortez



ROSARIO - ARGENTINA
2011

Defensa antioxidante bacteriana. Determinantes funcionales de la superóxido dismutasa

Cecilia Beatriz Di Capua

Bioquímica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor) en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR – CONICET) y en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), durante el período comprendido entre los meses de abril de 2006 a marzo de 2011, bajo la dirección del Dr. Néstor Cortez.

Parte de los resultados descritos en el siguiente trabajo de Tesis fueron dados a conocer en diferentes publicaciones y reuniones científicas

Publicaciones

Cecilia Di Capua, Ana Bortolotti, María Eugenia Farías, Néstor Cortez (2011). Ultraviolet-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean Wetlands display high catalase activity. FEMS Microbiology Letters. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02231.x.

Di Capua, C.; Cortez, N. (2008). Metal selectivity of the single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus*. Resumen publicado. Biocell, Vol. 32, Supplement, p.52.

Congresos

Di Capua, C.; Farias, ME y Cortez N. Poster: Aislamientos altoandinos de *Acinetobacter* sp. resistentes a UV-B presentan altos niveles de actividad catalasa. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología. Montevideo – Uruguay (2010).

Di Capua, C.; Cortez, N. Poster Metal selectivity of the single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus*. VII Iberoamerican Congress of Biophysics. Buzios – Brasil (2009).

Di Capua, C.; Farias, ME. y Cortez, N. Comunicación oral: Isolation of a photosynthetic bacterium from extreme environments in high-altitude andean wetlands. VI Congreso Nacional de Microbiología General, SAMIGE. Carlos Paz – Argentina (2009).

Di Capua, C.; Cortez, N. Comunicación oral: Metal selectivity of the single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus*. 44^o Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) Carlos Paz – Argentina (2008).

Di Capua C., Tabares L y Cortez N. Poster: Determinantes estructurales de la selectividad de metal de la superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Ciudad Autónoma de Bs. As.- Argentina (2007).

Di Capua C., Tabares L y Cortez N. Poster: Mutantes de la Superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*. Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario (SBR). Rosario – Argentina (2006).

Agradecimientos

Ante todo quiero expresar mi gran agradecimiento al Dr. Néstor Cortez, mi director, quien me ha guiado en este trabajo de tesis transmitiendo sus conocimientos y ayudándome a crecer tanto personal como profesionalmente. En estos 5 años de tesis, gracias a Néstor, he aprendido no sólo criterios de laboratorio sino también el espíritu del compañerismo en el trabajo y la generosidad desinteresada con los demás.

También quiero agradecer al Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) y a CONICET por brindarme el espacio físico, los subsidios (PICTR 1707) y las becas que me han permitido realizar mi doctorado. A todos los miembros del IBR que siempre han estado dispuestos a compartir conocimientos y material de trabajo. Es invaluable para mí haber tenido la oportunidad de formarme entre tantos científicos de tan alto nivel y capacidad. A la facultad por ser la que me introdujo en el mundo de la ciencia y me sigue dando la posibilidad de formándome y transmitir mis conocimientos a través de la docencia.

En particular quiero dar gracias al área de Biología Molecular donde encontré compañeros, amigos y maestros. A los docentes del área. Al Lab 1, Lab 2, Lab 3, Qca. Biológica, Lab 15 y Terraza. Y un agradecimiento especial a Claudia, con su ayuda facilitó la preparación de material para el desarrollo de los experimentos de esta tesis.

A los integrantes del área de Biofísica que siempre estuvieron dispuestos a ser generosos con nuestro grupo en todo sentido, compartiendo material de trabajo y cediendo tiempo a las consultas.

A la Dra. Ma. Eugenia Farías y a su equipo, por habernos permitido ingresar en el mundo de las bacterias extremófilas de la Puna. A Omar, por estar siempre dispuesto a colaborar y a trabajar juntos.

A la Dra. Paula Casati y su equipo de colaboradores, que me facilitaron el sistema de lámparas de UV usadas en esta tesis. Siempre me han facilitado mis ensayos siendo muy buenos compañeros.

A mis amigos de la Facu, a Gaby, Eve y Augusto. Gracias a ellos pude recibirme de Bioquímica, fue un camino donde crecí mucho.

Teniendo en cuenta que mi mesada está en la interfase, quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio que en muchos casos son también amigos. A Jeorget, Lisandro, Nati, Liana; a los del otro lado, Paulita, Julia, Fito, Irina (nueva incorporación), Andrea y Angi (las chicas de Roveri); y a los biofísicos de arriba. Y por supuesto a los de micro de al lado, Mariana, Santi, Laura, Anita y Tato.

Especialmente quiero agradecer a las placiteras (Tete, Romi, Gigi y Paulita) con quienes compartí almuerzos, chismes y muy divertidos momentos, así como situaciones que nos tocaron en la vida durante estos años. Gracias por haberme escuchado, aconsejado y simplemente haberme acompañado cuando lo necesité.

Al Rhodoteam... Cada uno significa para mí algo especial. David, la última incorporación al grupo, ya se ha ganado la confianza de todos y es uno más del laboratorio. A Matías y a Gabriel que fueron tesinistas del grupo y ya no están, pero han dejado huella por acá. A Leandro que me heredó la RcSOD y sus recetas. A Vero,

mi compañera de mesada, te he extrañado mucho cuando estuviste afuera y me alegra enormemente tenerte de vuelta. A Ana, no hay palabras para expresar lo valiosa que es para mi tu compañía en el laboratorio, has sido para mi una compañera, maestra, consejera y verdadera amiga.

A mi familia... A mis padres que me dieron siempre la posibilidad de estudiar y formarme. Especialmente a mi papá por haber estimulado desde que yo era muy pequeña la inquietud por el conocimiento y la ciencia. A mi mamá por haber educado en mí el aprecio al estudio y al trabajo.

A mi hermana, que desde que era chica me ha enseñado a seguir adelante a pesar de las dificultades y adversidades de la vida. A mi hermano, que ha consentido cuánto capricho intelectual tuve de chica, desde China hasta la Ingeniería Genética. A ambos, por darme su cariño.

A mis sobrinos. Ariel fue testigo de mis horas de estudio durante la carrera de grado cuando se quedaba en mi pieza para que le rasque la espalda. A Germán, mi ahijado, que piensa que soy una científica loca. A Agustín, el pequeño más dulce del mundo. A Sofía, reflejo de la pequeña Ceci pero por suerte más normal que yo. A los cuatro, los quiero mucho, mucho.

A mis cuñados, Marcela y Luis, me conocen desde muy chica y han compartido este camino de crecimiento conmigo.

A mis amigas, Noel, Lore, Sole, Rocío, Betty, Mara, Chula y Cuchi. Si bien soy una de las más "raras" del grupo, no soy la única, todas somos "especiales". Gracias por ser mis amigas, por haber compartido conmigo tantas experiencias y haberme apoyado en todas las vueltas de mi vida.

A Lennon, el único testigo de las horas que estuve escribiendo la tesis en casa. Cómodamente desde el sillón, él fiscalizó mi tarea.

A Andrés, gracias por los 14 años que estamos juntos. Desde que juntabas insectos para mi colección, sabés que soy muy "particular". Gracias por aceptarme como soy, por alentarme a hacer lo que me gusta y por compartir cada día conmigo. Gracias por soñar conmigo un futuro para los dos como familia.

A mi familia

A Andrés

Indice

Indice	7
Abreviaturas	9
CAPITULO I: Introducción	11
El oxígeno en la Tierra	11
Las especies reactivas del oxígeno	12
La defensa antioxidante.....	16
CAPITULO II: Materiales y métodos	20
Cepas y plásmidos.....	20
Medios de cultivo	21
Soluciones tampón	22
Condiciones de crecimiento de bacterias fotosintéticas.....	22
Pruebas bioquímicas microbiológicas.....	23
Espectro de membranas y pigmentos fotosintéticos	23
Desafíos con agentes oxidantes y radiación UV-B.....	24
Preparación de extractos proteicos solubles.....	24
Purificación y replegado in vitro de RcSOD recombinante.....	25
Determinación de concentración de proteínas	26
Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	26
Espectros de dicroísmo circular y estabilidad térmica de RcSOD	26
Determinación de actividades enzimáticas	27
Superóxido dismutasa	27
Catalasa.....	28
Determinación de concentración de metal.....	28
Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos	29
Extracción ADN genómico.....	29
Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de 16S rADN	29
Electroforesis de ácidos nucleicos	29
Secuenciación de productos de PCR.....	30
Comparación de secuencias de 16S rADN y construcción de árbol filogenético de cepas del género <i>Acinetobacter</i>	30
CAPITULO III: Selectividad de metal de la superóxido dismutasa de <i>Rhodobacter capsulatus</i>.....	32
Introducción	32

Resultados	38
Expresión soluble de <i>RcSOD</i> recombinante	38
Captura de metal <i>in vivo</i>	40
Captura de metal <i>in vitro</i>	43
Estabilidad térmica de Mn- <i>RcSOD</i> y Fe- <i>RcSOD</i> , relación con el estado redox del metal	48
Discusión	52
CAPITULO IV: Defensa antioxidante de aislamientos bacterianos altoandinos	57
Introducción	57
Resultados	63
Aislamientos del género <i>Acinetobacter</i>	63
Análisis filogenético.....	63
Enzimas antioxidantes.....	66
Tolerancia a desafíos pro-oxidantes y radiación UV-B.....	68
Respuesta de las enzimas antioxidantes a desafíos con agentes pro-oxidantes y radiación UV-B ...	71
Efecto de la actividad catalasa sobre la resistencia a la radiación UV-B	72
Aislamiento y caracterización de una bacteria fotosintética: <i>Rhodopseudomonas sp.</i>	75
Aislamiento de bacterias fotosintéticas	76
Comparación de secuencias del rADN 16S	77
Detección de actividad superóxido dismutasa.....	78
Sensibilidad a agentes pro-oxidantes y a radiación UV-B	79
Aislamientos del <i>phylum Actinobacteria</i>	82
Actividad de enzimas antioxidantes	84
Sensibilidad a agentes pro-oxidantes y a radiación UV-B	85
Discusión	88
Conclusiones generales	96
Resumen	98
Bibliografía	99

Abreviaturas

(6-4)-PP: pirimidina (6-4) pirimidona

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

Amp: ampicilina

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

AT: 3-amino-1,2,4-triazol

Cm: cloranfenicol

CPD: ciclobutano pirimidina

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

DMSO: dimetilsulfóxido

DSMZ: Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares

DTT: ditioneitol

EDTA: etilen diamino tetraacético

ERO: Especie reactiva del oxígeno

HP: hidroperoxidasa

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactósido

kDa: kilo Dalton

Km: kanamicina

LB: Luria Bertani

MES: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

MV: metilviológeno

NB: nutrient broth (caldo nutritivo)

NBT: azul de nitro tetrazolio

pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pka: es el logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil

PM: peso molecular

PMSF: fenil-metil-sulfonil-fluoruro

ppm: partes por millón

PY: peptone-yeast (peptona-levadura)

rADN: ácido desoxirribonucleico ribosomal
Rc: Rhodobacter capsulatus
RUV: Radiación ultravioleta
SDS: dodecil sulfato de sodio
SOD: superóxido dismutasa
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TAM: Mezcla de Tris-HCl, Acetato de sodio y MES
TEMED: Tetrametiletilenediamina
T_m: temperatura de melting o fusión
Tris: tris-hidroximetil-amino metano
TSI: triple azúcar hierro
UFC: unidad formadora de colonia
UV: ultravioleta

CAPITULO I: Introducción

El oxígeno en la Tierra

Los primeros procariotas aparecieron hace aproximadamente 3500 millones de años atrás. Su vida era pobre, no había O₂ y por lo tanto tampoco ozono que protegiera al planeta de la emisión ultravioleta (UV) del sol. Estos microorganismos debían escapar constantemente de la luz y su vida transcurría en la oscuridad. La absorción de luz UV causaba daño en las estructuras proteicas y en ácidos nucleicos, lo que requirió el desarrollo de mecanismos protectores (Mulkidjanian & Junge, 1999). Los centros de reacción de la maquinaria fotosintética moderna exhiben propiedades protectoras contra la radiación UV, estas proteínas transmembrana contienen grupos de aminoácidos aromáticos capaces de absorber luz UV (Mulkidjanian & Junge, 1999). La alta energía de excitación UV de los residuos aromáticos migra a moléculas pigmento perdiendo así sus características perjudiciales debidas a las transiciones intramoleculares (Samuilov, 2005). La Naturaleza ha seleccionado las clorofilas y bacterioclorofilas como los pigmentos más convenientes porque su nivel más bajo de excitación singlete *in vivo* corresponde a un rango espectral entre 650–1000 nm siendo fotoquímicamente menos perjudiciales (Samuilov, 2005). Se ha sugerido que la maquinaria fotoquímica de la fotosíntesis fue originalmente diseñada por la Naturaleza como protección contra la radiación UV (Mulkidjanian & Junge, 1999). Posteriormente la maquinaria fue mejorada y adaptada para la conversión de energía durante la fotosíntesis (Mulkidjanian & Junge, 1999). Esto representó un avance evolutivo gigante ya que se logró resolver el suministro de energía celular utilizando una fuente inagotable, la luz solar.

El siguiente paso en la evolución de la vida requirió la solución del problema del dador de electrones, para lo cual surgieron nuevos organismos que combinaron los principios típicos de los centros de reacción tipo I y II. Y es así como hace 3200 millones de años aparecieron las cianobacterias que utilizaron el H₂O como dador de electrones y los fotomobilizaron mediante dos fotosistemas

secuenciales (Samuilov, 2005). La fotosíntesis oxigénica es llevada a cabo tanto por plantas y algas como por bacterias fotótrofas y ha sido la responsable de la acumulación del oxígeno molecular en la atmósfera terrestre (Blankenship, 1992).

La acumulación de oxígeno en la tierra permitió la generación de ozono que actúa como escudo protector contra la radiación solar y además la propagación de organismos capaces de realizar respiración aeróbica. En este proceso la oxidación de carbohidratos a CO_2 y H_2O utilizando O_2 como aceptor final de electrones, permite mediante la fosforilación oxidativa la producción de grandes cantidades de ATP.

Las especies reactivas del oxígeno

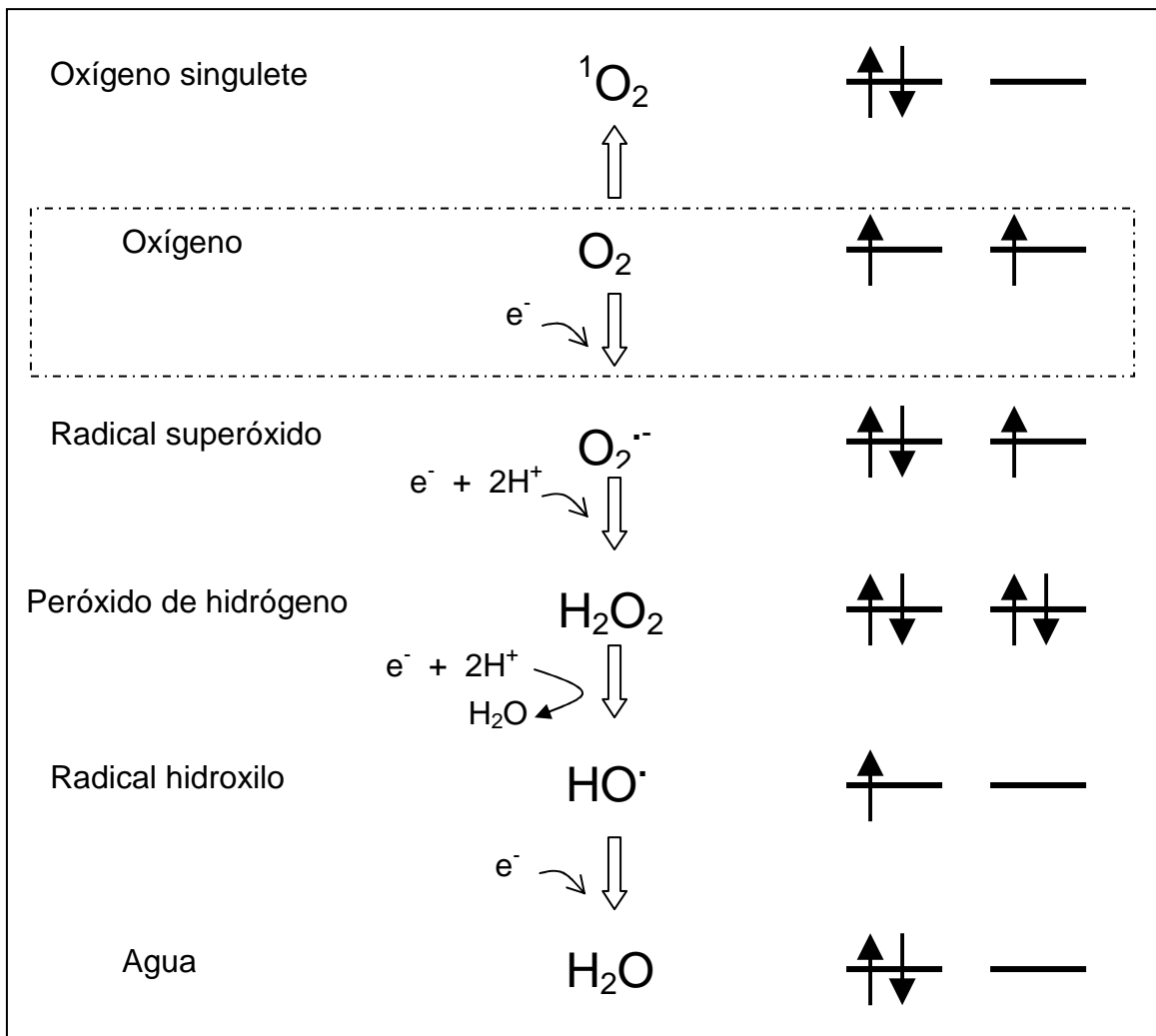
El O_2 es estable en condiciones normales debido a la restricción cinética que le imponen sus dos electrones desapareados pero con spin alineados. Solo reacciona con metales de transición o radicales orgánicos con electrones desapareados y no puede oxidar eficientemente aminoácidos o ácidos nucleicos (Imlay, 2003).

Durante la reducción del O_2 a H_2O se pueden generar intermediarios altamente inestables y capaces de reaccionar con diferentes componentes celulares llamados **especies reactivas del oxígeno (EROs)** (Fridovich, 1998). Cuando el O_2 acepta un electrón proveniente de un agente reductor, el producto primario generado es un radical libre con carga eléctrica negativa llamado anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). La adición de otro electrón conduce a la formación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 puede descomponerse y luego de ganar otro electrón generando el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), especie altamente reactiva. Esta reacción tiene una constante de velocidad cercana a cero en sistemas biológicos, pero en presencia de hierro como catalizador permite la generación *in vivo* del $\cdot\text{OH}$, fenómeno descrito como la reacción de Fenton (Kehrer, 2000). La formación de las EROs se resume en la figura 1.

La incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de H_2O . Otras especies derivadas del oxígeno han sido identificadas en los sistemas biológicos, como por ejemplo el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), que puede ser formado por absorción directa de radiación, por fotólisis (destrucción por acción de la luz) del ozono en aire contaminado, por irradiación de O_2^- o secundariamente a la excitación del óxido de nitrógeno luego de la absorción de energía radiante.

Otra especie altamente dañina es el peroxinitrito (ONOO^-) formado por la reacción entre el óxido nítrico (NO^\bullet) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$). El NO^\bullet es sintetizado por la sintasa de óxido nítrico y participa en diferentes procesos de señalización celular (Fridovich, 1998).

Figura 1: Esquema de las oxidaciones y reducciones a partir del oxígeno molecular



Las EROs pueden reaccionar con cualquier componente celular desde lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas como pigmentos y azúcares. La carga aniónica del $\text{O}_2^{\bullet -}$ le impide ejercer actividad electrofílica con moléculas ricas en electrones. Es por esto que solo puede reaccionar con pocas biomoléculas, entre ellas las enzimas que contienen centros Fe-S, como aconitasa y dehidratasa. La carga positiva local de los átomos de Fe atrae electrostáticamente al $\text{O}_2^{\bullet -}$ siendo particularmente susceptible al daño oxidativo del anión (Imlay, 2003). Esto tiene como consecuencia no sólo la pérdida de actividad enzimática, sino también un aumento intracelular de hierro que como se mencionó, cataliza la producción de radical hidroxilo a partir de H_2O_2 (Kehrer, 2000).

El H_2O_2 es también un oxidante débil debido a la estabilidad del enlace oxígeno-oxígeno que limita su reactividad. Si bien, puede oxidar residuos de cisteína (-SH) o metionina (SCH_3) de proteínas, esta reacción es muy lenta a menos que el residuo se encuentre adyacente a un residuo cargado positivamente permitiéndole adquirir un carácter más negativo y formar un anión tiolato ($-\text{S}^-$) (Bindoli y col., 2008). La forma tiolato de la cisteína es el residuo aminoácido más nucleofílico que puede reaccionar con el H_2O_2 . Varias proteínas como quinasas, fosfatasas y factores de transcripción con importante función fisiológica contienen residuos tiolatos capaces de reaccionar reversiblemente con el H_2O_2 (Imlay, 2003).

En contraste, el radical hidroxilo reacciona rápidamente con la mayoría de las biomoléculas, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos. Por ello se considera que la mayoría de los efectos dañinos del H_2O_2 se deben a su conversión en $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Fenton en presencia de hierro (Imlay, 2003). La reactividad del radical hidroxilo puede llevar a entrecruzamiento de cadenas polipeptídicas y rotura de enlaces peptídicos.

Los ácidos nucleicos también son blanco de las EROs, especialmente del radical hidroxilo, promoviendo modificaciones de bases y azúcares, pérdida bases, formación de enlaces cruzados y ruptura de cadenas (Cooke y col., 2003). Los daños al ADN nuclear o mitocondrial pueden conducir a malfuncionamiento metabólico, alteraciones del ciclo celular, muerte celular o a la propagación de mutaciones a la siguiente generación.

La peroxidación de lípidos es uno de los daños a corto plazo más importante que puede sufrir una célula como consecuencia de las EROs. Las membranas lipídicas, especialmente los fosfolípidos, que contienen ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación. La reacción inicial del radical hidroxilo con el ácido graso insaturado genera un radical lipídico que puede reaccionar con el oxígeno molecular para generar un radical peroxil lipídico ($\text{LOO}\cdot$). El $\text{LOO}\cdot$ puede sustraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso vecino para formar un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un segundo radical lipídico (Catala, 2006). La peroxidación de lípidos lleva a la perturbación

del ensamblado de membranas, causando cambios en la fluidez y permeabilidad, alteraciones del transporte de iones e inhibición de procesos metabólicos (Nigam & Schewe, 2000).

Cuando se produce aumento de las EROs llevando a un desbalance prooxidante en un sistema biológico se genera una situación conocida como **estrés oxidativo** (Videla & Fernandez, 1988; Sies, 1997). Debido a que esta condición puede resultar un grave peligro para la vida celular, la evolución ha desarrollado mecanismos de detoxificación de las EROs y de reparación de los daños por ellas producidos (Benzie, 2000).

La defensa antioxidante

En los últimos 30 a 40 años, el estudio de los sistemas de defensa antioxidante así como de los agentes causales del estrés oxidativo ha cobrado interés especialmente debido a la asociación que se ha hecho con el envejecimiento (Romano y col., 2010), las enfermedades neurodegenerativas (Takeuchi & Takahashi, 2007; Gella & Durany, 2009) y el cáncer (Visconti & Grieco, 2009). Sin embargo, el primer antecedente de una enzima detoxificadora de EROs fue reportado en siglo XIX por Louis Jacques Thénard (1818) al descubrir el H_2O_2 y una sustancia capaz de descomponerlo. Varios años más tarde, en 1900, Oscar Loew le dio el nombre de **catalasa** a esta enzima que descomponía H_2O_2 en numerosas plantas y animales (Loew, 1900). A mediados del siglo XX se reconoció esta actividad en microorganismos como *Escherichia coli* y se la asoció a la tolerancia a peróxidos y a radiación ultravioleta (Clark, 1952; Adler y col., 1956).

La primer **superóxido dismutasa (SOD)**, en cambio, fue descubierta como tal en 1969 (McCord & Fridovich, 1969), asignándole esta actividad a la previamente descrita hemocupreína (Mann & Keilin, 1938). El descubrimiento de esta proteína fue el resultado del interés que había por conocer el reservorio de cobre en la sangre tanto en suero como en las células sanguíneas. A partir

de este hallazgo, se encontró actividad superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD) en numerosos tejidos de origen animal y en células procariotas. Poco tiempo después, el Dr. Irwin Fridovich y sus colaboradores describieron la primer SOD bacteriana que a diferencia de la Cu/ZnSOD humana, contenía manganeso como cofactor (Keele y col., 1970).

La superóxido dismutasa que cataliza la desproporción del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, constituye la primer línea de defensa antioxidante enzimática, hallándose incluso en microorganismos anaerobios (McCord y col., 1971).

Además de los mecanismos enzimáticos, existen otros no enzimáticos que también forman parte de la barrera antioxidante (Sies, 1997). Los sistemas no enzimáticos están constituidos por compuestos de bajo peso molecular como ascorbato, glutatión, alfa-tocoferol, carotenos y otros. Su concentración está regulada por peroxidases, reductasas y otras enzimas que mantienen el balance de estos compuestos.

Una actividad más recientemente descrita es la superóxido reductasa que cataliza la reducción del anión superóxido utilizando un sustrato reducido (Jenney y col., 1999). Hasta el momento solo se ha encontrado esta enzima en anaerobios y microaerófilos (Lombard y col., 2000; Niviere & Lombard, 2002; Im y col., 2009), confiriéndole a estos microorganismos una ventaja selectiva ya que, a diferencia de las SODs, no genera oxígeno como producto (Niviere & Fontecave, 2004).

La barrera antioxidante (enzimática y no enzimática) es altamente eficiente en condiciones fisiológicas, pero cuando ocurre una situación que genera estrés oxidativo, se produce daño celular que debe ser reparado por mecanismos secundarios (Davies, 2000). Existen **sistemas de reparación** de los diferentes blancos agredidos por las EROs. La lipoperoxidación de fosfolípidos de membrana puede ser reparada por fosfolipasas (Nigam & Schewe, 2000) y glutatión peroxidasa (Kim y col., 2009).

Para el daño a proteínas, los sistemas enzimáticos de tiol-disulfito oxidorreductasas constituyen el principal mecanismo de protección y reparación de grupos sulfidrilos proteicos bajo condiciones de estrés oxidativo

(Starke y col., 1997). Se ha reportado que las proteínas dañadas en residuos de metionina pueden ser reparadas por la enzima metionina sulfóxido reductasa (Ogawa y col., 2006). Como se mencionó antes, los centros Fe-S son blancos de los pro-oxidantes, siendo su reparación muy importante para el funcionamiento celular. Se ha demostrado que existe más de un componente interviniendo en la reconstrucción de los centros como la proteína YtfE (Todorovic y col., 2008) y los sistemas de ensamblado *Isc* y *Suf* (Djaman y col., 2004). En el caso de que los residuos proteicos sean irreversiblemente oxidados, la proteína es conducida a degradación por proteasas (Petropoulos & Friguet, 2006).

Uno de los blancos de daño oxidativo más críticos es el material genético por lo cual la maquinaria de reparación del ADN es fundamental para mantener la viabilidad celular (Sies, 1997). En *Escherichia coli* se ha observado que las endonucleasas III y VIII escinden pirimidinas oxidadas, mientras que la proteína formamidapirimidina-ADN-glicosilasa elimina las C8-hidroxi-guaninas y las purinas con anillos de imidazol abiertos (Laval, 1996). Gracias a estos mecanismos se previene que las posibles mutaciones que generan las EROs se fijen en el genoma de la especie reparando los daños químicos producidos.

En el presente trabajo de tesis, nos planteamos como objetivo general el estudio de la defensa antioxidante bacteriana desde dos abordajes diferentes y complementarios. En ambos casos, enfocamos el trabajo en la caracterización ya sea funcional y/o estructural de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa.

En nuestro laboratorio hemos utilizado, desde hace varios años, como modelo de estudio la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus*. Este microorganismo posee una amplia versatilidad metabólica pudiendo crecer tanto

en condiciones aeróbicas obteniendo energía por respiración, así como en condiciones fotosintéticas en anaerobiosis con luz. La única superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus* fue clonada y caracterizada previamente al desarrollo de esta tesis (Cortez y col., 1998; Tabares y col., 2003). Se describió como una enzima cambialística que une mayoritariamente manganeso tanto en condiciones de crecimiento aeróbicas como fotosintéticas (Tabares y col., 2003). Esta particularidad nos motivó a estudiar los factores involucrados en la selectividad de metal de esta enzima aprovechando la propiedad cambialística de esta SOD que la hace interesante como modelo de estudio. Sobre este eje temático se centra la primera parte de esta tesis (Capítulo III) donde se detallan los resultados obtenidos de ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando principalmente la proteína salvaje y en algunos casos, seis variantes mutantes de la misma.

En el marco de un proyecto de colaboración con los laboratorios de la Dra. María Eugenia Farias (PROIMI – CONICET) y del Dr. Héctor Álvarez (Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco) comenzamos la caracterización de la defensa antioxidante en aislamientos altoandinos y su participación en la tolerancia a condiciones ambientales extremas. Desde hace 6 años se está construyendo un cepario de bacterias provenientes de lagunas de altura (*Extremophyle Strain Collection, LIMLA*) que poseen características únicas de tolerancia a condiciones ambientales extremas como las observadas en la Puna. Los aislamientos utilizados en este trabajo incluyen cepas del género *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Rhodococcus* y finalmente una bacteria fotosintética del género *Rhodopseudomonas* que fue aislada en nuestro laboratorio a partir de aguas de la Laguna Azul. En el Capítulo IV de esta tesis se describen ensayos de tolerancia a radiación UV y a agentes prooxidantes, así como la medida de las actividades enzimáticas detoxificadoras, SOD y catalasa, de los aislamientos mencionados.

CAPITULO II: Materiales y métodos

Cepas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la **tabla 1**:

Cepa	Procedencia
<i>Escherichia coli</i> QC774.(DE3)	
GC4468 Φ (sodA-lacZ)49 Φ (sodB-kan)1- Δ_2 Cm ^r Km ^r (DE3)	(Carlioz & Touati, 1986)
Bacterias fotosintéticas	
<i>Rhodopseudomonas</i> sp A80	Laguna Azul (Di Capua y Cortez, presente tesis)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> 1e5	(Weckesser y col., 1973)
Actinobacterias	
<i>Nocardia</i> sp. A5	Laguna Azul (Ordoñez y col., 2009)
<i>Dietzia</i> sp. A12	Laguna Azul (Ordoñez y Farias, comunicación personal)
<i>Rhodococcus</i> sp. CH13	Laguna Chaxas (Ordoñez y Farias, comunicación personal)
Género <i>Acinetobacter</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i> DSM 30007	Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963	Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> DSM 2403	Colección Alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ)
<i>Acinetobacter</i> sp. Ver3	Laguna Verde (Ordoñez y col., 2009)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> Ver5	Laguna Verde (Ordoñez y col., 2009)
<i>Acinetobacter</i> sp. Ver7	Laguna Verde (Ordoñez y col., 2009)
<i>Acinetobacter lwoffii</i> N40	Laguna Negra (Ordoñez y col., 2009)
Plásmido	
pESOD3228 <i>oriR</i> (ColE1) <i>oriR</i> (f1) Amp ^r , sobre-expresa RcSOD	(Tabares y col., 2003)

Medios de cultivo

- Luria-Bertani (LB)
 - 0,5% p/v extracto de levadura
 - 1% p/v peptona de caseína
 - 1% p/v NaCl
- Peptone-Yeast (PY)
 - 1% p/v bactopectona
 - 0,05% p/v extracto de levadura
 - 2mM MgCl₂
 - 2mM CaCl₂
 - 45µM FeSO₄
- Peptone-Yeast (PY) suplementado
Caldo PY adicionado con:
 - 0,4% p/v ácido málico
 - Trazas (1,59 µg/ml sulfato de manganeso; 2,8 µg/ml ácido bórico; 0,04 µg/ml nitrato cúprico; 0,24 µg/ml sulfato de cinc; 0,75 µg/ml molibdato de sodio)
 - Vitaminas (0,55 µg/ml colina; 0,165 µg/ml tiamina; 0,58 µg/ml ácido nicotínico; 0,1 µg/ml pantotenato de sodio; 0,6 ng/ml biotina; 0,16 µg/ml ácido para amino benzoico; 0,6 µg/ml meso inositol; 0,04 µg/ml vitamina B12; 0,1 µg/ml riboflavina)
 - 10mM sulfato de amonio
- Nutrient-Broth (NB)
 - 0,25% p/v extracto de levadura
 - 0,5% p/v peptona de caseína
 - 0,5% p/v NaCl
- Médio mínimo M9
 - Sales M9 (12,8 g/l Na₂HPO₄ · 7 H₂O; 3 g/l KH₂PO₄; 0,5 g/l NaCl; 1 g/l NH₄Cl)
 - 20 % fuente de carbono (Ej. glucosa)

Para cultivos en medio sólido se suplementó los caldos con agar 2%.

Soluciones tampón

La **tabla 2** resume las soluciones tampón utilizadas en esta tesis:

Nombre abreviado	Nombre completo	pH
MES	Acido 2-(N-morfolino)etanosulfónico	5.6
		6.0
		6.6
MOPS	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico	6.0
		7.0
		7.5
		7.8
Fosfato de potasio o sodio	Mezcla de H_2KPO_4 o H_2NaPO_4 y HK_2PO_4 o HNa_2PO_4	6.4
		7.0
		7.8
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano acidificaco con HCl	6.8
		7.5
		8.0
		8.8
TAM	Mezcla de Tris-HCl, Acetato de sodio y MES	5.6
		6.0
		6.5
		7.0
		7.2
		7.5
		7.7
8.0		
		8.5

Condiciones de crecimiento de bacterias fotosintéticas

Las células de las cepas fotosintéticas fueron cultivadas a 28 – 32 °C en medio rico PY o PY suplementado. Los cultivos aeróbicos fueron obtenidos incubando los frascos de crecimiento, conteniendo un 10% de volumen de medio de cultivo, con fuerte agitación orbital (250 rpm). Para el crecimiento anaeróbico fotosintético se utilizaron frascos llenos con medio de cultivo con tapa a rosca completamente y sellados con *Parafilm*[®]. Estos cultivos fueron iluminados utilizando lámparas de tungsteno de 75 watt a 30 cm de distancia. Los cultivos *stand* (sin agitación) se obtuvieron en los mismos frascos conteniendo un 80% de volumen y fueron iluminados de la misma manera.

Pruebas bioquímicas microbiológicas

Se realizó un extendido en portaobjetos de cultivos saturados de las cepas de *Acinetobacter* y se realizó la tinción de Gram (Schreckenberger & von Graevenitz, 1999). Cubriendo con gota de aceite se observó en microscopio óptico con objetivo de inmersión.

Se resuspendió una colonia aislada en solución fisiológica y se colocó un disco impregnado con un indicador redox que toma color azul o marrón cuando la bacteria expresa citocromo c oxidasa e incoloro cuando no posee tal enzima.

Para evaluar la capacidad de fermentar azúcares se estrió una colonia aislada en el fondo y superficie de TSI (*Triple Sugar Iron*, triple azúcar hierro) agar preparado en forma de pico de flauta (Hajna, 1945). Este medio rico contiene extracto de levadura, peptona, los azúcares sacarosa, lactosa y glucosa, y un indicador de pH. La visualización de un viraje de color del indicador luego de 12-24 horas de incubación a 30°C permite evaluar la capacidad fermentativa de la bacteria en estudio.

Una suspensión celular de baja densidad se observó en microscopio óptico con objetivo 40X para determinar si las bacterias son móviles o no.

Se sembró una colonia aislada en medio rico LB y se incubó a 44°C observándose luego de 12 horas si se obtuvo desarrollo bacteriano visible.

Espectro de membranas y pigmentos fotosintéticos

Se crecieron cultivos de bacterias fotosintéticas por 8 días en condiciones de anaerobiosis e iluminación. Para visualizar los complejos fotosintéticos de membrana, las células cosechadas por centrifugación se lavaron y resuspendieron en solución tampón fosfato 50 mM conteniendo 40% de glicerol. Se realizó un espectro visible entre 350 y 900 nm en espectrofotómetro *Shimadzu UV-2450* en cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Para visualizar pigmentos aislados, una alícuota de 0,6 ml de cultivo se centrifugó obteniéndose un sedimento celular que se resuspendió en igual volumen de una mezcla 7:2 de acetona-metanol (Li y col., 2003). Luego de centrifugación realizó un espectro visible del sobrenadante registrándose los valores de absorbancia entre 350 y 900 nm.

Desafíos con agentes oxidantes y radiación UV-B

Se crecieron cultivos celulares durante una noche y se diluyeron hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,4 para bacterias fotosintéticas y del género *Acinetobacter* y DO_{436nm} de 0,2 para las *Actinobacterias*. Las suspensiones celulares se sometieron a diluciones seriadas y se sembraron 10 μ l de cada dilución en placas de PY-agar o LB-agar suplementadas con metilviológeno (MV) o peróxido de hidrógeno según correspondiese. Placas sin suplementar fueron expuestas a 2,0 - 3,0 $W.m^{-2}$ de radiación UV-B por tiempos indicados utilizando lámparas de UV-B (*Biorad*). La intensidad de radiación fue medida utilizando un radiómetro UV-B/UV-A (*UV203 AB radiometer; Macam Photometrics*).

Para evaluar la participación de la actividad catalasa en la tolerancia a UV-B, los cultivos fueron incubados por una hora con 5mM y 50mM de 3-amino-1,2,4-triazol (AT) o con 2,5 mM de peróxido de hidrógeno, antes de ser sometidos a diluciones seriadas.

Para establecer el porcentaje de sobrevivencia luego de la exposición a agentes oxidantes o radiación UV-B se crecieron cultivos a 30°C con agitación moderada hasta DO_{600nm} de 1,3 - 1,5. Luego de dilución hasta DO_{600nm} de 0,4 las suspensiones celulares fueron incubadas por 1 hora a 30°C en presencia de cantidades indicadas de metilviológeno o peróxido de hidrógeno, o expuestas por tiempos fijos a radiación UV-B.

Al finalizar los desafíos, los cultivos se sometieron a diluciones seriadas (en cuatro réplicas) en caldo LB frío y se sembraron en placas de LB-agar para el posterior conteo de unidades formadoras de colonias (UFCs).

Preparación de extractos proteicos solubles

Los cultivos bacterianos fueron cosechados por centrifugación a 4200 g durante 10 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en solución tampón conteniendo Tris-HCl 20 mM pH8, EDTA 0,5 mM, 2-mercapto etanol 14 mM, glicerol 10%, PMSF 0,1 mM y NaCl 100 mM. Las células se trataron con

ultrasonido en desintegrador ultrasónico (*VibraCell*[®], *Sonics & Materials Inc.*) utilizando ciclos de 10 segundos a 35% de amplitud para las bacterias fotosintéticas y 20% de amplitud para las cepas de *E. coli* y del género *Acinetobacter*. En el caso de las *Actinobacterias* el lisado se realizó con prensa francesa (*French Pressure Cell Press*, *SLM AMINCO Instruments, Inc.*) a 1500 psi de presión. Todos los lisados fueron clarificados por centrifugación a 38000 g por 15 minutos.

Purificación y replegado in vitro de RcSOD recombinante

Se cultivaron células de *E. coli* QC774 (DE3) *sodA sodB* [pES3228] en medio rico LB a 37°C con agitación fuerte. Al alcanzar una $DO_{600nm} \sim 0.8$ se adicionó IPTG 0.5mM colectándose las células luego de 2 hora s. Los sedimentos celulares fueron lavados en solución PS (Tris-HCl 20 mM pH8, glicerol 10%, EDTA 0,1 mM, 2-mercapto etanol 3 mM, NaCl 100 mM) y resuspendidos en solución PSR (PS, PMSF 0,1 mM, ARNasa 1 µg/ml, ADNasa 0,5 mg por litro de cultivo, MgCl₂ 4 mM, 0,1% Tritón, 100 µg/ml lisozima). Después de incubar a 30°C con agitación suave durante 30 minutos para permitir la acción de las enzimas, el lisado se disgregó por sonicación, los cuerpos de inclusión se aislaron por centrifugación (12000 g por 15 minutos) y se resuspendieron en solución PSR. El proceso de resuspensión-sonicación-centrifugación se repitió una vez más para lavar las impurezas. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron finalmente en solución PS conteniendo Urea 8 M, eliminándose la materia insoluble por centrifugación a 20000g por 45 minutos. La apo-RcSOD desnaturalizada en urea fue reconstituida por dilución rápida en un volumen veinte veces mayor de solución tampón conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 8) y 2-mercapto etanol 3 mM, para obtener la Apo-RcSOD. Se añadieron 0.5 mM de Mn y Fe para conseguir las formas metaladas de la proteína, Mn-RcSOD y Fe-RcSOD, respectivamente. Finalmente, las proteínas fueron sembradas en una columna de intercambio aniónico (Q-Sepharosa) y eluidas con gradientes de NaCl (0-500 mM).

El protocolo acá descripto fue elaborado y optimizado durante la realización de la tesis doctoral del Dr. Leandro C. Tabares (Tabares y col., 2003; Tabares, 2006).

Determinación de concentración de proteínas

La concentración proteica de extractos solubles se determinó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando como patrón una solución de albúmina sérica bovina 1mg/ml.

Para la determinación de la concentración de RcSODs purificadas se utilizó el coeficiente de extinción a 280 nm de $48930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ calculado de acuerdo a la secuencia aminoacídica de RcSOD.

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes se llevó a cabo según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La concentración de acrilamida fue de 4,5% en los geles de concentración y de 12% en los geles de separación. En la preparación de geles no desnaturizantes se utilizaron las mismas soluciones descritas por Laemmli si el agregado de SDS. Las muestras no fueron calentadas antes de la siembra y la electroforesis se realizó en cámara fría a 4°C. Se utilizó una diferencia de potencial de 200 V para geles desnaturizantes y una corriente constante de 20 mA en geles nativos.

Como marcadores moleculares en geles desnaturizantes se utilizaron alfa-lactoalbúmina (14,2 kDa), tripsina (20,1 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y albúmina sérica bovina (66 kDa).

Espectros de dicroísmo circular y estabilidad térmica de RcSOD

Para caracterizar el plegamiento y estabilidad de la RcSOD se purificaron las tres formas de la proteína Apo-RcSOD, Fe-RcSOD y Mn-RcSOD por el método antes descrito.

Se realizaron espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano (190 – 250 nm) con el espectropolarímetro J810 (Jasco). Las proteínas se diluyeron

en solución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 8 y 2-mercapto etanol 3 mM, hasta una concentración final de 0,3 – 0,5 mg/ml.

Para los estudios de estabilidad térmica las proteínas diluidas en la solución tampón descrita se sometieron a un incremento de temperatura de 1°C por minuto entre 30 y 95°C registrándose los valores de elipticidad a 223 nm.

Para evaluar el efecto del estado redox del metal, se trató las soluciones proteicas con un exceso 2 molar de ditionito de sodio para obtener las formas reducidas del metal y con cantidades equimolares de permanganato de potasio para conseguir las formas oxidadas del metal. Ambos tratamientos se llevaron a cabo burbujeando con argón o nitrógeno.

Determinación de actividades enzimáticas

Superóxido dismutasa

Para las medidas de actividad superóxido dismutasa en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes se utilizó el método de Beauchamp y Fridovich (Beauchamp & Fridovich, 1971). Luego de la electroforesis los geles fueron incubados con una solución tampón de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM al pH indicado por 15 minutos. Para el revelado se adicionó solución tampón conteniendo NBT 500 µg/ml, riboflavina 45 µg/ml y TEMED 0,2% y se incubó en oscuridad por 15 minutos. La actividad SOD fue visualizada luego de exposición de los geles a la luz, como una zona incolora sobre un fondo púrpura. Para los estudios de inhibición, los geles se incubaron adicionando 2 mM de peróxido de hidrógeno o 2 mM de cianuro de potasio.

Las medidas espectrofotométrica de actividad superóxido dismutasa fueron realizadas por el método de inhibición de la reducción del citocromo c mediada por la reacción entre la xantina y la xantina oxidasa (McCord & Fridovich, 1969). La reacción se llevó a cabo a 25°C y se inició por dilución de la xantina oxidasa en 1ml de solución tampón compuesta por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM, xantina 50 µM y citocromo c 10 µM, mezclando 5 veces por inversión. Se utilizó una cantidad necesario de xantina oxidasa tal

que la velocidad de reducción del citocromo *c*, medida como el cambio de la absorbancia a 550 nm, fuese de 0,025 unidades de absorbancia por minuto. La unidad enzimática (U) se define como la cantidad de SOD necesaria para provocar un 50 % de inhibición de la velocidad de reducción del citocromo *c*. Para expresar la actividad de extractos crudos, la U se define como la cantidad de proteína total de extracto soluble necesaria para provocar un 50 % de inhibición de la velocidad de reducción del citocromo *c*.

Catalasa

Para las medidas de actividad catalasa *in situ* en geles nativos se utilizó el método descrito por Scandalios (Scandalios, 1968). Los geles se lavaron tres veces con solución tampón de fosfato 25 mM pH 7 por 10 minutos incubándose luego en presencia de 9 mM de peróxido de hidrógeno. Para el revelado se adicionó una mezcla de 2 % p/v de ferricianuro de potasio y 2 % p/v de cloruro férrico disueltos en la solución tampón mencionada. La actividad catalasa se observa como una zona incolora sobre un fondo verde.

La actividad catalasa fue cuantificada por consumo de peróxido de hidrógeno (Aebi, 1984) considerando un coeficiente de extinción molar de $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los extractos proteicos se diluyeron en solución tampón fosfato 25 mM pH 7 y se adicionó 15 mM de peróxido de hidrógeno siguiéndose la reacción por disminución de la absorbancia a 240 nm. La unidad enzimática (U) se define como el consumo de 1 micromol de peróxido de hidrógeno por minuto.

Determinación de concentración de metal

La concentración de metal fue determinada en un espectrofotómetro de llama *Metrolab*[®] AA250. Para las medidas de manganeso se utilizó una lámpara de cátodo hueco del metal, midiéndose la absorbancia a 279,49 nm, calibrándose con muestras patrón entre 0,125 y 4 ppm del ión metálico. En el caso del hierro se utilizó una lámpara de cátodo hueco de este metal midiendo absorbancia a 248,33 nm y calibrando entre 0,156 y 5 ppm.

Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

Extracción ADN genómico

La preparación de ADN genómico se realizó según el protocolo publicado en *Current Protocols* (Wilson, 2001). Inicialmente se indujo la lisis celular adicionando 0,5 % p/v de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 0,1 mg/ml de proteinasa K. Posteriormente por incubación con 1% p/v de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se remueven los polisacáridos y mediante extracción con solventes y alcoholes se obtiene el ADN cromosómico.

Reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de 16S rADN

Para la amplificación de genes de ADNr 16S se utilizaron cebadores degenerados publicados en la bibliografía 16S rDNAF (5'-AgAgTTTgATCHTggYTYAgA-3') y 16S rDNAR (5'-ACggYTACCTTgTTACgACTTC-3') (Heritier y col., 2004). Se utilizó como polimerasa termoestable la *GoTaq*[®] (*Promega*). Se emplearon 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, realizando una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa al 0,8-1% (Sambrook y col., 1989). Los geles fueron preparados en solución TAE (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 1 mM) y las muestras se suplementaron con azul de bromofenol, xilencianol y glicerol. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 1-5 V.cm⁻¹ de gel. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV. Se utilizaron como marcadores de peso molecular 1Kb *ladder* (*Gibco*) o ADN del bacteriófago lambda digerido con la enzima *HindIII*.

Secuenciación de productos de PCR

Los fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa fueron purificados con *PureLink® Purification Kit* y enviados a secuenciar al Servicio de secuenciación de la Universidad de Maine de los Estados Unidos de América. Se utilizaron como cebadores los mismos empleados para la amplificación.

Comparación de secuencias de 16S rADN y construcción de árbol filogenético de cepas del género Acinetobacter

Se obtuvieron 34 secuencias de fragmentos del rADN 16S a partir de la base de datos disponible en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y cuyos números de acceso se listan en la Tabla 3. Los fragmentos del rADN 16S de los 4 aislamientos del género *Acinetobacter* estudiados en este trabajo fueron previamente amplificados utilizando primers universales (F-27: AGAGTTTGATAMTGGCTCAG, R-1492: TACGGYTACCTTGTTACGACTT) y secuenciados según se ha descrito (Ordoñez y col., 2009). La búsqueda de la base de datos de nucleótidos se realizó utilizando el servicio *BLAST* brindado por el *NCBI*. Para la construcción del árbol filogenético, las secuencias fueron alineadas usando el programa *CLUSTAL X 2.0.9*, que es una interface para *Windows* del programa de alineamientos múltiples *ClustalW* (Larkin y col., 2007). Se utilizó el programa *TreeView Version 1.6.6* para realizar las filogenias. Se eliminaron manualmente todas las posiciones conteniendo bases ausentes (gaps) y datos perdidos. Los cálculos de distancia fueron realizados mediante el método del vecino más cercano (del inglés *Neighbor-Joining*) y los intervalos de confianza de las interferencias obtenidas por este método fueron posicionadas mediante el procedimiento de *bootstrap* (Saitou & Nei, 1987).

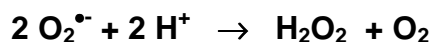
Tabla 3: Números de Acceso del *GenBank* (NCBI) de las secuencias del rADN 16S utilizados en esta tesis

Nro de acceso	Cepa	Nro de acceso	Cepa
AM778686.2	Ver3	X81663.1	<i>A. johnsonii</i> DMS6963
AM778688.2	Ver5	EU337121.1	<i>A. johnsonii</i> 3B2
AM778690.2	Ver7	AJ293694.1	<i>A. gyllenbergii</i> RUH422T
AM778696.2	N40	AJ293693.1	<i>A. gyllenbergii</i> LUH1740
AF509825.1	<i>A. tjernbergiae</i> 7N16	AJ626712.1	<i>A. beijerinckii</i> LUH4759
AF509826.1	<i>A. tjernbergiae</i> 7B02	AJ303013.1	<i>A. beijerinckii</i> DVL00.87
GU388381.1	<i>A. tandoii</i> DSM14970	AJ295007.1	<i>A. venetianus</i> ATCC31012
NR_028853.1	<i>A. tandoii</i> 4N13	FJ608110.1	<i>A. venetianus</i> L15
FJ907197.1	<i>A. baumannii</i> 14	EF204273.1	<i>A. lwoffii</i> D6
EU661706.1	<i>A. baumannii</i> NBRAJG89	DQ289068.1	<i>A. lwoffii</i> WST5
FJ860867.1	<i>A. baumannii</i> LUH8225	EF204280.1	<i>A. lwoffii</i> G26
GQ200824.1	<i>A. baumannii</i> KK14	GU083586.1	<i>A. lwoffii</i> UW7
FN563422.1	<i>A. baumannii</i> bpoe1351	FJ263924.1	<i>A. lwoffii</i> BA58
FN563420.1	<i>A. baumannii</i> bpoe1349	FN393792.1	<i>A. lwoffii</i> ES-306b
X81660.1	<i>A. baumannii</i> DMS30007	X81665.1	<i>A. lwoffii</i> DSM2403
AF509827.1	<i>A. bouvetii</i>	DQ112024.1	A5
NR_028851.1	<i>A. bouvetii</i> 4B02	AM882683.1	A12
AM410706.2	<i>A. grimontii</i> NIPH2283	AM711571.1	CH13
AF509828.1	<i>A. grimontii</i>		

CAPITULO III: Selectividad de metal de la superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*

Introducción

Las SODs son metaloproteínas que catalizan la desproporción del superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno.



Estas enzimas pueden clasificarse de acuerdo al cofactor metálico en dos grandes familias: las **SODs mononucleares** de tipo Fe/Mn (**FeSOD**, **MnSOD**) y las que contienen níquel en su sitio activo (**NiSOD**) (Youn y col., 1996) y un segundo grupo de **SODs binucleares con Cu/Zn**, siendo cobre el cofactor catalítico.

Las SODs de Fe o Mn constituyen un grupo con alta homología de secuencia, plegamientos similares e idéntica geometría del sitio activo (Parker & Blake, 1988; Jackson & Cooper, 1998; Whittaker, 2002). Desde un punto de vista funcional, pueden diferenciarse en tres clases: las FeSODs, sólo activas con Fe; las MnSODs, sólo activas con Mn; y las **Fe/MnSODs cambialísticas**, que presentan actividad tanto con Fe como con Mn (Tabares y col., 2003; Liao y col., 2007). Observaciones cristalográficas han mostrado que la esfera de coordinación del metal en las FeSODs y las MnSODs es idéntica, bipiramidal trigonal con tres residuos de histidina, un aspartato y una molécula de solvente como ligandos (Jackson & Cooper, 1998). Además, se ha observado que existe una competencia *in vivo* entre Fe y Mn por la unión a la apoproteína de la MnSOD de *Escherichia coli*, pero no por la unión a la apoproteína de la FeSOD (Beyer & Fridovich, 1991). A pesar de las similitudes, la sustitución por Mn en las FeSODs o por Fe en la MnSODs lleva a la pérdida de la actividad catalítica (Ose & Fridovich, 1976).

Rhodobacter capsulatus es una α -proteobacteria con amplia versatilidad metabólica, capaz de crecer en condiciones anaeróbicas realizando fotosíntesis y en condiciones aeróbicas reduciendo oxígeno en la respiración. Previamente a la realización de esta tesis, en nuestro grupo de investigación se clonó y caracterizó la única superóxido dismutasa presente en este organismo (Cortez y col., 1998).

El gen *sod* de *R. capsulatus* se expresa a niveles bajos en bacterias crecidas en condiciones de anaerobiosis o semiaerobiosis, y su expresión es inducida fuertemente al exponer los cultivos a alta oxigenación o a propagadores de superóxido (Cortez y col., 1998). El análisis de homología de secuencias y la selectividad de inhibidores sugirió inicialmente que la SOD de *R. capsulatus* (*RcSOD*) era una enzima dependiente de Fe (Cortez y col., 1998). Sin embargo, la purificación y la determinación del contenido metálico en la enzima nativa pusieron en evidencia la naturaleza cambialística de *RcSOD* (Tabares y col., 2003). Se determinó, además, que la dismutasa purificada de cultivos aeróbicos contiene 95% de Mn, mientras que la proveniente de cultivos crecidos en condiciones fotosintéticas incluye 60% de Mn y 40% de Fe.

Cuando se realizaron medidas de actividad en función de pH en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (Tabares y col., 2003) y por *Pulse Radiolysis* (Tabares y Cortez, comunicación personal) de la enzima recombinante plegada con Mn o con Fe, se visualizó un aumento de la actividad con la disminución del pH, muy marcado en la Fe-*RcSOD* (Figuras 2 y 3). Mediante espectroscopía de Infrarrojo observamos que la deprotonación de un residuo de tirosina en la posición 34 sería responsable de la relación (metal dependiente) visualizada entre la actividad y el pH (Cortez N., comunicación personal).

Si bien aún no se han obtenido estructuras cristalográficas de la *RcSOD*, se realizó un modelado tridimensional (Figura 4) utilizando como molde la SOD de *Pseudomonas ovalis* (Bond y col., 2000) que por comparación de secuencias mostró alta homología.

La selectividad de metal de la RcSOD se manifiesta de dos maneras:

- La **actividad específica**, es mayor en su forma Mn que en su forma Fe y se ve afectada diferencialmente con el pH.
- La **captura del metal**, *in vivo* la enzima une mayoritariamente Mn, aunque el contenido metálico total es modulado por las condiciones de cultivo (disponibilidad de oxígeno).

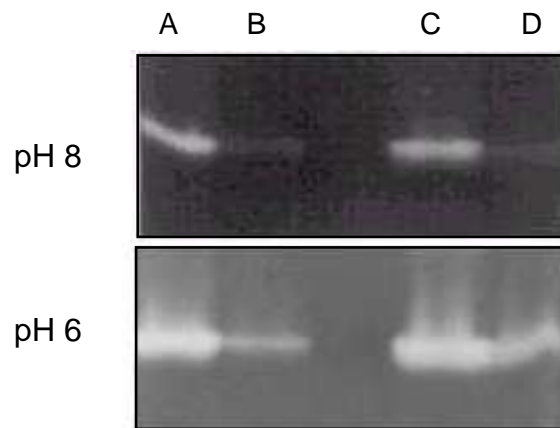


Figura 2: Actividad SOD en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes a pH 8 y pH 6.

La tinción de actividad corresponde a RcSOD nativa purificada a partir de extractos solubles de *R. capsulatus* 37b4 cultivada en condiciones aeróbicas (A) y fotosintéticas (B); y RcSOD recombinante plegada en presencia de Mn (C) o Fe (D).

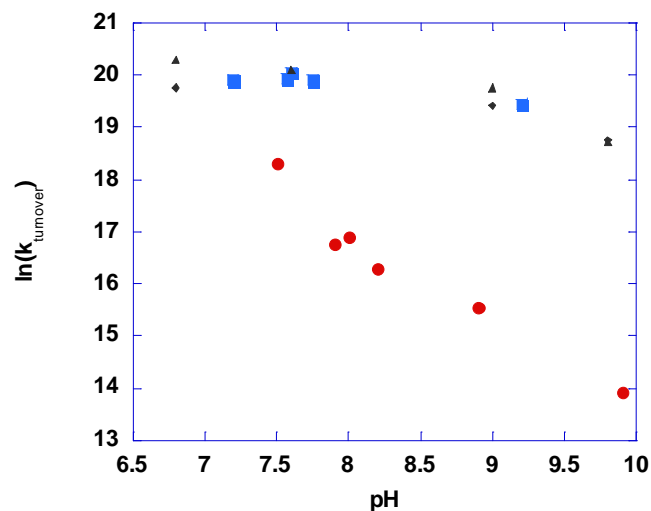


Figura 3: Curvas de actividad SOD versus pH.

La actividad SOD fue determinada por *Pulse radiolysis*. La proteína RcSOD recombinante fue purificada y replegada *in vitro* en presencia de Mn (azul) o Fe (rojo).

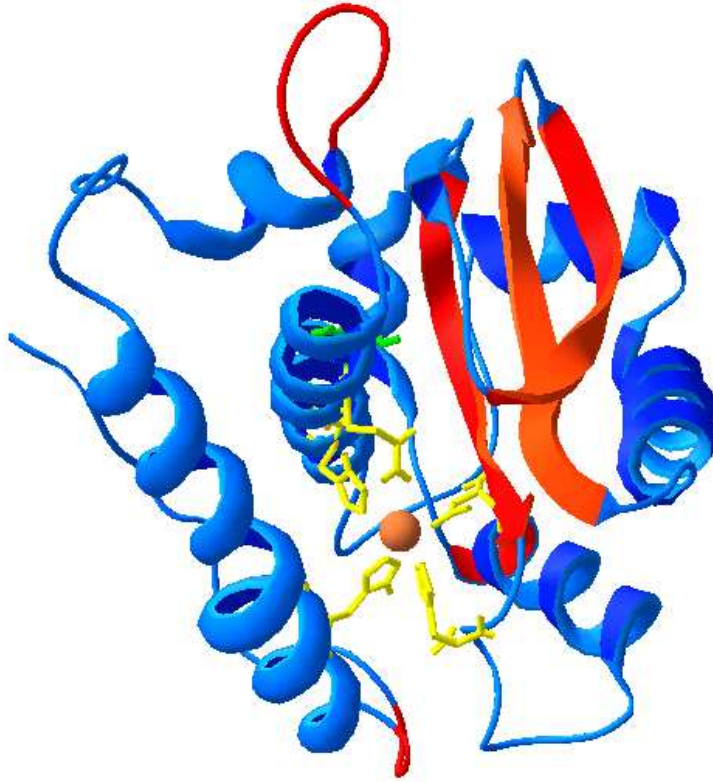


Figura 4: Modelado de la estructura tridimensional de la RcSOD basada en la estructura cristalográfica de *Pseudomonas ovalis* (Bond y col., 2000)

Con el fin de identificar elementos diferenciales de la especificidad de metal de las SODs de Fe, Mn y cambialísticas, se realizó un análisis de comparación de secuencias utilizando el programa *ClustalX* para obtener los apilamientos. Las secuencias homólogas fueron seleccionadas mediante el programa *BLAST* del *NCBI*. A través de estos procedimientos se identificaron regiones o residuos diferenciales que podrían estar involucrados en la discriminación del cofactor metálico (Tabares, 2006). Estos son:

- a) **Cisteína 63.** Hemos observado que los reductores de grupos sulfhidrilos facilitan el proceso de renaturalización y ensamble de *RcSOD* a partir de

apoproteína y metal, sugiriendo una función de las cisteínas durante el plegado.

- b) Un **segmento de 7 aminoácidos** correspondiente a un bucle entre las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ presente en la mayoría de las MnSOD, que también se encuentra en RcSOD (T61-V67), pero no en las FeSOD.
- c) Residuos diferenciales en la hélice $\alpha 2$, la cual contiene a la glutamina 78 que coordina a la molécula de solvente del sitio activo y al ligando ecuatorial H82. Dichos residuos son **F73**, conservada en FeSODs y reemplazada por arginina en la mayoría de las MnSODs, y **S77**, sólo presente en RcSOD y en la MnSOD de *Halobacterium*. En las FeSODs esta posición está ocupada por alanina, mientras que en MnSODs por glicinas.
- d) **Alanina 160**. Localizada en la región $\alpha 2$ -bucle- $\alpha 3$ que contiene a los ligandos ecuatoriales D165 y H169. La presencia de alanina en esta posición es excepcional, ya que esta es la zona más conservada entre las SODs, que poseen usualmente prolina como residuo 160.

Las mutantes puntuales C63S, F73A, S77A y A160P fueron construidas utilizando la técnica del *Megaprimer* (Sarkar & Sommer, 1990). Para la construcción de la mutante de delección del loop T61-V67 (mutantes DEL), se diseñaron dos cebadores internos cada uno de los cuales introduce un sitio BamHI, luego utilizados con cebadores flanqueantes para obtener dos fragmentos que, tras la digestión con BamHI y ligación, regeneran una RcSOD completa a la cual se le eliminaron 21 nucleótidos correspondientes a los 7 aminoácidos del bucle. Los fragmentos conteniendo las RcSODs modificadas fueron finalmente clonados en el vector pET3228 para su expresión inducible por IPTG en *E. coli* QC774 DE3 *sodA sodB* según se ha descrito (Tabares y col., 2003).

Desde el descubrimiento y caracterización de las SODs de tipo Fe-Mn, la selectividad de metal de estas enzimas ha sido motivo de estudio. Considerando la alta homología de secuencia, plegamientos similares e

idéntica geometría del sitio activo (Jackson & Cooper, 1998) resulta sorprendente que estas proteínas sean capaces de tomar diferencialmente el metal que les aportará actividad catalítica. Frente a este interrogante nos propusimos como objetivo principal de este capítulo de la tesis la identificación de las determinantes funcionales de la selectividad de metal de la superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*.

Resultados

Expresión soluble de RcSOD recombinante

Hemos descrito que el contenido metálico de la RcSOD depende de las condiciones de cultivo, en particular de la disponibilidad de oxígeno (tensión). Según Ringeling y colaboradores las células de *R. capsulatus* poseen mayor porcentaje de Fe libre (no unido a proteínas) en condiciones fotosintéticas que en aerobiosis (Ringeling y col., 1994). Esta observación nos sugiere que el aumento en la proporción de Fe en la RcSOD fotosintética se relacionaría con la mayor disponibilidad de Fe soluble en anaerobiosis.

Para comenzar a estudiar los determinantes funcionales y estructurales de la selectividad de metal de la RcSOD, nos propusimos optimizar un protocolo que permita la expresión de la proteína recombinante en la fracción soluble de los extractos de *E. coli*. Hasta el momento, se utilizaba como metodología de aislamiento de la RcSOD, la expresión de la proteína en forma insoluble en cuerpos de inclusión, disolución de los mismos en urea 8M y posterior plegado en presencia de metal y purificación en columnas de intercambio iónico (Tabares y col., 2003). Este protocolo permite la obtención de las formas apoproteína, Mn y Fe de la RcSOD siendo sumamente útil para los ensayos *in vitro* realizados anteriormente (Tabares y col., 2003) y los descriptos más adelante en esta tesis.

Se ensayaron diferentes condiciones de expresión de la RcSOD tratando de optimizar la recuperación de la proteína en la fracción soluble para su posterior tratamiento de purificación. En un primer ensayo se disminuyó la temperatura de 37°C a 30°C y la concentración del inductor IPTG de 0.5 mM a 0.01 mM (Figura 5) mejorándose la relación entre las fracciones soluble e insoluble. Se probaron las mismas condiciones para las mutantes construidas (Figura 6, A) observándose que la mutante C63S se distribuía de manera similar a la proteína salvaje, mientras que la S77A se obtenía en la fracción soluble en una proporción mayor a la proteína salvaje. La expresión soluble de la mutante

A160P fue significativamente menor a la de la proteína salvaje. Por último, no se obtuvieron cantidades detectables de proteína recombinante en fracción soluble para las mutantes Del T61-V67 o la F73R. El gel de actividad superóxido dismutasa (Figura 6, B) muestra que las actividades de los extractos solubles son directamente proporcionales a la cantidad de proteína SOD en esa fracción.

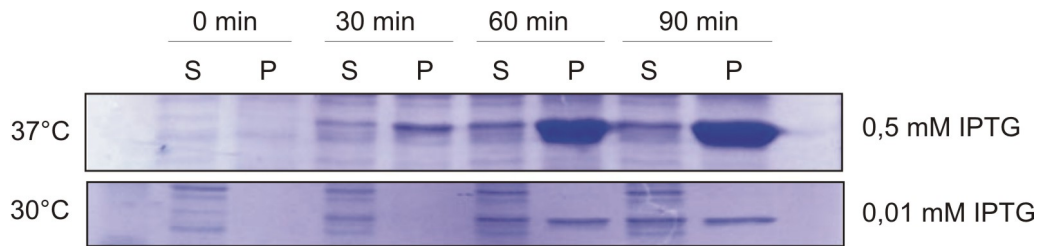


Figura 5: Inducción de la expresión de RcSOD salvaje a 37°C con 0.5 mM de IPTG y a 30°C con 0.01 mM IPTG. Se sembraron los extractos solubles (S) y los pellet (P) de las alícuotas tomadas a tiempos 0, 30 min, 60 min y 90 min post-inducción.

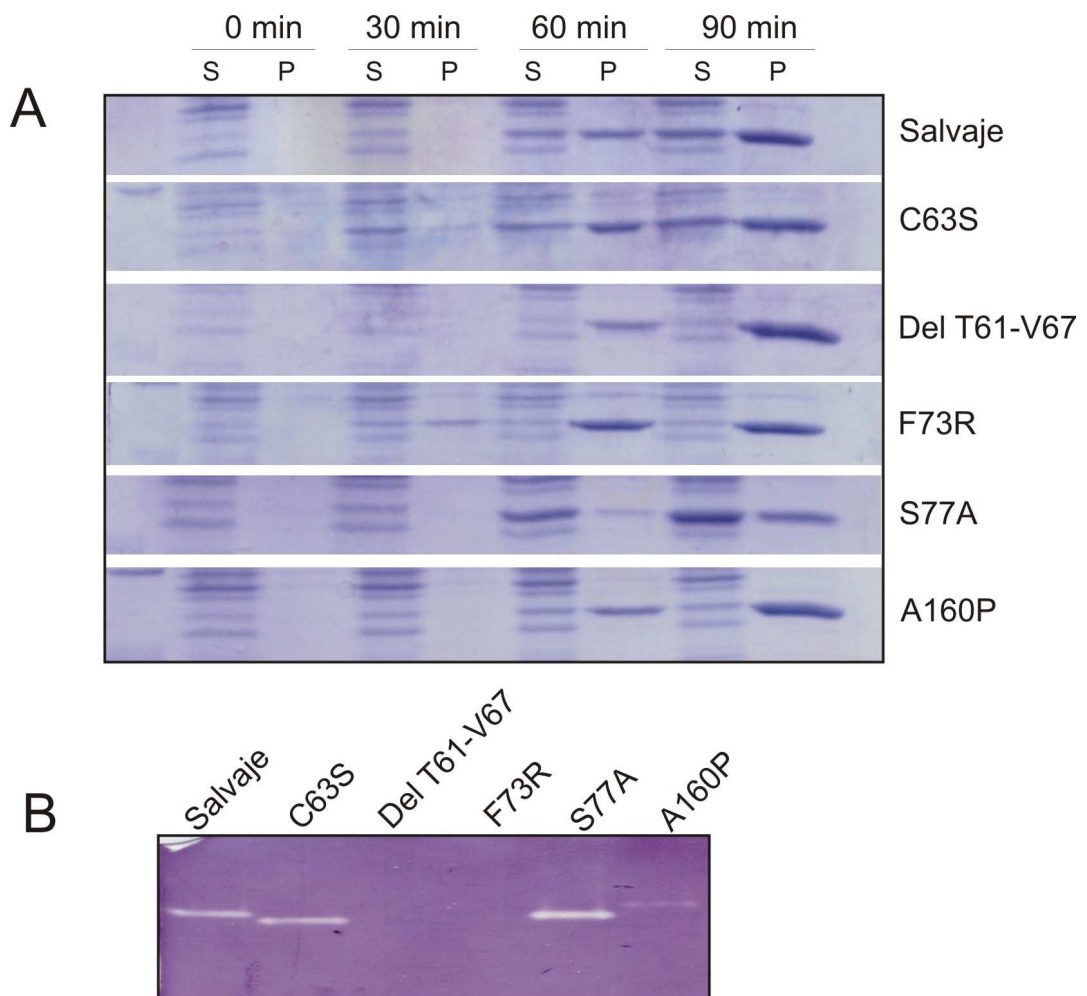


Figura 6: Inducción de la expresión de RcSOD salvaje y mutantes a 30°C con 0.01 mM de IPTG (panel A). Se sembraron los extractos solubles (S) y los pellet (P) de las alícuotas tomadas a tiempo 0, 30 min, 60 min y 90 min post-inducción. Actividad SOD en gel de poliacrilamida de los extractos solubles (panel B).

Luego de numerosos ensayos, se logró revertir la relación inicial soluble/insoluble de la proteína salvaje cuando se indujo la expresión a 20°C con 0.1 mM de IPTG durante 12-15hs (Figura 7). A pesar de que estas condiciones mejoraron radicalmente la expresión de la proteína salvaje, las mutantes Del T61-V67 y la F73R no mostraron expresión soluble detectable bajo ninguna de las condiciones ensayadas.

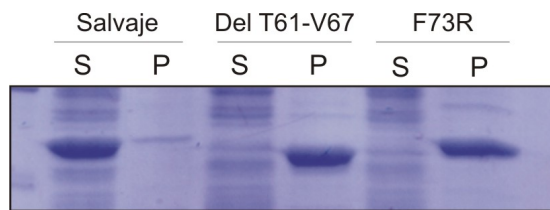


Figura 7: Extractos solubles (S) y pellet (P) de inducción de la expresión de la proteína salvaje y las mutantes Del T61-V67 y F73R a 20°C con 0.1mM de IPTG durante 12-15hs

Captura de metal *in vivo*

Utilizando el protocolo optimizado de expresión soluble de *RcSOD* se realizaron repiques sucesivos en medio mínimo M9 con el objetivo de disminuir la concentración de metal intracelular para luego inducir la expresión en presencia de 2 mM de FeSO_4 . Como se observa en la Figura 8, se produce un aumento de actividad en la *RcSOD* salvaje y en las mutantes C63S y S77A al disminuir el pH de la solución tampón de medida de actividad SOD, sugiriendo que estas proteínas habrían incorporado Fe durante su síntesis, respondiendo al aumento del metal en el medio de cultivo. Sin embargo, la mutante A160P no mostró esta diferencia de actividad (Figura 8), indicando que no habría incorporado Fe en las mismas condiciones de cultivo.

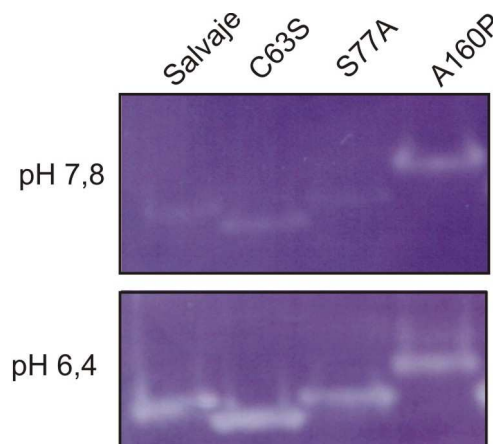


Figura 8: Actividad SOD a pH 7.8 y 6.4 en geles de poliacrilamida de los extractos solubles de las inducciones de la expresión de *RcSOD* salvaje y mutantes.

Debido a que la bacteria huésped *E. coli* QC774 (DE3) *sodA sodB* utilizada para la expresión recombinante de *RcSOD* posee múltiples auxotrofías (Carlioz & Touati, 1986), la velocidad de crecimiento en medio mínimo M9 es muy lenta. Además, la alta concentración de FeSO_4 usada (2 mM), podría perjudicar el crecimiento, ya que añade un factor adicional de estrés oxidativo (Touati, 2000). Teniendo en cuenta estos dos aspectos, en el siguiente experimento se modificó el medio de cultivo y la concentración de metal utilizada.

Se crecieron cultivos de *E. coli* QC774 (DE3) *sodA sodB* [pES3228] en medio mínimo M9 suplementado con 10% de LB tratado con *Chelex 100* (*Sigma*) para complejar los metales divalentes. Al alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8 se indujo la expresión de *RcSOD* por el agregado de 0,1mM IPTG en presencia de 20 μM de FeSO_4 o 20 μM de MnSO_4 . Luego de incubación por 12-15 horas a 20°C los cultivos fueron cosechados por centrifugación a 4200g por 15 minutos. Los sedimentos celulares fueron congelados con N_2 líquido y conservados a -70°C hasta su procesamiento.

Los sedimentos celulares correspondientes a alícuotas de 100 ml de cultivos fueron lavados por resuspensión sucesiva y centrifugación en una solución tampón (Tris-HCl 20 mM pH 8, glicerol 10%, EDTA 0,5mM, NaCl 100 mM, 2-mercapto etanol 14 mM, PMSF 0,1mM). Fracciones de 5ml de células se trataron con 30% de ácido nítrico y calor por 6 horas para su mineralización llevándose luego a un volumen final de 10 ml en matraz aforado. Esta suspensión mineralizada se utilizó para las medidas de contenido metálico en células.

Para la purificación de las *RcSODs* recombinantes se resuspendieron los sedimentos celulares descongelados en la solución tampón antes descrita y se lisaron por sonicación según protocolo establecido (ver *Materiales y métodos*). Las *RcSODs* fueron aisladas del sedimento obtenido por precipitación entre 70 y 90% de saturación con sulfato de amonio. Luego de resuspensión y diálisis (Tris-HCl 20 mM pH8, EDTA 1mM, DTT 5 mM, glicerol

10%) se realizó una cromatografía de intercambio aniónico (*Mono Q*) en el sistema de *FPLC Akta (General Electric)* eluyendo con un gradiente de NaCl (0-500mM). Finalmente, las proteínas purificadas fueron dializadas (Tris-HCl 20 mM pH 8) y guardadas a -70°C hasta su utilización.

Como se observa en la Tabla 4, la eliminación del Fe del medio de cultivo fue incompleta a pesar el tratamiento con *Chelex 100*. Si bien no se determinaron niveles intracelulares apreciables de Fe en células crecidas en medio libre de metal, se detectaron 1,19 $\mu\text{mol/l}$ de Fe en células de cultivos suplementados con Mn. El agregado de alguno de los dos metales al medio de cultivo provocó incrementos diferenciales en los niveles intracelulares de los mismos. La adición de 20 μM de Mn al medio de cultivo provocó un nivel intracelular del 10% de la cantidad agregada, en cambio la suplementación con Fe se tradujo en un contenido cercano al 20% de lo añadido al medio.

Las variaciones observadas en el contenido metálico de la *RcSOD* se correlacionaron directamente con el agregado de metal al medio de cultivo (Tabla 4). Se observó además que solo un tercio de la proteína purificada a partir de cultivos suplementados tanto con Fe como con Mn presentó niveles detectables de metal. Creemos que esto se debe a que, durante la sobreexpresión de la *RcSOD* recombinante, la metalación sería ineficiente.

Nuestros resultados sugieren que la *RcSOD* incorpora su cofactor de acuerdo a la disponibilidad del mismo en el medio de cultivo, siendo este aspecto un determinante de la selectividad de metal de esta proteína.

Tabla 4: Determinación del contenido metálico de medio de cultivo, células y proteínas purificadas.

	DO	Contenido Mn			Contenido Fe		
		Medio umoles/l cult	Células umoles/l cult	RcSOD eq/mol prot	Medio umoles/l cult	Células umoles/l cult	RcSOD eq/mol prot
Medio sin metal	0,98	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$	—	1,79	$\leq 1,0$	—
Medio + Mn	1,89	20	2,22	0,36	1,79	1,19	0,04
Medio + Fe	1,93	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$	0,03	20	3,72	0,27
Blanco	—	$\leq 0,43$	$\leq 0,43$	—	$\leq 1,0$	$\leq 1,0$	—

Blanco de mineralización: solución tampón de resuspensión celular tratada con procedimiento de mineralización al igual que suspensiones celulares.

Captura de metal *in vitro*

Mediante los ensayos de captura de metal *in vivo*, observamos que existe una correlación entre la disponibilidad de metal y el contenido metálico de la RcSOD. Teniendo en cuenta los antecedentes encontrados en la bibliografía sobre la MnSOD de *E. coli* (Whittaker, 2010), realizamos ensayos de captura de metal *in vitro* a fin de evaluar el efecto de la temperatura, de la concentración de metal y del pH sobre la captura de metal de la RcSOD.

- **Dependencia de la temperatura**

La Apo-RcSOD carece de actividad enzimática, para lograr su activación debe ser tratada, en primer lugar, con un agente caotrópico (urea o cloruro de guanidinio) para luego ser diluida y replegada en presencia de metal. Teniendo en cuenta trabajos previos en la MnSOD de *E. coli* (Mizuno y col., 2004) y en la MnSOD de *Thermus thermophilus* (Whittaker & Whittaker, 1999) se ensayó la captura de metal térmicamente inducida de la Apo-RcSOD.

Se incubaron en un termociclador 0,05-0,1 mM de la apoproteína con 2 mM de metal en 50 µl solución tampón 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 8 y 3 mM 2-mercapto etanol.

Como se muestra en la Figura 9, se determinó la actividad SOD en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, se midió la intensidad de cada banda para compararlas utilizando el programa *GelPro* y se graficó actividad relativa en función de la temperatura (Figura 10). Del análisis de las curvas se deduce que la captura de metal es inducida al aumentar la temperatura.

Como se observa en la Figura 10, al aumentar la temperatura hay un incremento en la incorporación de metal. Esto sugiere que la apoproteína al calentarse pasa a un estado energizado en el cual logra tomar metal.

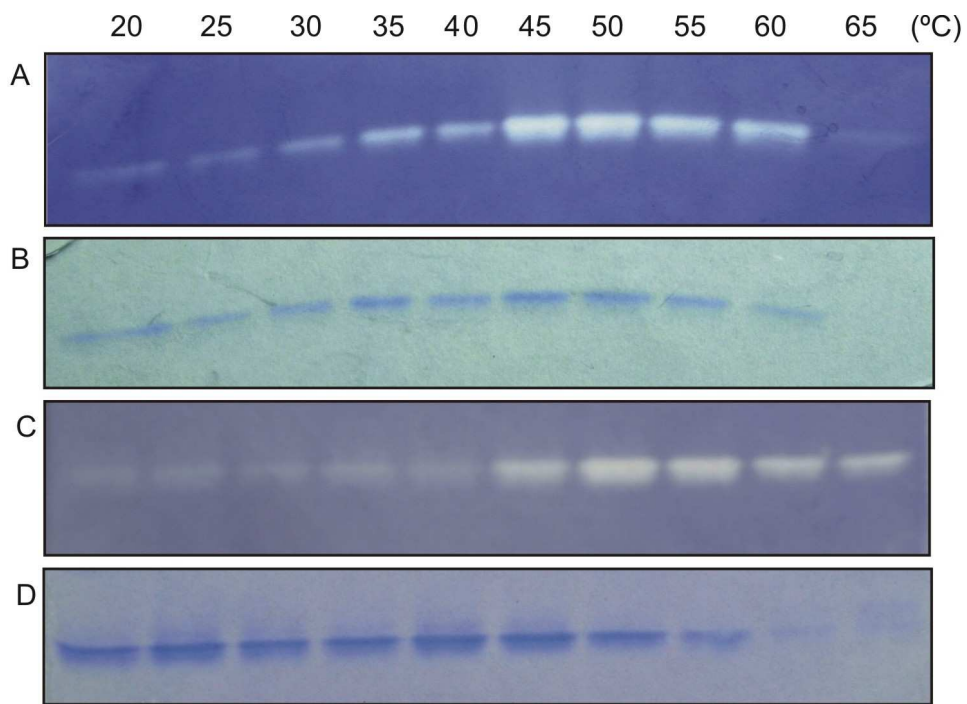


Figura 9: Geles de poliacrilamida no desnaturalizantes revelados para actividad SOD (paneles A y C) y teñidos con coomasie blue (paneles B y D). Las tinciones de actividad y proteína corresponden a las *RcSODs* incubadas a diferentes temperaturas en el rango de 20-65°C con $MnSO_4$ (paneles A y B) y $FeSO_4$ (paneles C y D).

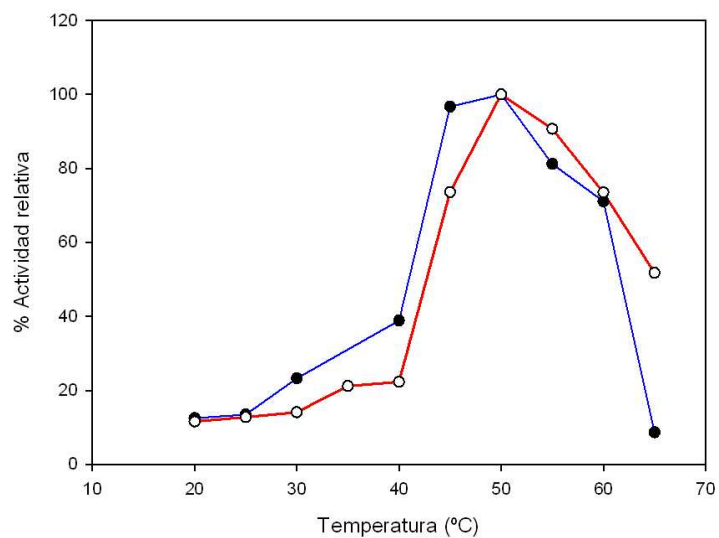


Figura 10: Curvas de actividad relativa en función de la temperatura. Los valores de actividad estimados a partir del gel nativo de actividad SOD (Figura 8) se graficaron en función de la temperatura de incubación de la *RcSOD* con $MnSO_4$ (azul) o con $FeSO_4$ (rojo).

- **Dependencia de la concentración de metal**

Para evaluar el efecto de la concentración de metal se incubó la apoproteína en presencia de cantidades variables de FeSO_4 o MnSO_4 a 30°C y 45°C utilizando el protocolo establecido (Figuras 11 y 12).

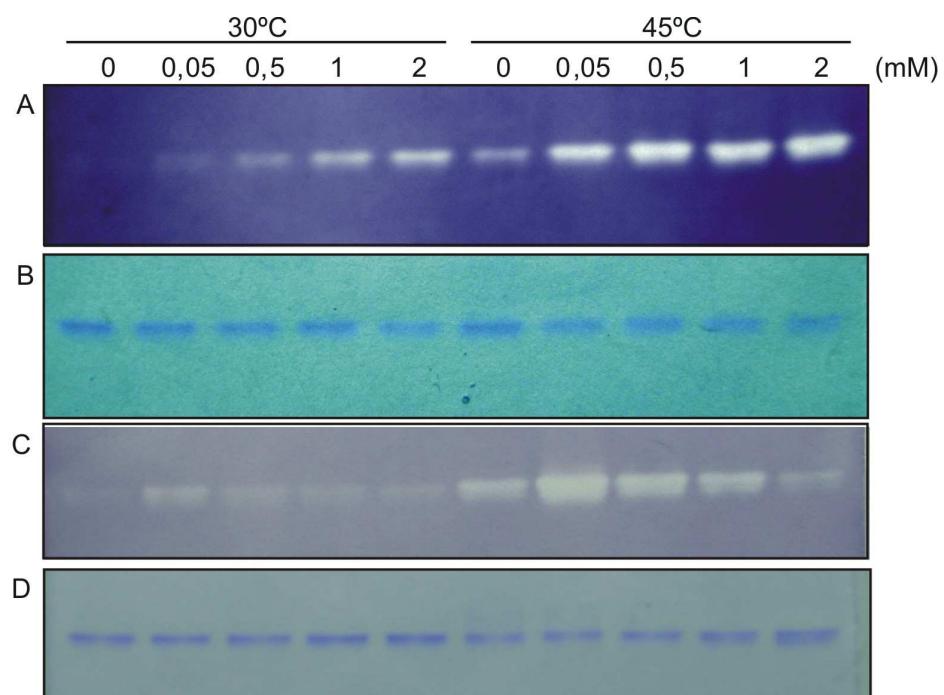


Figura 11: Geles de poliacrilamida no desnaturizantes revelados para actividad SOD (paneles A y C) y teñidos con Coomassie blue (paneles B y D). Las tinciones de actividad y proteína corresponden a 0,05 mM de apo-RcSOD incubada durante 5 minutos a 30°C y 45°C con Mn (paneles A y B) o Fe (paneles C y D) a las concentraciones indicadas.

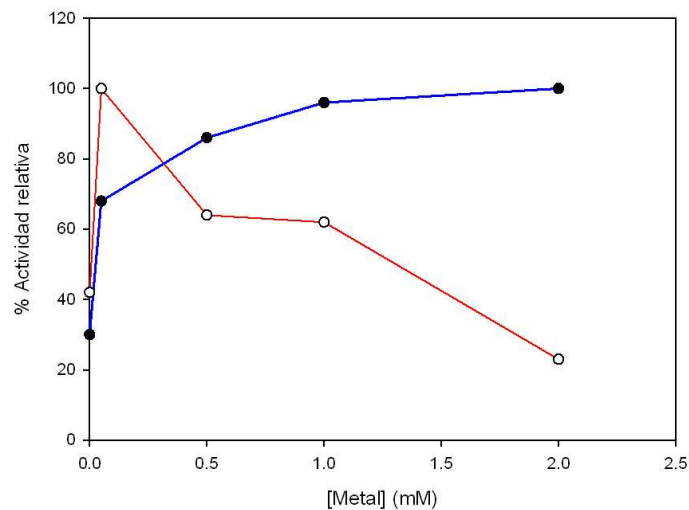


Figura 12: Curvas de actividad en función de la concentración de metal.

Los valores de actividad estimados a partir del gel nativo de actividad SOD (Figura 10) se graficaron en función de la concentración de metal usada para los ensayos de captura de la apo-RcSOD en presencia de MnSO_4 (azul) o de FeSO_4 (rojo) realizados a 45°C .

observó un aumento de la actividad de comportamiento hiperbólico con saturación. En cambio, al agregar concentraciones de Fe superiores a 0.05 mM (equimolar con la proteína) al medio de reacción se observó una inactivación, probablemente debido a la presencia de Fe(III). A pesar de que se agregó sulfato ferroso al medio de reacción, al entrar en contacto con el oxígeno en la solución acuosa alcalina, una fracción se oxidaría rápidamente a Fe(III). En este estado de oxidación el Fe no se uniría al sitio activo de la SOD (Pugh & Fridovich, 1985) y además podría estar interaccionando inespecíficamente con la proteína provocando la inactivación de la misma.

Los resultados observados a ambas temperaturas fueron comparables, aunque a 30°C la actividad fue apenas detectable ya que a esa temperatura la inducción de la captura de metal es baja. La incubación de la apoproteína a 45°C indujo la captura de metal permitiendo detectar bandas de actividad aún sin agregado externo de metal (0 mM de metal). Las trazas de metal en la solución tampón serían suficientes para permitir la activación térmica a 45°C .

- **Dependencia de pH**

A continuación se evaluó la dependencia del pH del medio de reacción en la captura de Mn, utilizando el mismo protocolo descrito para estudiar el efecto de la temperatura y de la concentración de metal. Se realizaron geles de poliacrilamida no desnaturizantes y se revelaron para actividad SOD *in situ* (no mostrado). Los porcentajes de actividad relativa se estimaron, al igual que en los ensayos anteriores utilizando el programa *GelPro* y se graficaron en función del pH del medio de reacción (Figura 13). Para corroborar que el efecto observado se debía exclusivamente al pH se realizó el ensayo de captura solapando los rangos de pHs cubiertos por cada tampón. Con el mismo fin, se

utilizó la mezcla de tampones TAM (Tris-HCl, Acetato de sodio y MES) que abarcó el rango completo de pH (Figura 14).

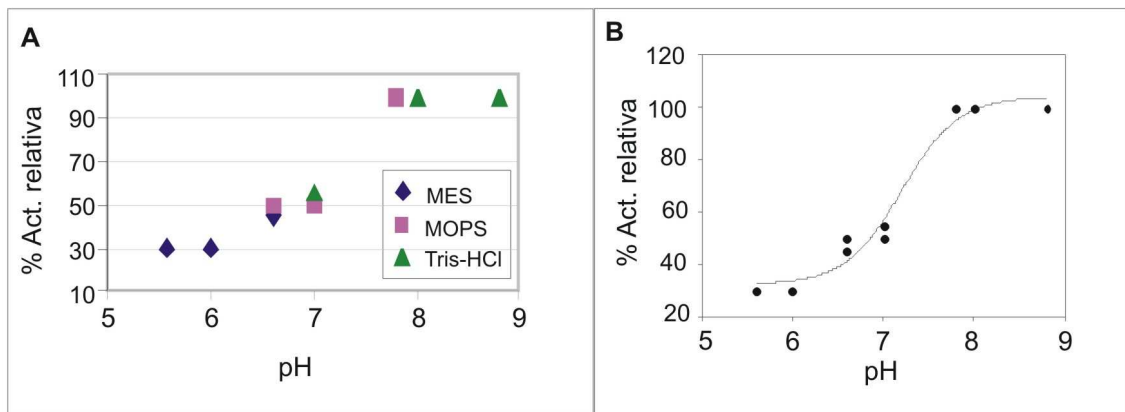


Figura 13: Curvas de actividad relativa en función del pH, tampones MES, MOPS y Tris-HCl
El ensayo de captura de metal *in vitro* se realizó con tres medio de reacción utilizando solución tampón 20mM de MES, MOPS y Tris-HCl (panel A). En el panel B se observa el ajuste de los datos a una sigmoidea cuyo punto de inflexión es $pka = 7,21$

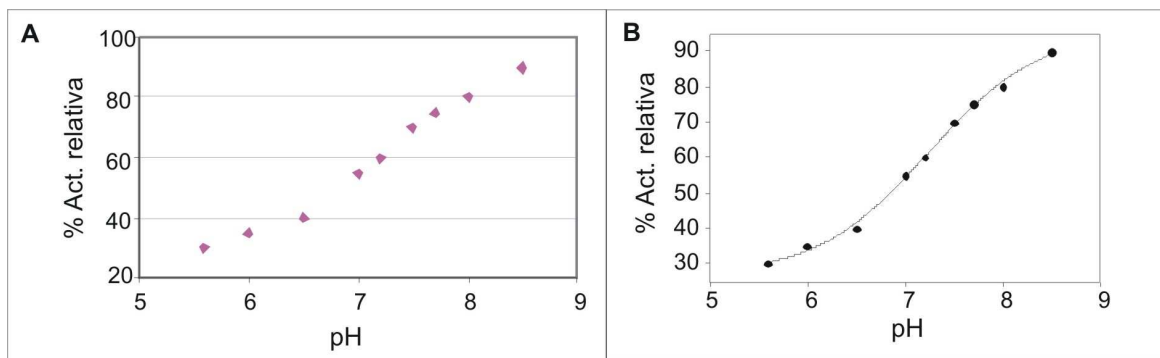


Figura 14: Curvas de actividad relativa en función del pH, mezcla de tampones TAM
Para corroborar que el efecto observado fuera exclusivamente debido al pH del medio de reacción se ensayó la dependencia del pH en la captura de metal usando una mezcla de tampones 20mM TAM (Tris-HCl, Acetato de sodio y MES) que se muestra en el panel A. Se realizó el ajuste de los datos a una sigmoidea cuyo punto de inflexión es $pka = 7,23$ (panel B)

En los dos ensayos se observaron resultados similares, la captura de Mn aumenta al incrementar el pH y este efecto depende exclusivamente del pH del

tampón. Las curvas se ajustaron a una sigmoidea obteniéndose valores de pka con un promedio de 7,2 sugiriendo que la deprotonación de un residuo favorecería la incorporación de metal.

Estabilidad térmica de Mn-RcSOD y Fe-RcSOD, relación con el estado redox del metal

Se realizaron espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las tres formas Apo-RcSOD, Mn-RcSOD y Fe-RcSOD, sin detectarse diferencias significativas entre las curvas, esto indicaría un plegamiento de estructura secundaria similar para las tres formas de la enzima (Figura 15).

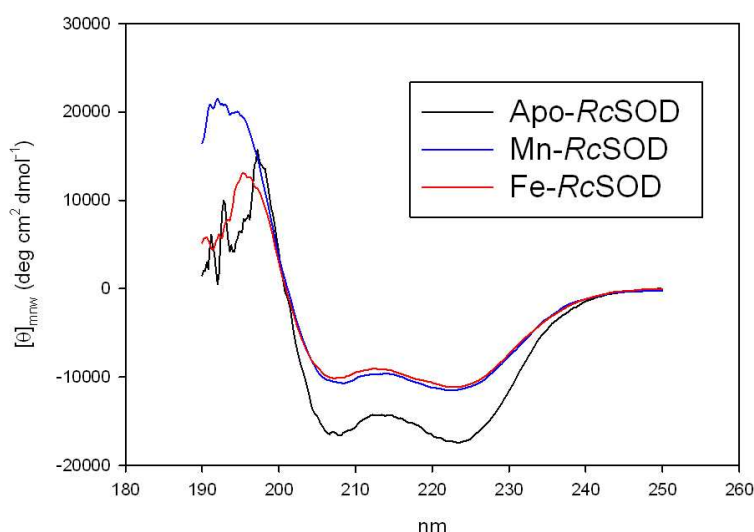


Figura 15: Espectros de dicroísmo circular de Apo-RcSOD, Mn-RcSOD y Fe-RcSOD. Las proteínas se diluyeron en solución tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 8 y 2-mercapto etanol 3 mM, hasta una concentración final de 0,3 – 0,5 mg/ml y se registraron los espectros en el UV lejano (190 – 250 nm).

Para comparar la estabilidad de las formas apo y metaladas de la proteína, se realizaron curvas de desnaturalización térmica que se muestran en la Figura 15.

Las proteínas fueron diluidas (0,3 – 0,5 mg/ml) en la solución tampón descrita y sometidas a un incremento de temperatura de 1°C p or minuto entre 25 y 95°C registrándose los valores de elipticidad (θ) a 223 nm (Figura 16).

Para permitir una mejor visualización de los puntos de inflexión de las curvas correspondientes a las temperaturas medias (T_m) de la transición plegado-desplegado (Tabla 5), se graficó la primer derivada de los valores de elipticidad observados en función de la temperatura (Figura 17).

Como control de la influencia del agregado de ditionito de sodio o de permanganato de potasio sobre las curvas, se realizó el procedimiento de reducción y oxidación sobre la apoproteína obteniéndose curvas y T_m similares en los dos casos (no mostrado). El agregado de estos reactivos químicos no modifica de manera detectable por este método, la estructura de la proteína.

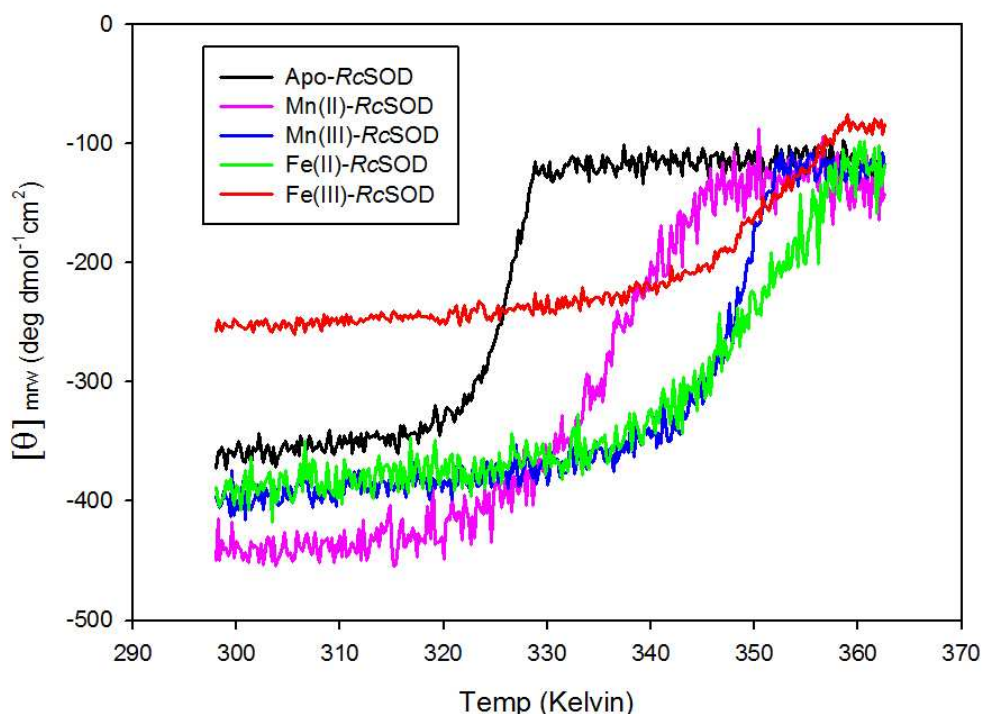


Figura 16: Curvas de desnaturalización térmica de la Apo-RcSOD y sus formas metaladas. Para los estudios de estabilidad térmica las proteínas diluidas (0,3 – 0,5 mg/ml) en la solución tampón descrita fueron sometidas a un incremento de temperatura de 1°C por minuto entre 25 y 95°C registrándose los valores de elipticidad a 223 nm. El efecto del estado redox del metal se evaluó incubando las proteínas con un exceso 2 molar de ditionito de sodio para obtener las formas reducidas y con cantidades equimolares de permanganato de potasio para conseguir las formas oxidadas. En la figura se muestran las curvas correspondientes a Apo-RcSOD (negro), Mn(II)-RcSOD (fucsia), Mn(III)-RcSOD (azul), Fe(II)-RcSOD (verde) y Fe(III)-RcSOD (rojo).

Tabla 5: Temperaturas medias de la transición plegado-desplegado

	T_m (°C)
Apo-RcSOD	52,9
Mn(II)-RcSOD	63,1
Mn(III)-RcSOD	74,8
Fe(II)-RcSOD	76,3
Fe(III)-RcSOD	77,9

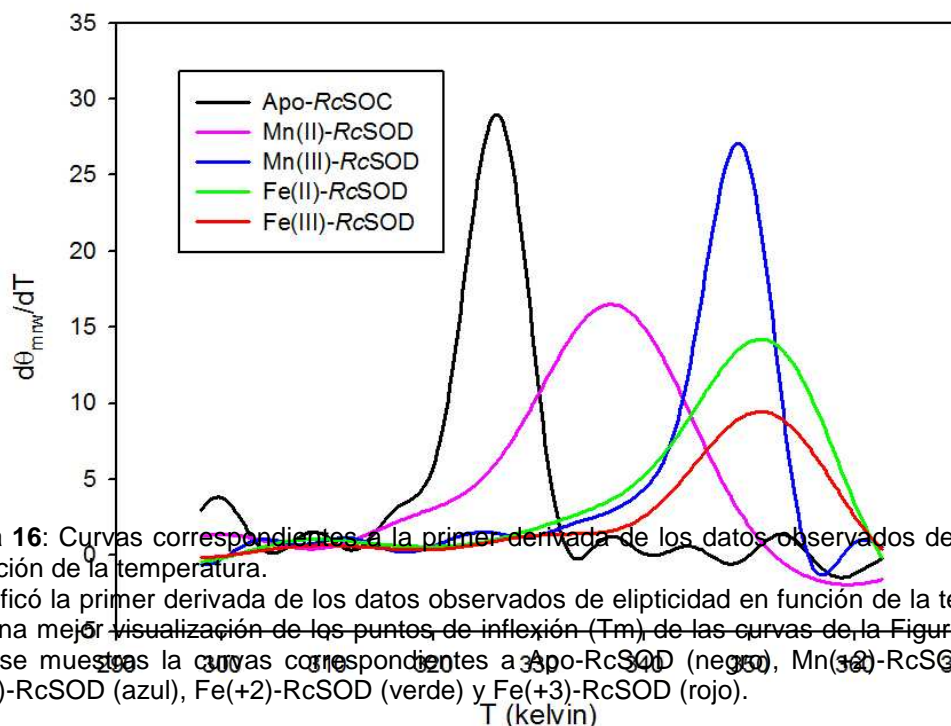


Figura 16: Curvas correspondientes a la primer derivada de los datos observados de elipticidad en función de la temperatura.

Se graficó la primer derivada de los datos observados de elipticidad en función de la temperatura para una mejor visualización de los puntos de inflexión (T_m) de las curvas de la Figura 15. En la figura se muestran las curvas correspondientes a Apo-RcSOD (negro), Mn(II)-RcSOD (fucsia), Mn(+3)-RcSOD (azul), Fe(+2)-RcSOD (verde) y Fe(+3)-RcSOD (rojo).

Figura 17: Derivada primera de las curvas de desnaturalización térmica de la Apo-RcSOD y sus formas metaladas.

En la figura se muestran las curvas correspondientes a Apo-RcSOD (negro), Mn(II)-RcSOD (fucsia), Mn(III)-RcSOD (azul), Fe(II)-RcSOD (verde) y Fe(III)-RcSOD (rojo).

Observando las curvas de las Figuras 16 y 17 vemos que la presencia de metal estabiliza la proteína ya que la forma apo-*RcSOD* es considerablemente menos estable que las formas metaladas. Además las formas oxidada y reducida de la FeSOD presentan mayor estabilidad que las de la MnSOD. Se observa también que hay un efecto del estado redox del metal en la Mn-*RcSOD*, siendo más estable la forma oxidada que la reducida. Este efecto es muy pequeño en la forma Fe ya que la diferencia observada en las T_m de las Fe(II)-*RcSOD* y Fe(III)-*RcSOD* es de 1,6 °C.

Discusión

La RcSOD es una superóxido dismutasa de tipo cambialística, es decir que presenta actividad tanto con Mn como con Fe, no obstante *in vivo* una mayoritariamente Mn y es más activa con este metal (Tabares y col., 2003).

Mediante los ensayos de captura de metal *in vivo* en *E. coli* observamos que existe una correlación entre el contenido metálico de la RcSOD recombinante y la disponibilidad de metal en el medio de cultivo. Considerando que en condiciones fotosintéticas se incrementa el porcentaje de Fe no unido a proteínas (Ringeling y col., 1994), nuestros resultados concuerdan con la detección de un aumento relativo del contenido de Fe en la RcSOD nativa proveniente de cultivos anaeróbicos respecto del detectado en células crecidas aeróbicamente (Tabares y col., 2003). La disponibilidad de Fe o Mn sería uno de los determinantes de la selectividad del metal incorporado en la holoenzima. No obstante, existen además otros factores que influyen sobre la captura de metal, como se comprobó en los experimentos de captura *in vitro* y de estabilidad térmica.

En este capítulo se realizaron ensayos para optimizar la expresión soluble de la RcSOD salvaje como proteína recombinante en *E. coli*. Induciendo con 0,01 mM de IPTG a 20°C durante 12-15hs se maximizó la concentración de SOD en la fracción soluble del extracto crudo. Estas mismas condiciones fueron ensayadas para las mutantes construidas, no obteniéndose expresión soluble detectable para las proteínas Del T61-V67 y F73R.

El ensayo que realizamos evaluando el efecto de las mutaciones construidas sobre la captura de metal *in vivo* reveló que la proteína A160P no incorporó Fe en su sitio activo en condiciones en las que la RcSOD salvaje y las demás mutantes si lo hicieron. La presencia de una alanina en la posición 160 es excepcional en la RcSOD ya que en la mayoría de las Fe/Mn SODs ese lugar está ocupado por una prolina. El residuo A160 podría estar involucrado en el carácter cambialístico de la RcSOD, participando en la selectividad y captura de metal durante la síntesis y plegamiento *in vivo*.

Recientemente, se ha determinado la estructura cristalográfica de la apoproteína de la MnSOD de *E. coli* (Whittaker y col., 2011), observándose que el sitio metálico está correctamente estructurado. Esto es, la conformación del sitio activo de SOD es adoptada en la apoproteína independientemente de la presencia de metal. Hemos estudiado el proceso de captura de metal *in vitro* de la RcSOD, obteniendo resultados similares a los observados previamente en la MnSOD de *E. coli* (Mizuno y col., 2004). Al incrementarse la temperatura se detecta un aumento de la incorporación de metal con un punto de inflexión alrededor de 42°C, indicando la necesidad de atravesar una “barrera energética” para que la apoproteína tome metal. Se ha sugerido que la apoSOD presentaría dos conformaciones: una “cerrada” y otra “abierta” capaz de incorporar metal al sitio activo (Whittaker y col., 2006). La apertura se lograría por el aumento de temperatura que permite el pasaje a un estado energético superior, siendo esta barrera energética un factor determinante en el proceso de captura de metal, si tenemos en cuenta que el sitio metálico se encuentra ya estructurado en la apoenzima.

Utilizando proteínas marcadas con sondas fluorescentes, Whitaker y colaboradores observaron que durante la activación térmica de la MnSOD de *E. coli* ocurre un intercambio dinámico de subunidades de la proteína dimérica (Whittaker y col., 2011). La separación de subunidades facilitaría la reorientación y exposición de los residuos del sitio activo permitiendo así la creación de un canal de entrada para el metal (Whittaker & Whittaker, 2008). La ruptura de las interacciones que mantienen la unión de los monómeros podría ser el proceso que provoque el comportamiento observado al variar la temperatura en la captura metálica en RcSOD como en la MnSOD de *E. coli*.

Al evaluar la influencia de la concentración de metal observamos un comportamiento de saturación en la curva de captura de Mn, indicando la unión del cofactor a un sitio específico saturable. A diferencia del comportamiento observado en los ensayos de captura de Mn por RcSOD, en la curva de incorporación de Fe se observa un efecto inhibitorio al aumentar la concentración de metal. Esto probablemente se deba a un aumento de la forma

Fe(III) en el medio de reacción que es la más insoluble e incapaz de incorporarse a la apoenzima, según se ha descrito para otras isoenzimas (Pugh & Fridovich, 1985).

El estudio de la dependencia del pH en la captura *in vitro* de Mn mostró curvas que ajustaron a una sigmoidea y con un pKa promedio de $7,22 \pm 0,01$ sugiriendo la probable participación de uno o más residuos de histidina en el proceso de captura. La RcSOD contiene en su secuencia 8 histidinas, tres de las cuales forman parte del sitio activo. A pesar de que con los resultados aquí expuestos no es posible deducir cuál sería el residuo de histidina implicado en la captura de metal, es posible pensar que sea una o más de las histidinas que coordinan el metal en la proteína madura, las que también participen en el proceso de incorporación de metal.

En nuestro laboratorio continuamos trabajando para optimizar protocolos y condiciones que permitan visualizar de manera más precisa la dependencia del pH y de la concentración de metal en el proceso de captura de Fe, teniendo en cuenta la tendencia del catión a oxidarse al aire y su consecuente insolubilización.

Las curvas de desnaturalización térmica mostraron que la presencia de metal en el sitio activo estabiliza la proteína, indicando que la incorporación del cofactor está termodinámicamente favorecida. Las formas Fe(II) y Fe(III) de la RcSOD resultaron más estables que las dos formas de la Mn-RcSOD. Observamos además que existe una influencia del estado redox del metal, siendo siempre más estables las formas oxidadas que las reducidas. Este efecto fue más marcado para la Mn-RcSOD, detectándose una diferencia de casi 12°C entre Mn(III)-RcSOD y Mn(II)-RcSOD. Considerando que la Fe-RcSOD es la forma metalada térmicamente más estable de la proteína, la estabilidad del complejo final proteína-metal no sería el factor responsable del contenido mayoritario de Mn en la RcSOD nativa.

Las superóxido dismutasas de tipo Fe/Mn son enzimas cruciales en el sistema de defensa antioxidante celular tanto procarionota como eucariota. Numerosos trabajos han investigado sus mecanismos regulatorios (Hassan & Sun, 1992;

Dubrac & Touati, 2002; Blanchard y col., 2007), catalíticos (Meier y col., 1995; Tabares y col., 2006; Tabares y col., 2007; Abreu y col., 2008) y estructurales (Ludwig y col., 1991; Tabares y col., 2005; Pedersen y col., 2009). Sin embargo, aún no se ha logrado establecer de manera inequívoca qué factores de la estructura proteica, regulatorios o bien celulares están involucrados en la selectividad de metal. Es realmente sorprendente que a pesar de la alta homología de secuencia y similitud estructural entre las MnSODs y FeSODs, la sustitución metálica recíproca provoque formas enzimáticas inactivas (Whittaker, 2003). En los últimos años se ha caracterizado parcialmente el proceso de captura de metal de la apoproteína de la MnSOD de *E. coli* proponiéndose que la misma debe adquirir una conformación “abierta” que permita la entrada del cofactor (Whittaker & Whittaker, 2008). Han sugerido, además, que este proceso se ve incrementado al aumentar la temperatura y el pH del medio de reacción (Whittaker & Whittaker, 2008). Hasta el momento, la mayoría de los ensayos de captura de metal fueron realizados *in vitro*, con la excepción de un trabajo realizado en la MnSOD de mitocondrias de levaduras (Culotta y col., 2006). Este último sugiere que la incorporación de metal en esta SOD ocurre dentro de la mitocondria, mientras que fuera de ella la proteína se encuentra en su forma de apoenzima no metalada. Se ha propuesto que la incorporación de metal está directamente ligada al proceso de desnaturalización que sufre la proteína al ser importada al plástido (Luk y col., 2005). En este caso como en el de la MnSOD de *E. coli* la incorporación del metal por la apoproteína está limitada a la adquisición de una conformación abierta. Hasta el momento, no se han encontrado chaperones para metales como Mn y Fe que puedan facilitar este proceso, sugiriendo la posibilidad de que la captura de metal ocurra co-traduccionalmente, si bien no puede descartarse que existan otros factores locales dentro de la célula que favorezcan la metalación.

De acuerdo a nuestras observaciones existen numerosos factores que intervienen en el proceso de incorporación del cofactor metálico así como en la selectividad de metal de la RcSOD. La disponibilidad intracelular de Fe y Mn influye directamente en el contenido metálico de la holoenzima, tal como se observó en los ensayos de captura *in vivo* de la RcSOD recombinante. No

obstante, comprobamos que la incorporación de metal depende también de cambios conformacionales en la apoproteína que faciliten el ingreso del cofactor metálico al sitio de coordinación, el cual adquiere su conformación independientemente de la presencia del metal durante la síntesis y el plegamiento.

En nuestro laboratorio se continuará profundizando el estudio de las condiciones de incorporación de metal de manera comparativa entre los cofactores fisiológicos, Fe y Mn, de la SOD cambialística de *Rhodobacter capsulatus*.

CAPITULO IV: Defensa antioxidante de aislamientos bacterianos altoandinos

Introducción

La cordillera de los Andes es un sistema montañoso de América del Sur comprendido entre los 11° de latitud norte y los 56 ° de latitud sur, atravesando Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Colombia, Perú y parte de Venezuela. La altura media es de unos 4000 metros, con numerosos puntos que alcanzan y hasta superan los 6000 metros. Es la mayor cordillera del continente americano y una de las más importantes del mundo. Constituye una enorme masa montañosa que discurre en dirección sur - norte, bordeando la costa del océano Pacífico, a lo largo de 7.500 km.

Las grandes estructuras topográficas que forman los Andes encierran, entre la sección oriental o cordillera Real de los Andes y la cordillera Occidental, una serie de mesetas muy homogéneas desde el punto de vista físico, denominadas en su conjunto como **altiplano andino**. La mayor parte del altiplano se extiende sobre todo por el territorio de Bolivia, aunque, marginalmente, se prolonga por el norte hasta el Perú, y por el sur hasta Chile y la Argentina (la puna de Atacama). Ocupa una superficie superior a los 100 mil km², y su altitud media es de 3.650 m.

El **altiplano andino** está constituido por un conjunto de cuencas cerradas y separadas por cerros aislados, sin desagüe hacia el mar y con numerosos lagos. En este contexto, los salares y **lagunas de altura** presentan una combinación de factores ambientales tales como: (a) Ubicación subtropical. (b) Clima muy seco y de nubosidad nula prácticamente durante todo el año. (c) Baja profundidad de sus aguas en lagunas y humedales (10 a 90 cm aproximadamente). (d) Alta incidencia en radiación UV (RUV) debido al incremento de la radiación con la altura. (e) Variación anual de la salinidad en

función de la sequía (5 a 40 ppm). (f) Alta concentración de metales pesados en particular arsénico. (g) Alta variación diaria de temperatura (-20 a 25 °C), siendo posible que en la noche (inclusive en verano) se produzcan heladas cuando al mediodía se registran valores de más de 20°C.

Las cepas bacterianas estudiadas en la presente tesis fueron aisladas de las Lagunas Verde, Negra, Azul y Chaxas, cuya descripción se resume en la Tabla 6 (Ordoñez y col., 2009). Estas lagunas representan ecosistemas con características extremas (desde un punto de vista antropocéntrico) para la supervivencia de los organismos que en ellas habitan.

Tabla 6: Características generales de las lagunas altoandinas Negra, Verde, Azul y Chaxas

	Laguna Negra	Laguna Verde	Laguna Azul	Laguna Chaxas
Posición geográfica	Catamarca (Argentina)	Catamarca (Argentina)	Catamarca (Argentina)	Salar de Atacama (Chile)
Profundidad (cm)	20	20	100	20
Altitud (m)	4,400	4,400	4,400	3,400
pH	6,8	6,7	7,5	7,8
Arsénico (mg L⁻¹)	3	0,8	0,8	9,62
Salinidad (ppm)	32	5	5	55,8
Máxima UV-B registrada <i>in situ</i> (W m⁻²; 280-312 nm)	10,80	10,78	10,78	ND

La luz solar está compuesta por un espectro continuo de radiación electromagnética que se divide en tres partes principales de longitudes de onda: ultravioleta (45%), visible (5%) e infrarroja (50%). La **radiación UV** abarca desde 100 a 400 nm y es su vez sub-clasificada en tres categorías:

onda larga UV-A (315 - 400 nm), onda media UV-B (280 – 315 nm) y onda corta UV-C (100 – 280 nm) (Hussein, 2005). La capa de ozono absorbe eficientemente la radiación hasta los 310 nm y por lo tanto consume toda la UV-C y la mayor parte de la UV-B (95%), en cambio, la radiación UVA no es absorbida en absoluto. Debido al considerable daño en la capa de ozono la fracción de radiación UV-B que alcanza la superficie terrestre es cada vez mayor (Duthie y col., 1999).

La radiación UV provoca daño por dos mecanismos diferentes, uno es por absorción directa de fotones de UV por cromóforos celulares que conllevan a reacciones foto-inducidas. Y un segundo mecanismo, que es indirecto, implica procesos de fotosensibilización, donde sensibilizadores/cromóforos endógenos o exógenos absorben luz UV (Pattison & Davies, 2006). La absorción de la energía de los fotones genera cambios en la distribución electrónica de las moléculas cromóforos/fotosensibilizadoras creando el estado de singlete excitado. El daño celular ocasionado por un fotosensibilizador excitado ocurre por dos vías principales usualmente llamadas Tipo I y Tipo II (Pattison & Davies, 2006). Los mecanismos de Tipo I involucran la transferencia electrónica a través de la interacción directa entre el fotosensibilizador excitado y otras biomoléculas resultando en la formación de radicales libres. Esta vía no requiere oxígeno para la inducción de daño molecular. El mecanismo Tipo II, en cambio implica la transferencia energética desde un sensibilizador excitado al oxígeno molecular que conlleva a la producción de EROs. En mayor medida se genera oxígeno singlete, un estado excitado del oxígeno, que es un oxidante muy poderoso de relativamente larga vida media. En menor medida se produce anión superóxido y por su posterior desproporción se genera peróxido de hidrógeno (Pattison & Davies, 2006).

Numerosas biomoléculas pueden actuar como cromóforos/sensibilizadores absorbiendo la radiación UV, entre ellas se incluyen ácidos nucleicos, aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina y cisteína), NADH y NADPH, grupos hemo, quinonas, flavinas, porfirinas y carotenoides, entre otros (Svobodova y col., 2006). Otras macromoléculas como lípidos y polisacáridos no absorben en la región de UV y por lo tanto no sufren daño directo, sino a través de procesos oxidativos (Svobodova y col., 2006).

La absorción directa de la radiación UV por el ADN genera dímeros de bases nucleotídicas incluyendo especies de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs del inglés cyclobutane-pyrimidine dimers) y compuestos de pirimidina (6-4) pirimidona ((6-4)-PP). Estas clases de dímeros están implicadas en la mutagenicidad de la radiación UV que se caracteriza por los altos niveles de transversiones CC→TT y C→T (Svobodova y col., 2006).

El efecto inducido por la UV-A en las células es principalmente indirecto vía procesos oxidativos iniciados por fotosensibilización endógena. Luego de la exposición a UV-A se generan EROs que median el daño a proteínas, lípidos y azúcares (Svobodova y col., 2006). A pesar de que este mecanismo de lesión es el históricamente aceptado para UV-A, recientemente se ha reportado que este rango de la radiación UV es capaz de inducir la producción de CPDs en células de roedores (Rochette y col., 2003).

La radiación UV-B por su parte, produce fundamentalmente lesión directa al ADN (formación de CPDs y (6-4)-PP) y a proteínas (interacción con aminoácidos), aunque también se ha demostrado que induce daño oxidativo promoviendo la producción de EROs (He & Hader, 2002; Shiu & Lee, 2005).

La **salinidad** es uno de los factores ambientales más críticos que deben afrontar los microorganismos. El consecuente déficit hídrico intracelular induce cambios conformacionales que tienen como consecuencia la disfunción de las enzimas y/o de la cadena de transporte de electrones, lo cual conduce a la acumulación de EROs y subsecuentemente, a la peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y mutación del ADN. Los principales daños en las células se deben a la formación de puentes disulfuro en las proteínas y uniones cruzadas entre proteínas y ADN. También se ha observado que los radicales libres causan desesterificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos afectando la integridad de la membrana celular (Martinez y col., 2001; Marino y col., 2006).

La concentración de **arsénico** presente en las lagunas supera considerablemente la cantidad máxima aceptada por la Organización Mundial de la Salud para el agua potable, que es de 10 microgramos por litro. El

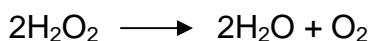
contenido de arsénico constituye una condición ambiental fuertemente limitante para la vida no solo de los seres humanos sino también de muchos microorganismos (Valko y col., 2005; Lantz & Hays, 2006). La formación de radicales libres mediada por metales causa diversas modificaciones a las bases del ADN, además de la peroxidación de lípidos y la alteración de la homeostasis de calcio y sulfhidrilos (Lantz & Hays, 2006). Los peróxidos de lípidos formados mediante el ataque de radicales sobre residuos de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos, pueden luego reaccionar con metales redox produciendo finalmente malonildialdehído, conocido por sus características mutagénicas. Uno de los determinantes fundamentales de la toxicidad de todos estos metales es la generación de EROs y del nitrógeno (Lantz & Hays, 2006).

Se ha sugerido que existe una relación entre la defensa contra metales pesados y la antioxidante (Huang y col., 2010) debido a que bacterias crecidas en presencia de bajos niveles de arsénico inducen una protección cruzada a concentraciones letales de peróxidos (Hrmpeng y col., 2006).

El desarrollo de mecanismos de defensa antioxidante ha sido una estrategia evolutiva de los organismos para tolerar la vida en la atmósfera terrestre que desde hace 3000 millones de años comenzó a acumular oxígeno (Benzie, 2000). Como mencionamos en la *Introducción*, las enzimas detoxificadoras son armas fundamentales de la defensa antioxidante contrarrestando la producción celular de EROs. Las principales enzimas son la SOD y la catalasa, ambas muy estudiadas y caracterizadas (Switala & Loewen, 2002; Whittaker, 2002) considerándose a la SOD la primer línea de defensa antioxidante ya que está ampliamente distribuida en los seres vivos incluso en microorganismos anerobios estrictos (Hewitt & Morris, 1975). A continuación describiremos algunas de las características generales de las catalasas.

Catalasas

La reacción global catalizada por las **catalasas** es la degradación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno:



Existen tres clases de proteínas no relacionadas entre sí ni en secuencia ni en estructura que exhiben actividad catalasa (Chelikani y col., 2004). El grupo más ampliamente distribuido lo constituyen las **catalasas monofuncionales**. Son proteínas multiméricas que contienen un grupo hemo y se subdividen en las que poseen subunidades de alto (> 75 kDa) y bajo (< 60 kDa) peso molecular. Otra clase de catalasas son bifuncionales o **catalasas-peroxidasas** que están altamente relacionadas en estructura y secuencia a las peroxidasas vegetales. Al igual que las monofuncionales poseen un grupo hemo por subunidad. El último grupo son las **catalasas no hemínicas** que contienen manganeso, también llamadas pseudo-catalasas (Chelikani y col., 2004).

En este capítulo de la tesis se describen los resultados obtenidos al estudiar la respuesta antioxidante y su relación con la tolerancia a radiación UV de ocho aislamientos bacterianos altoandinos. Se incluyeron cinco cepas Gram negativas, cuatro del género *Acinetobacter*. (L. Negra y L. Verde) y una bacteria fototrófica del género *Rhodospirillum rubrum* (aislada en nuestro laboratorio) proveniente de L. Azul, así como tres cepas Gram positivas del filo *Actinobacteria* (L. Azul y L. Chaxas).

Resultados

Aislamientos del género *Acinetobacter*

En los últimos 40 años se han hallado un amplio número de aislamientos clínicos del género *Acinetobacter* siendo causales de severas infecciones tanto hospitalarias como adquiridas en la comunidad, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (Mussi y col., 2007; Jung y col., 2010; Nemeč & Dijkshoorn, 2010; Sullivan y col., 2010). *A. baumannii* es la especie más frecuentemente encontrada en la bibliografía, particularmente asociada con multirresistencia a antibióticos incluso con una preocupante resistencia emergente a carbapenem (Mussi y col., 2005; Dijkshoorn y col., 2007; Doi y col., 2009). Si bien este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, poco se ha estudiado sobre aislamientos ambientales y su impacto en ecosistemas acuáticos y terrestres (Vanbroekhoven y col., 2004; Kim y col., 2008; Girlich y col., 2010).

Recientemente, cuatro cepas identificadas por secuenciación y comparación de fragmentos del rADN 16S como pertenecientes al género *Acinetobacter* fueron aisladas de las Lagunas Verde (Ver3, Ver5 y Ver7) y Negra (N40) (Ordoñez y col., 2009). En esta sección de la tesis, se describen los resultados obtenidos al evaluar la tolerancia a agentes oxidantes y a radiación UV-B, así como los niveles de actividad de enzimas detoxificadoras comparando los cuatro aislamientos con tres cepas de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*).

Análisis filogenético

La asignación de especie es actualmente un tema en discusión ya que los abordajes fenotípicos clásicos han ido perdiendo relevancia al existir nuevos métodos genéticos de clasificación. Si bien la secuenciación de los genes del rARN 16S resulta ser una metodología sumamente útil, fácil y rápida de asignación, no sería el método más preciso. De acuerdo a bibliografía reciente (Achtman & Wagner, 2008) el porcentaje de hibridización ADN-ADN así como el análisis de secuencias de múltiples locus (*MLSA, multilocus sequence analysis*) resultarían ser más apropiados para la identificación taxonómica (Oda y col., 2008). Se ha propuesto que un valor $\geq 70\%$ de hibridización ADN-ADN entre dos cepas indicaría que pertenecen a la misma especie (Achtman & Wagner, 2008). Porcentajes menores de este valor se correlacionan con identidades de secuencia del rADN 16S de $< 98,7\%$ y por lo tanto porcentajes de homologías del 16S rADN menores a este valor se asocian a especies diferentes. Sin embargo este concepto no es recíproco, ya que $\geq 98,7\%$ de homología entre dos secuencias de rADN de 16S no necesariamente implica la pertenencia a una misma especie (Achtman & Wagner, 2008).

En base a nuestros resultados, no podemos concluir que los aislamientos Ver5 y N40 pertenezcan a la misma especie o puedan ser asignadas como *A. lwoffii*. No obstante, los porcentajes de homología al comparar las secuencias del rADN 16S son altos y se agrupan dentro del grupo de esta especie, sugiriendo que están filogenéticamente muy relacionadas.

Asimismo, teniendo en cuenta el porcentaje de homología del rADN 16S entre Ver3 y Ver7 (99,51%) es posible que pertenezcan a la misma especie pero esto no puede asegurarse por los motivos antes mencionados.

Como complemento, se realizaron pruebas bioquímicas comúnmente usadas en el laboratorio de microbiología clínica (Schreckenberger & von Graevenitz, 1999), cuyos resultados se resumen en la Tabla 7. Se observó que la tinción de Gram, el ensayo de movilidad, la fermentación de azúcares, así como la

evaluación de la presencia de citocromo c oxidasa, fueron todos compatibles con el género *Acinetobacter* para los cuatro aislamientos, según el criterio publicado en el *Manual de Microbiología Clínica (Schreckenberger & von Graevenitz, 1999)*. En contraste, en el ensayo de crecimiento a 44°C, observamos que solo las cepas Ver3 y Ver7 fueron capaces de crecer a esta temperatura, como previamente se ha descrito para el grupo *A. baumannii-calcoaceticus* (Schreckenberger & von Graevenitz, 1999). Las cepas *A. baumannii* DSM 30007, *A. johnsonii* DSM 6963 y *A. lwoffii* DSM 2403 fueron utilizadas como controles en este trabajo.

Tabla 7: Pruebas bioquímicas utilizadas como complemento en la identificación de los aislamientos del género *Acinetobacter*

	Tinción de Gram	Cit. c oxidasa	Fermentación azúcares (TSI agar)	Movilidad	Crecimiento a 44°C
Ver3	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Ver5	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ver7	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(+)
N40	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>A. johnsonii</i> DSM6963	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>A. baumannii</i> DSM30007	cocobacilos Gram (-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Enzimas antioxidantes

Las actividades SOD y catalasa de cultivos cosechados en fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0,8 - 1,0$) fueron visualizadas mediante tinción *in situ* en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*.

Como se muestra en la Figura 19-A, se detecto una única banda con actividad SOD en las siete cepas de *Acinetobacter* estudiadas, que fue inhibida por H_2O_2 pero mostró insensibilidad a KCN (Figura 19, B y C), comportándose entonces como una FeSOD, aunque no podemos descartar el tipo cambialística. La SOD también fue medida espectrofotométricamente mediante el método de la inhibición de la reducción del citocromo c por el par xantina/xantina oxidasa

(ver *Materiales y Métodos*) obteniéndose niveles de actividad específica siempre entre 50 y 100 U mg⁻¹ (Figura 20).

En contraste, el patrón electroforético y las medidas espectrofotométricas realizadas para la actividad catalasa fueron altamente divergentes entre las cepas estudiadas. Los extractos crudos de Ver3 y Ver7 mostraron una única banda (Figura 19, D) correspondiente a valores de actividad 5 a 15 veces mayores a los detectados para las cepas control (Figura 20), mientras que Ver5, N40, *A. baumannii* DSM 30007 y *A. Iwoffii* DSM 2403 presentaron dos bandas electroforéticas en el gel nativo (Figura 19, D). Inesperadamente, no se detectó actividad catalasa en los extractos solubles de *A. johnsonii* DSM 6963.

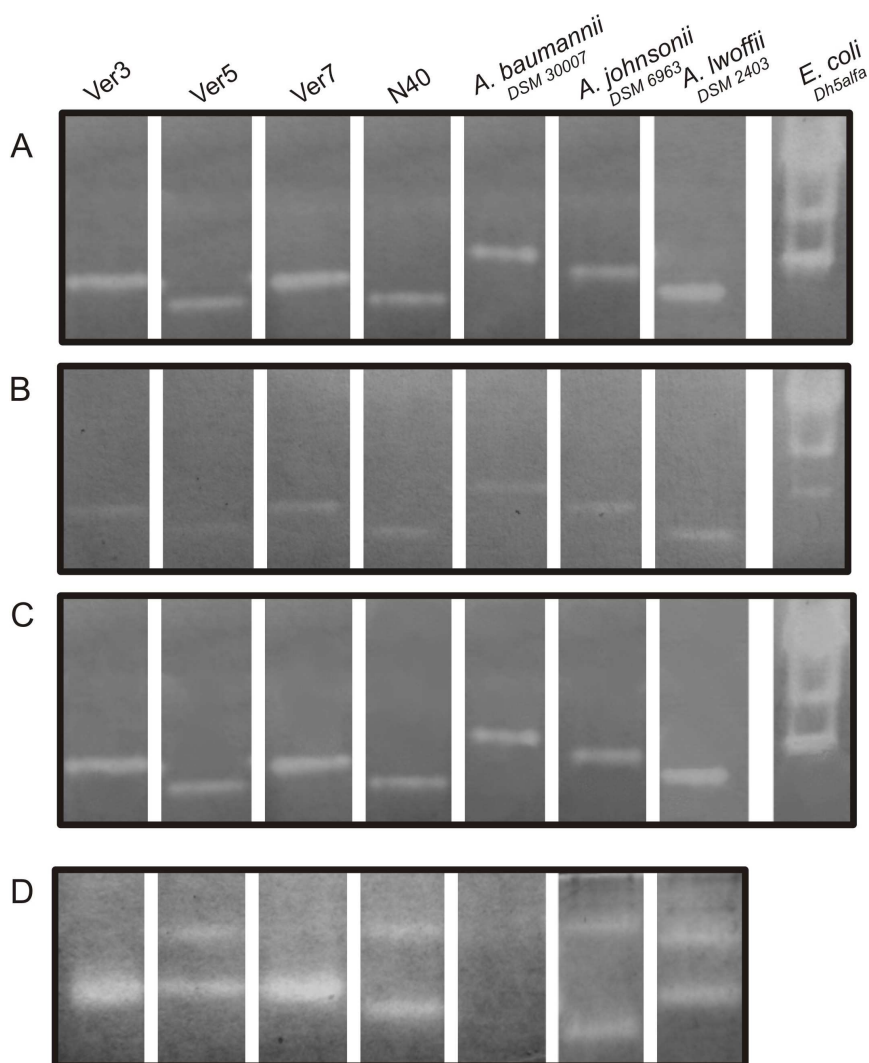


Figura 19: Actividad *in situ* de SOD y catalasa

Alícuotas de células sonicadas de las cepas indicadas conteniendo ~ 10 µg de proteína soluble se sembraron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Las actividades antioxidantes fueron detectadas por tinción *in situ* en los paneles A, B y C para SOD; y en el panel D para catalasa como se describió en *Materiales y Métodos*. Además se evaluó el efecto del agregado de inhibidores de la actividad SOD, 2 mM H₂O₂ (B) y 2 mM KCN (C). No se detectó actividad catalasa en los extractos solubles de *A. johnsonii* DSM 6963.

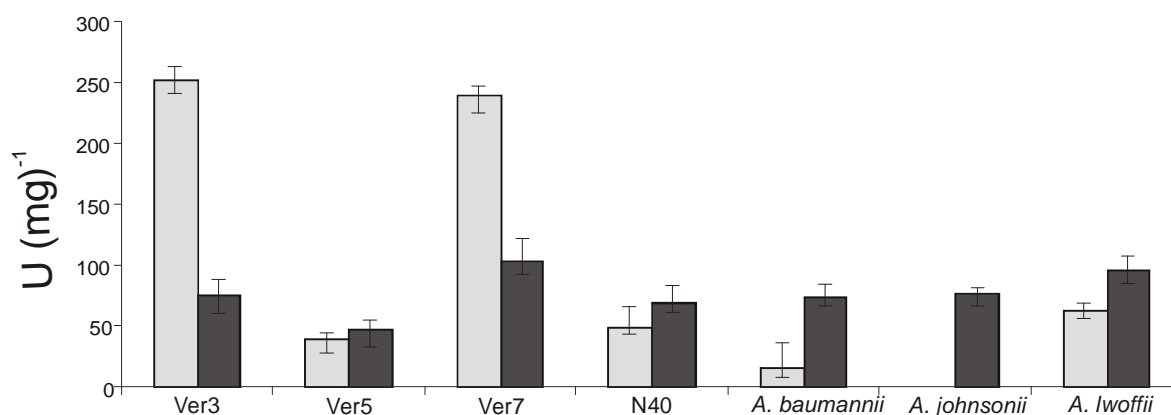


Figura 20: Actividades SOD y catalasa determinadas espectrofotométricamente

Cultivos en fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0.8$) fueron sonicados y clarificados por centrifugación como se describe en *Materiales y Métodos*. Las actividades catalasa (gris claro) y SOD (gris oscuro) fueron determinadas por los métodos espectroscópicos antes descritos. No se detectó actividad catalasa en los extractos solubles de *A. johnsonii* DSM 6963.

Tolerancia a desafíos pro-oxidantes y radiación UV-B

Se evaluó la tolerancia a radiación UV-B colocando gotas de diluciones seriadas de las cepas en estudio en placas de LB-agar y exponiéndolas a una fuente de luz UV como se describió antes (*Materiales y Métodos*). Nuestros resultados muestran que los cuatro aislamientos altoandinos del género *Acinetobacter* son más tolerantes a la radiación UV-B que las cepas seleccionadas como control (Figura 21). En particular, los aislamientos Ver3 y Ver7 presentaron la mayor resistencia, siendo capaces de crecer aún luego de 60 minutos de irradiación con una intensidad de $2,6 \text{ W m}^{-2}$ de UV-B.

Para evaluar la tolerancia de las cepas de *Acinetobacter* a agentes pro-oxidantes realizamos protocolos de similares características suplementando el medio de cultivo con H_2O_2 y MV, según correspondiese. A diferencia del comportamiento observado bajo la exposición a UV-B, la respuesta de N40 y Ver5 fue similar a la de las cepas control cuando se realizaron desafíos con H_2O_2 . Los aislamientos Ver3 y Ver7 fueron siempre las cepas más tolerantes y

en este caso, Ver5 la más sensible (Figura 21). Cuando se ensayó el agregado de 0,15 mM de MV al LB-agar solo las cepas Ver3 y Ver7 fueron capaces de crecer hasta la dilución 10^{-3} . No se observó desarrollo para el resto de las cepas estudiadas en las condiciones ensayadas, con la excepción de un escaso crecimiento para *A. johnsonii* DSM 6963 (Figura 21).

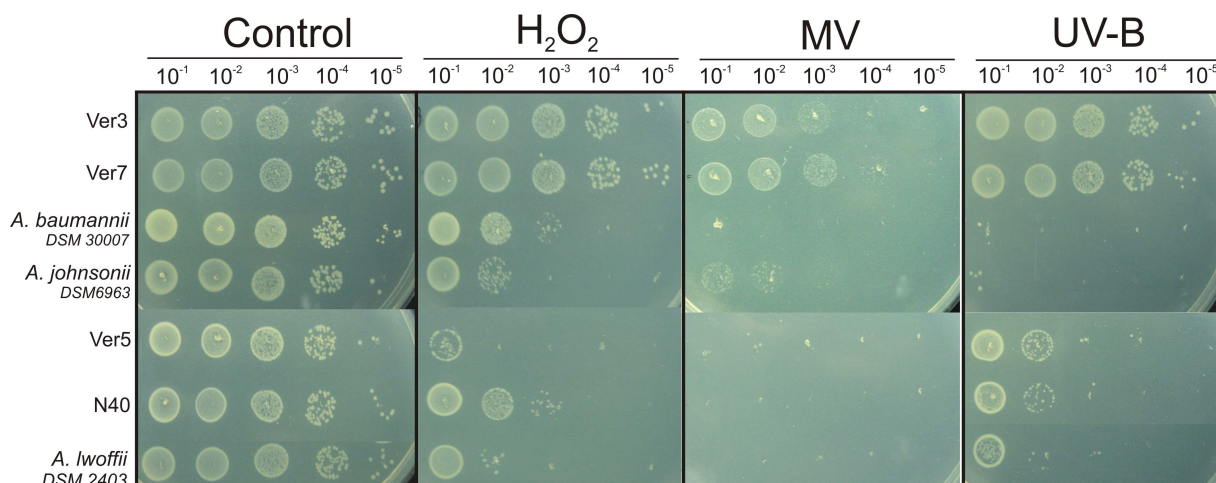


Figura 21: Sensibilidad a radiación UV y a agentes pro-oxidantes en placas de Petri

Para evaluar la tolerancia a radiación UV y pro-oxidantes, se sembraron alícuotas de 10 μ l provenientes de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0.4$) en placas de LB-agar. Los agentes oxidantes fueron agregados a las placas en las cantidades indicadas (0,35 mM H_2O_2 ; 0,15 mM MV). La tolerancia a UV se evaluó luego de la exposición de las gotas de cultivo a $9.10^3 J.m^{-2}$. Las diluciones seriadas se indican en la parte superior y la identidad de la cepa a la izquierda de la figura.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los primeros ensayos, se eligieron el aislamiento Ver7 y la cepa *A. baumannii* DSM 30007 para determinar el porcentaje de sobrevivencia frente a desafíos oxidativos y radiación UV-B. Se crecieron cultivos hasta fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0,4$) y fueron sometidos a tres tratamientos diferentes. Para evaluar el efecto de los agentes pro-oxidantes, 10 ml de cultivo fueron incubados con 5 mM y 10 mM de MV o H_2O_2 en frascos de 100 ml. La influencia de la radiación UV-B se estudió colocando los cultivos en placas de Petri tapadas y exponiéndolos a $2,0 - 3,0 W.m^{-2}$ de radiación UV-B por 30 y 60 minutos. Luego de los tratamientos, las células fueron lavadas en frío, sometidas a diluciones seriadas en cuatro réplicas y sembradas en placas de LB-agar.

Contrariamente a lo observado en los ensayos en placas, el aislamiento Ver7 fue menos tolerante al propagador de superóxido metilviológico que *A. baumannii* DSM 30007. Como se observa en la Figura 22-C, la sobrevivencia del

aislamiento ambiental cae drásticamente al ser incubada por 1 hora en presencia de 5 mM de MV, mientras que *A. baumannii* DSM 30007 persiste en un 50% de sobrevivencia hasta una concentración de 10 mM del pro-oxidante.

En cambio, el desafío con H₂O₂ (Figura 22, A) no solo no redujo el porcentaje de sobrevivencia de Ver7 en las dos concentraciones estudiadas (5 mM y 10 mM) sino que además se observó un incremento en el desarrollo bacteriano al incubar las células con 5 mM del agente oxidante. La sobrevivencia de la cepa *A. baumannii* DSM 30007, en cambio, disminuyó un 50% luego de ser expuesta a 5 mM y 10 mM de H₂O₂.

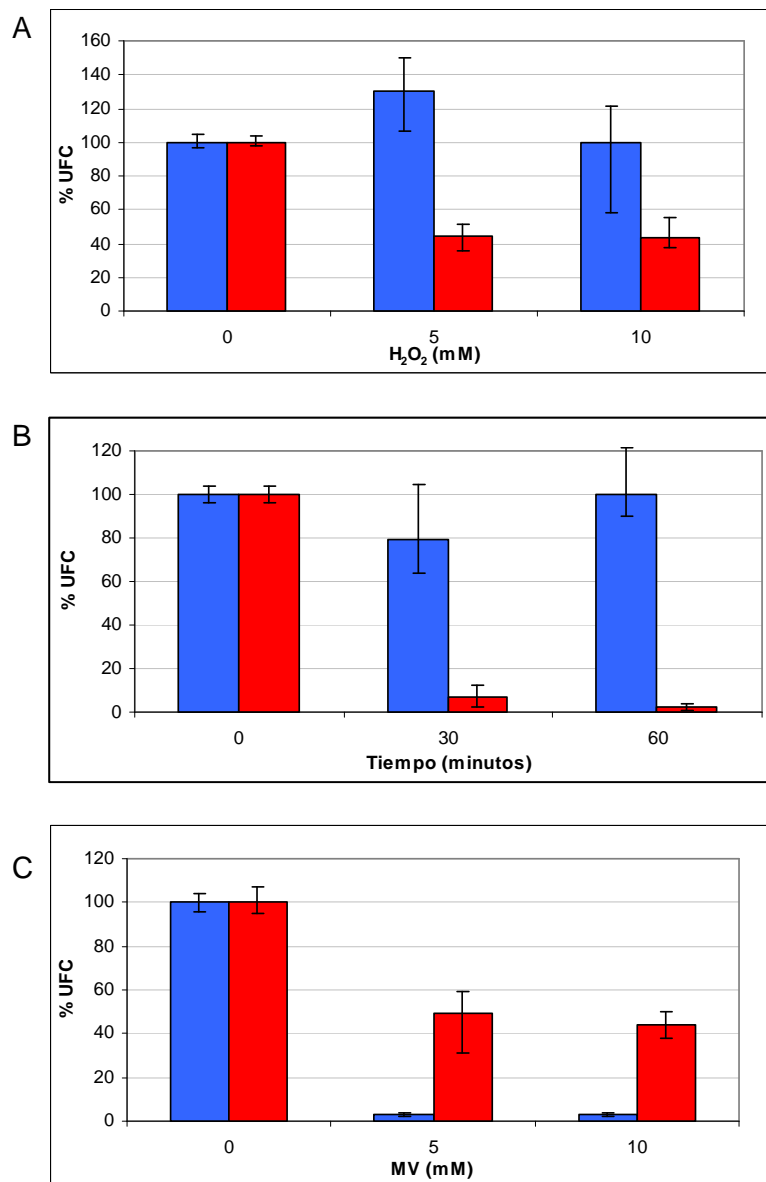


Figura 22: Sobrevivencia de las cepas Ver7 y *A. baumannii* DSM 30007 a agentes pro-oxidantes y a radiación UV

Para evaluar el efecto de los agentes pro-oxidantes, los cultivos fueron incubados con las cantidades indicadas de MV (panel C) o H₂O₂ (panel A). La influencia de la radiación UV-B (panel B) se estudió exponiendo los cultivos a 2,0 – 3,0 W.m⁻² de radiación UV-B por 30 y 60 minutos. El porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) determinado se muestra en la figura como barras azules para el aislamiento Ver7 y rojas para la cepa *A. baumannii* DSM 30007. El 100% corresponde a $1,57 \pm 0,11 \cdot 10^7$ UFCs para *A. baumannii* DSM 30007 y $2,03 \pm 0,23 \cdot 10^7$ UFC para Ver7.

La exposición a UV-B arrojó resultados en el mismo sentido, la cepa *A. baumannii* DSM 30007 presentó una reducción de su sobrevivencia de más del 90% luego de 30 y 60 minutos de incubación frente a 2,3 – 2,5 W m⁻² de radiación (Figura 22, B). El aislamiento Ver7 no presenta modificaciones significativas en su supervivencia al ser expuesta a igual intensidad de radiación y por los mismos tiempos que *A. baumannii* DSM 30007.

El aislamiento Ver7 exhibió características únicas de tolerancia a UV-B y a H₂O₂, aunque se mostró altamente sensible a la exposición a MV contrariamente al efecto observado en los ensayos de gota sobre placa. Esto pone de manifiesto que los efectos detectados son diferentes entre los experimentos de conteo de UFCs y la gota en placa. Ya sea porque el daño provocado por el agente es diferente o porque los mecanismos de defensa que se ponen de manifiesto son otros.

Respuesta de las enzimas antioxidantes a desafíos con agentes pro-oxidantes y radiación UV-B

Con el fin de evaluar el efecto de la exposición de las células a pro-oxidantes y a radiación UV-B sobre las enzimas SOD y catalasa, se determinó la actividad de las mismas antes y después de los desafíos. Se crecieron cultivos de las cepas Ver7 y *A. baumannii* DSM 30007 hasta fase exponencial (DO_{600nm} ~ 0,6). Estos cultivos fueron suplementados con 2,5 mM de MV o 2,5 mM de H₂O₂ e incubados por 60 minutos a 30°C.

El efecto de la radiación UV-B se evaluó exponiendo alícuotas de 20 ml de cultivo en placas de Petri tapadas a 9.10³ Joule.m⁻² de radiación.

Luego de los desafíos, las células fueron cosechadas, lavadas con solución tampón Tris-HCl 20 mM en frío y almacenadas a -70°C. Se obtuvieron

extractos solubles y se realizaron las medidas espectrofotométricas de actividad enzimática como se describe en *Materiales y Métodos*.

La incubación en presencia de 2,5 mM de H₂O₂ provocó un incremento en la actividad catalasa en ambas cepas Ver7 y *A. baumannii* DSM 30007. La exposición a 2,5 mM de MV produjo una reducción en la catalasa de la cepa *A. baumannii* DSM 30007 mientras que indujo un aumento del 100% de esta actividad en aislamiento Ver7 (Figura 22).

La actividad SOD, en cambio, no se vio modificada por MV ni H₂O₂ en ninguna de las dos cepas (Figura 22).

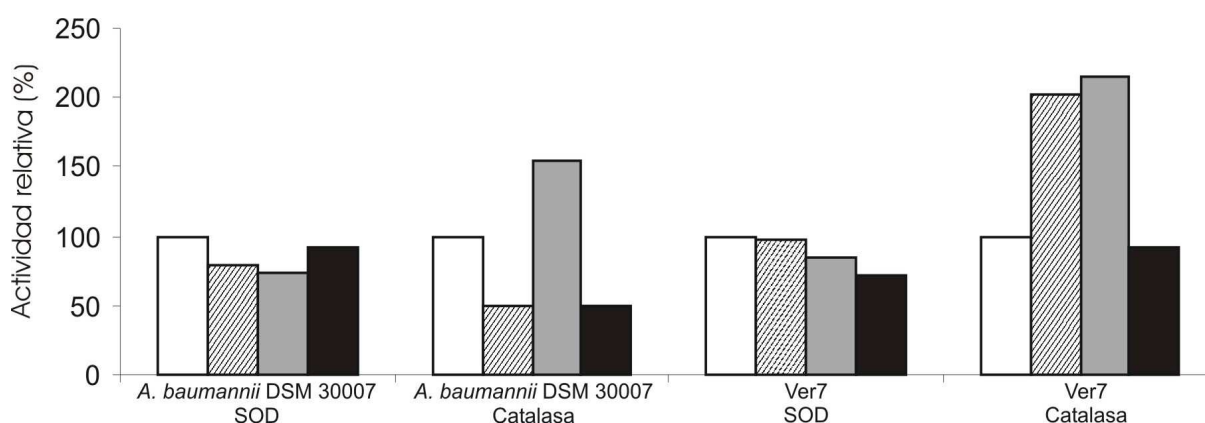


Figura 22: Efecto de los agentes pro-oxidantes y la radiación UV-B sobre las enzimas antioxidantes. Se evaluó el efecto del agregado de agentes oxidantes al medio de cultivo suplementando con con 2.5 mM MV (barras con líneas) or 2.5 mM H₂O₂ (barras grises). Las barras blancas corresponden al control sin adición de agente oxidante. El 100% de actividad catalasa corresponde a 12.9 U mg⁻¹ para *A. baumannii* DSM 30007 y 138.8 U mg⁻¹ para el aislamiento Ver7, mientras que los valores control para SOD fueron 41.5 U mg⁻¹ para *A. baumannii* DSM 30007 y 62.9 U mg⁻¹ para Ver7. Para evaluar el efecto de la UV-B, los cultivos fueron expuestas a 9 10³ Joule m⁻² de radiación (barras negras) o mantenidas en la oscuridad para obtener el valor control de 100% (barras blancas). La actividad catalasa correspondiente a las células no expuestas fue 37.4 U mg⁻¹ para *A. baumannii* DSM 30007 y 362.8 U mg⁻¹ para Ver7; y la actividad SOD fue de 57.2 U mg⁻¹ para *A. baumannii* DSM 30007 y de 95.5 U mg⁻¹ para Ver7.

Efecto de la actividad catalasa sobre la resistencia a la radiación UV-B

Figura 24: Efecto de la actividad catalasa sobre la radiación UV-B

Cultivos en fase exponencial ($DO_{600nm} \sim 0.4$) fueron incubados a 30°C en agitador orbital sin aditivos (control) y suplementados con 50mM de AT o 2,5 mM de H_2O_2 . Luego de 60 minutos, las células fueron lavadas con LB fresco y sujetas a diluciones seriadas (indicadas arriba). Alícuotas de 10 μ l fueron sembradas en placas de LB-agar y expuestas a radiación UV-B ($9 \cdot 10^3$ Joule. m^{-2}).

Aislamiento y caracterización de una bacteria fotosintética: *Rhodopseudomonas sp.*

Teniendo en cuenta la experiencia de nuestro grupo en el trabajo con bacterias fotosintéticas, nos planteamos el aislamiento de las mismas a partir de aguas de lagunas altoandinas, utilizando el procedimiento que se describirá más adelante.

Las bacterias fototróficas se distinguen dentro del grupo de las Proteobacterias por su capacidad de realizar fotosíntesis, sin embargo, basado en la comparación de secuencias de rADN 16S no constituyen un taxón único filogenéticamente homogéneo. Es posible encontrar representantes de bacterias fotosintéticas en tres de las cinco clases de Proteobacterias (α -, β - y γ - Proteobacterias) intercaladas junto con bacterias no fototróficas (Stackebrandt y col., 1996).

El género *Rhodopseudomonas* que pertenece a las α -proteobacterias constituye un grupo de gran plasticidad metabólica y sus miembros se encuentran ubicuamente distribuidos. Existen cepas dentro de este género con diversidad de características como la capacidad de fijar nitrógeno y habilidades altamente desarrolladas de biodegradación (Oda y col., 2008).

Rhodopseudomonas palustris tiene, en particular, una extraordinaria versatilidad metabólica siendo capaz de crecer en cualquiera de los cuatro modos de vida metabólica (Larimer y col., 2004):

- fotoautotrófica o fotosintética (energía: luz / carbono: dióxido de carbono);
- fotoheterotrófica (energía: luz / carbono: compuestos orgánicos);
- quimoheterotrófica (energía y carbono: compuestos orgánicos)
- quimoautótrofo (energía: compuestos inorgánicos / carbono: dióxido de carbono).

A pesar de existir numerosas investigaciones sobre aspectos metabólicos (Rey & Harwood, 2010), genómicos (Larimer y col., 2004; Oda y col., 2008) y estructurales (Scheuring y col., 2006) en esta especie bacteriana, aún no se han estudiado los mecanismos que intervienen en la defensa antioxidante o en su regulación. Se ha encontrado un sistema homólogo a RegA/RegB, antes

mencionado (Elsen y col., 2004), que en *Rhodopseudomonas palustris* se denomina RegS/RegR y que también tendría funciones regulatorias redox sobre los metabolismos tanto aeróbico como fotosintético, aunque no sería considerado un regulador global ni esencial como RegAB (Rey y col., 2006). Otro sistema de dos componentes que ha sido recientemente descrito en *R. palustris* es FixLJ-K, el cual controlaría la respiración microaeróbica, la fotofosforilación, así como otros aspectos metabólicos (Rey & Harwood, 2010).

En el presente trabajo de tesis se detalla el procedimiento utilizado para lograr el primer aislamiento de una bacteria fototrófica de lagunas altoandinas así como su identificación taxonómica. Se describen además, ensayos de tolerancia a radiación UV-B y agentes pro-oxidantes junto con medidas de actividades detoxificadoras, tanto en el nuevo aislamiento como en la cepa *Rhodopseudomonas palustris* 1e5, utilizada como control.

Aislamiento de bacterias fotosintéticas

Para efectuar el aislamiento de bacterias fotosintéticas se tomaron muestras de agua de la Laguna Azul, se filtraron para su enriquecimiento y los filtros fueron incubados en medio rico PY dentro de una jarra de anaerobiosis iluminada a temperatura constante de 28°C. Luego de 2-3 días de incubación, se comenzó a detectar coloración rojo-amarronada en los filtros y en el medio utilizado (Figura 25). El cultivo fue sembrado sobre PY-agar para lograr el aislamiento de bacterias coloreadas capaces de crecer en anaerobiosis y luz (Figura 25).

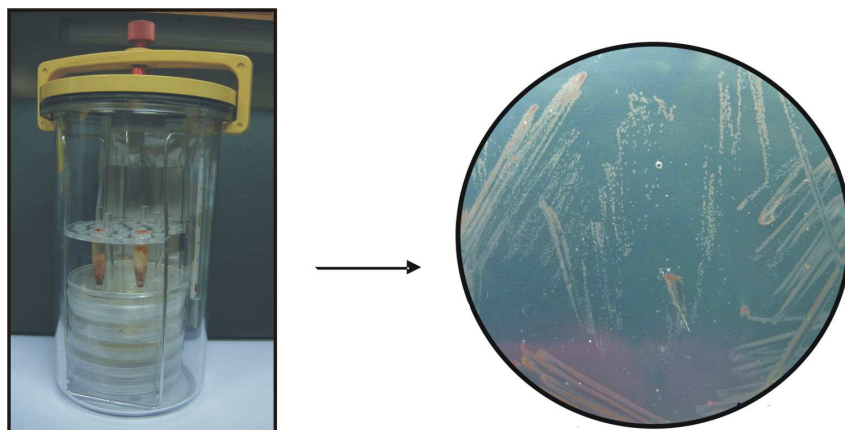


Figura 25: Aislamiento de bacterias fotosintéticas

Los filtros sumergidos en medio rico PY fueron colocados en jarra de anaerobiosis hasta la aparición de color rojo-amarronado. El cultivo se sembró en placas de PY-agar y se reincubó en jarra de anaerobiosis hasta la obtención de colonias aisladas color rojo-amarronadas.

Para comenzar a caracterizar este nuevo aislamiento bacteriano, al cual denominamos **A80**, realizamos espectros en el rango visible (350 – 900 nm) de células totales y luego de la extracción con acetona-metanol (Figura 26). Como resultado, observamos espectros compatibles con los esperados para bacterias púrpuras fotosintéticas (Varga & Staehelin, 1983). En la Figura 26 se visualizan espectros de células crecidas en anaerobiosis, donde la banda de absorción a 805 nm corresponde al complejo antena LHII y la banda observada a 866 nm al centro de reacción (RC) y al complejo antena LHI. Luego de una extracción aceto-alcohólica (Scheuring y col., 2006) los espectros obtenidos indican la presencia de bacterioclorofila (770 nm) y carotenoides (476 y 505 nm)

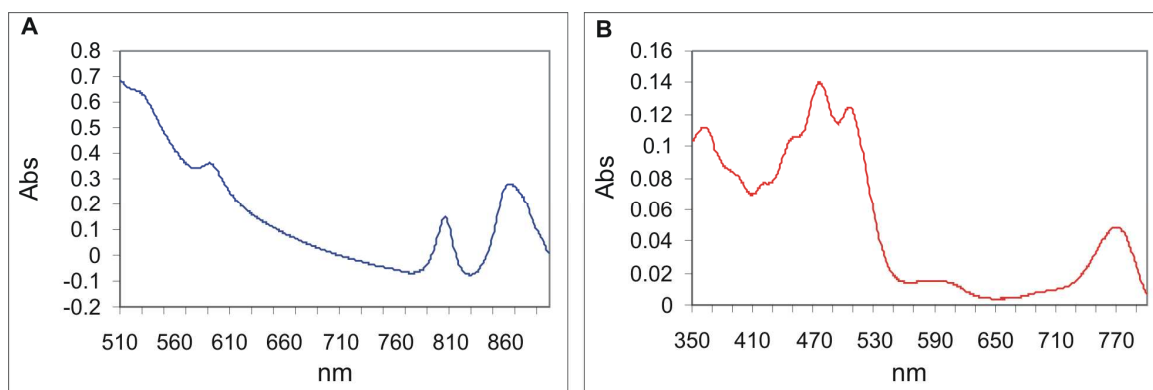


Figura 26: Espectros de membranas y pigmentos fotosintéticos

Las células crecidas en condiciones fotosintéticas fueron resuspendidas en solución tampón 50 mM fosfato con 40% glicerol. A la izquierda (en azul) se visualizan las bandas de absorción correspondientes al complejo antena LH1 (805 nm) y al centro de reacción RC con el complejo antena LHI (866 nm). A la derecha (en rojo) se muestra el espectro de absorción luego de realizar una extracción de pigmentos con acetona-metanol. Se observan las bandas de absorción correspondientes a bacterioclorofila a 770 nm y a carotenoides (476 y 505 nm).

Comparación de secuencias del rADN 16S

Una vez logrado el aislamiento de la cepa A80 que posee características compatibles con una bacteria fotosintética realizamos una comparación de secuencias del rADN 16S para estimar su ubicación taxonómica. Se realizó la extracción del ADN genómico y posterior reacción en cadena de la polimerasa

con cebadores adecuados para amplificar los genes del ARN 16S obteniéndose un fragmento de 780 pb. Luego de su secuenciación y comparación con la base de datos de nucleótidos del *NCBI*, encontramos una identidad de 99,35 % entre el aislamiento A80 y cepas del género *Rhodopseudomonas* sp., de *Rhodopseudomonas palustris* y del género *Afipia* sp. Este último género pertenece a la familia *Bradyrhizobiaceae* al igual que *Rhodopseudomonas*, pero a diferencia de éste no tiene capacidad de realizar fotosíntesis. Como se comentó antes, las bacterias fototróficas están distribuidas entre tres grupos de Proteobacterias junto con géneros no fototróficos como *Afipia*. Consideramos al aislamiento A80 como perteneciente al género *Rhodopseudomonas*, aunque no podemos asegurar por este método de comparación que sea una cepa de la especie *R. palustris*.

Los ensayos que se describen a continuación fueron realizados en paralelo sobre el aislamiento A80 y sobre la cepa *Rhodopseudomonas palustris* 1e5 cedida por los Dres. A. García, N. Pucheu y N. Kerber (Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales, INBA-CONICET, Agronomía - UBA).

Detección de actividad superóxido dismutasa

Se crecieron cultivos del aislamiento A80 y de la cepa control *R. palustris* 1e5 en condiciones aeróbicas (con agitación), *stand* (sin agitación) y anaeróbicas en presencia de luz (*Materiales y Métodos*).

La visualización de la actividad SOD de los extractos crudos obtenidos según el protocolo descrito (ver *Materiales y Métodos*) se realizó en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (Figura 27). Observamos dos bandas con actividad superóxido dismutasa para el aislamiento A80 que no se inhiben con H_2O_2 indicando que ésta sería una SOD de tipo Mn. La cepa 1e5 presentó una única banda con perfil de inhibición compatible con enzimas de tipo Mn.

Como se observa en la Figura 27, la banda con mayor movilidad electroforética del aislamiento A80 y especialmente la banda de la cepa 1e5 presentan una inducción de la actividad SOD con la aireación del cultivo, sugiriendo una

regulación dependiente de oxígeno, como ha sido descrito para otras especies (Hassan & Fridovich, 1977; Cortez y col., 1998).

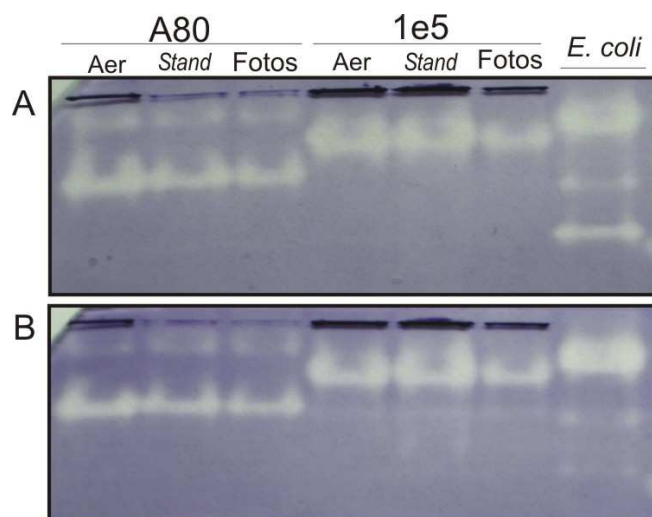


Figura 27: Geles de actividad SOD del aislamiento A80 y la cepa *R. palustris* 1e5. Se sembraron ~10 µg de extracto crudo de las cepas A80 y *R. palustris* 1e5, provenientes de cultivo obtenidos en condiciones aeróbicas (Aer), *stand* (Stand) y fotosintéticas (Fotos) como se describe en *Mat. & Mét.* Luego de la electroforesis los geles nativos fueron incubados en solución tampón fosfato 50 mM (panel A) o en presencia de H₂O₂ (panel B) y revelados según protocolo descrito en *Mat. & Mét.* Se agregó extracto crudo de *E. coli* DH5alfa como control de la inhibición con H₂O₂.

Sensibilidad a agentes pro-oxidantes y a radiación UV-B

El efecto de la exposición a radiación UV-B y a agentes pro-oxidantes fue evaluado sembrando gotitas de 10 µl de cultivo sobre placas de LB-agar según se describió en *Materiales y Métodos*. La sensibilidad a UV-B fue estudiada exponiendo las placas durante 60 y 90 minutos a una intensidad radiante de 2,0 – 3,0 W.m⁻², observándose en ambos casos una mayor tolerancia del aislamiento A80 respecto de la cepa control *R. palustris* 1e5 (Figura 28).

Cuando se evaluó el efecto del H₂O₂, se observó una mayor resistencia del aislamiento A80 respecto de la cepa *R. palustris* 1e5 cuando las placas de LB-agar fueron suplementadas con 0,1 mM de H₂O₂ (Figura 29). También se

ensayaron otras dos concentraciones 0,01 y 0,05 mM, no detectándose diferencias entre ambas cepas (no mostrado).

En las placas suplementadas con el propagador de superóxido MV (0,01; 0,05 y 0,1 mM) no se obtuvo desarrollo bacteriano de las cepas estudiadas en ninguna de las concentraciones ensayadas.

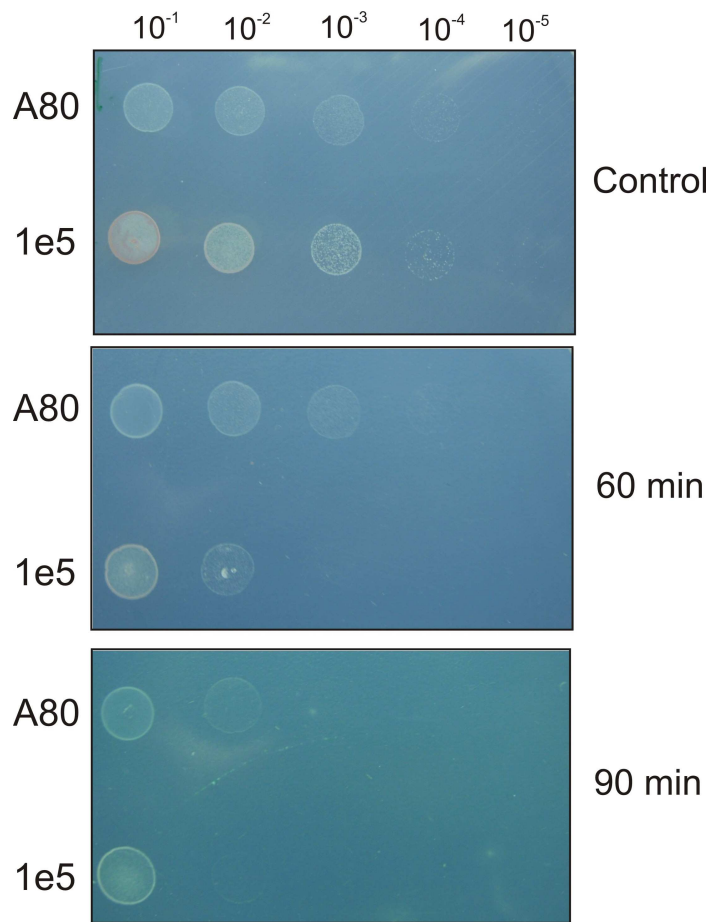


Figura 28: Sensibilidad a radiación UV-B de las cepas A80 y *R. palustris* 1e5

Alícuotas de $10 \mu\text{l}$ provenientes de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial ($\text{DO}_{600\text{nm}} \sim 0.4$) fueron sembradas en placas de PY-agar. Las gotitas fueron expuestas a $2,0 - 3,0 \text{ W.m}^{-2}$ de radiación UV-B por 60 o 90 minutos. Las diluciones seriadas se indican en la parte superior y la identidad de las cepas a la izquierda de la figura.

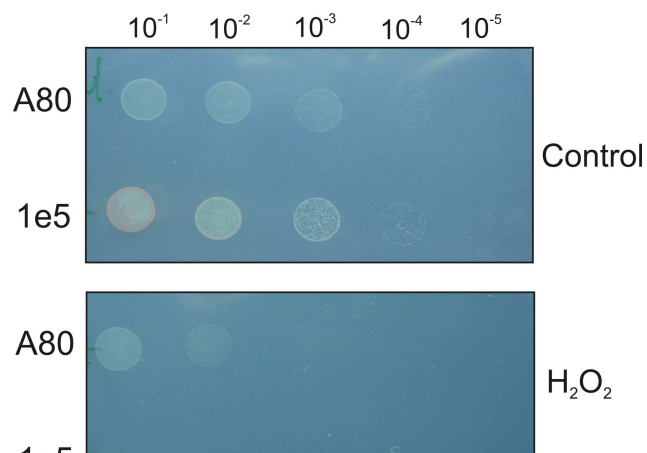


Figura 29: Sensibilidad de las cepas A80 y *R. palustris* 1e5 a H₂O₂

Se sembraron alícuotas de 10 µl provenientes de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial (DO_{600nm} ~ 0.4) en placas de PY-agar. El efecto del H₂O₂ se evaluó adicionando 0,1 mM de este agente al medio de cultivo. Las diluciones seriadas se indican en la parte superior y la identidad de las cepas a la izquierda de la figura.

En el marco de esta tesis, logramos aislar la primera bacteria fotosintética de lagunas del Altiplano identificándose como perteneciente al género *Rhodospudomonas*. El aislamiento A80 presentó dos bandas con actividad SOD en geles de poliacrilamida no inhibida por H₂O₂, sugiriendo ser una Mn-SOD. Comparando la actividad observada en condiciones de crecimiento fotosintético con crecimiento aeróbico, se detecta una inducción de SOD al aumentar la aireación, más notoria aún en el la cepa control *R. palustris* 1e5. Esto indica que existiría una regulación de la SOD dependiente de oxígeno como ya se ha observado en otros sistemas (Hassan & Fridovich, 1977; Cortez y col., 1998).

El aislamiento A80 presentó, además, niveles mayores de tolerancia a H₂O₂ y a radiación UV-B al compararse con la cepa *R. palustris* 1e5.

Aislamientos del *phylum Actinobacteria*

El *phylum Actinobacteria* representa una de las unidades taxonómicas más grandes entre los linajes hasta ahora reconocidos en el dominio *Bacteria*, incluyendo 5 subclases y 14 subordenes (Ventura y col., 2007). Este filo, además, exhibe una amplia diversidad de propiedades fisiológicas y metabólicas, como la producción de enzimas extracelulares y la formación de gran variedad de metabolitos secundarios (Ventura y col., 2007).

Como parte de la caracterización de la respuesta antioxidante de aislamientos altoandinos incluimos en esta tesis los primeros ensayos realizados en tres cepas Gram positivas del *phylum Actinobacteria* previamente descritas (Ordoñez y col., 2009). Dos de estos aislamientos A5 y A12 provienen de la Laguna Azul, y CH13 de la Laguna Chaxas.

La identificación taxonómica fue realizada previamente a este trabajo utilizando la comparación de fragmentos del rADN 16S con la base de datos del *NCBI* (Ordoñez y col., 2009). El aislamiento A5 presentó un 98,33% de homología con dos géneros *Rhodococcus* y *Nocardia*, esto se debe a que el fragmento del rADN 16S que fue secuenciado (420 pb) es demasiado pequeño no siendo posible establecer correctamente cuál es el género al que pertenece. La secuenciación de un fragmento de mayor tamaño del rADN 16S facilitará la ubicación taxonómica de este aislamiento. Un fragmento de 825 pb del rADN 16S del aislamiento CH13 presentó 99,87% de homología con otras secuencias de este gen correspondientes al género *Rhodococcus*. Para el aislamiento A12 se amplificó un fragmento de 832 pb del rADN 16S que mostró hasta 99,87% de homología con secuencias correspondientes con el género *Dietzia*.

Las especies del género *Nocardia* tienen una distribución ambiental ubicua aunque su diversidad natural ha sido subestimada ya que la mayoría de las nuevas especies identificadas provienen de aislamientos clínicos asociados a patologías humanas o animales (McNeil & Brown, 1994). Numerosas especies de *Nocardia* forman parte de la microflora terrestre y juegan un rol importante en la conversión de materia orgánica, habiendo incluso algunas cepas con

capacidad de producir metabolitos secundarios de potencial interés industrial (Li y col., 2004; Zhang y col., 2004).

Los miembros del género *Rhodococcus* también se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes naturales como suelo, agua y sedimentos marinos (Martinkova y col., 2009) así como asociados a infecciones, en particular, cepas de *Rhodococcus equi* (Yamshchikov y col., 2010). La frecuente ubicación geográfica en zonas áridas (desiertos) de las cepas ambientales refleja la adaptabilidad que poseen a condiciones de vida extremas (LeBlanc y col., 2008). Estos microorganismos han desarrollado estrategias metabólicas para sobrevivir en ambientes con limitaciones nutricionales. Una de estos mecanismos es la acumulación de compuestos de almacenamiento que pueden ser usados por las células como fuentes de carbono y dadores de electrones (Hernandez y col., 2008).

El género *Dietzia* es uno de los menos conocidos y estudiados como tal, ya que ha sido recientemente asignado, con el fin de identificar organismos previamente clasificados como *Rhodococcus maris* (Rainey y col., 1995). Si bien hay representantes de este género distribuidos en ambientes marinos, terrestres y hospitalarios (Colquhoun y col., 1998; Yassin y col., 2006), en muchos casos se han presentado problemas de ubicación taxonómica siendo identificados erróneamente como pertenecientes al grupo de *Rhodococcus* sp (Koerner y col., 2009; Pilares y col., 2010). Las técnicas bioquímicas de identificación usadas comúnmente en los laboratorios de microbiología no serían suficientes para diferenciar el género *Dietzia* de *Rhodococcus*, haciendo necesaria la secuenciación del rADN 16S y su comparación con bases de datos para la correcta ubicación filogenética (Pilares y col., 2010).

A continuación se presentan las primeras determinaciones de enzimas detoxificadoras de EROs en estas especies, así como de ensayos de tolerancia a agentes pro-oxidantes y a radiación UV.

Actividad de enzimas antioxidantes

Se crecieron cultivos hasta fase exponencial ($DO_{436} \sim 2,0$ para A5 y A12, $DO_{436} \sim 4.5$ para CH13) y se obtuvieron extractos solubles como se describe en *Materiales y Métodos*. A continuación realizamos geles de poliacrilamida no desnaturalizantes sembrando los extractos solubles a máximo volumen para potenciar la visualización de las bandas. Mediante tinción *in situ* de actividad SOD se determinó que los tres aislamientos poseen una única banda con esta actividad (Figura 30). El aislamiento A12 mostró un bandeo difuso que sugiere daños en la integridad de la enzima o alteraciones en la electroforesis por presencia de material interferente en el extracto crudo. El perfil de inhibición (no mostrado) reveló que las tres cepas contienen SODs de tipo Mn. Se realizaron además, medidas espectrofotométricas de actividad utilizando el método indirecto de la inhibición de la reducción de citocromo c por xantina/xantina oxidasa (McCord & Fridovich, 1969). Como se observa en la Tabla 8, los niveles de actividad específica SOD son similares entre los tres aislamientos siendo CH13 la que mostró el valor más alto (Tabla 8).

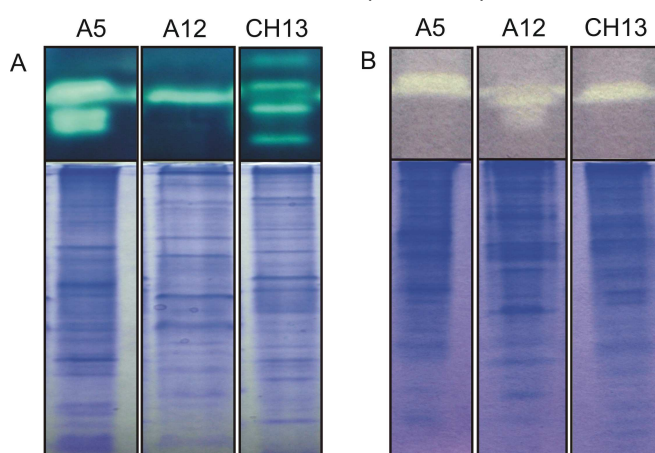


Figura 30: Geles nativos de actividad SOD y catalasa de los aislamientos A5, A12 y CH13

Se sembraron extractos crudos (máxima cantidad de proteína) de los tres aislamientos en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes y se revelaron para las actividades catalasa (panel A) y SOD (panel B) según protocolo descrito en *Mat & Mét*. Debajo se muestran los correspondientes geles teñidos con Azul de Coomassie.

El patrón electroforético de catalasa presentó mayor heterogeneidad, visualizándose en geles nativos diferente número de bandas entre las cepas analizadas (Figura 30). Midiendo el consumo de H_2O_2 a 240 nm se determinó que A12 presenta mayores niveles de actividad a pesar de poseer una única banda de catalasa (Tabla 8).

Tabla 8: Medidas espectrofotométricas de actividades SOD y catalasa

	Metal	SOD	Bandas	Catalasa
		Actividad específica (U/mg)		Actividad específica (U/mg)
A5	Mn	36	3	9
A12	Mn	29	1	30
CH13	Mn	51	4	18

Sensibilidad a agentes pro-oxidantes y a radiación UV-B

Se evaluó la respuesta a desafíos con agentes pro-oxidantes, MV y H₂O₂ así como a radiación UV-B (Figuras 32 y 31, respectivamente).

La tolerancia a radiación UV-B fue determinada en el laboratorio de la Dra. Farías (LIMLA – CONICET, Tucumán) por el Lic. Omar Ordoñez según protocolo establecido previamente (Fernandez Zenoff y col., 2006). Un volumen de 20 ml de cultivo fue crecido en medio LB hasta fase exponencial (DO₄₃₆ ~ 2,0 para A5 y A12, DO₄₃₆ ~ 4.5 para CH13) y transferidos a tubos de cuarzo. Los cultivos fueron expuestos a 4,0 – 5,0 W.m⁻² de radiación UV-B, tomándose tres alícuotas a tiempo 0, 60 y 120 minutos. Se realizaron diluciones seriadas por duplicado y se sembraron en placas de LB-agar para la cuantificación de las UFCs (Figura 31).

Como se observa en la Figura 31, el aislamiento A5 muestra la mayor tolerancia a radiación UV presentando un patrón de disminución de la sobrevivencia a los 60 minutos post exposición y un incremento en el conteo celular a los 120 minutos de irradiación. Este fenómeno ya fue reportado para otras cepas aisladas de lagunas del Altiplano Andino (Fernandez Zenoff y col., 2006). Los aislamientos A12 y CH13 mostraron niveles de tolerancia menores comparados con A5, siendo CH13 la más sensible a la radiación UV.

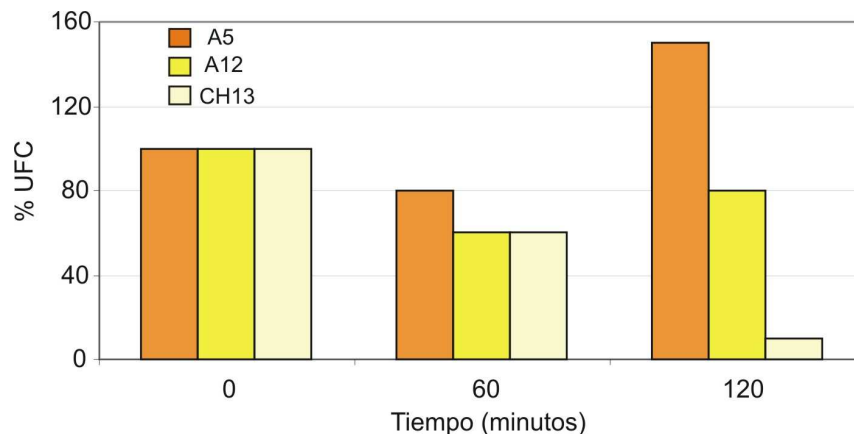


Figura 31: Sensibilidad a radiación UV-B de los aislamientos A5, A12 y CH13

La tolerancia a radiación UV-B fue evaluada exponiendo cultivos en fase exponencial durante un periodo total de 120 minutos. Las alícuotas tomadas a los tiempos indicados fueron sometidas a diluciones seriadas por duplicado y sembradas en placas de LB-agar para el conteo de las UFCs. En la figura se informa el porcentaje de UFCs. El error en todos los casos fue inferior al 10%.

Mediante ensayos de gota en placa, evaluamos la tolerancia a agentes pro-oxidantes, observando que la cepa A12 presenta la mayor resistencia al propagador de superóxido MV y una buena tolerancia a H_2O_2 , aunque el aislamiento CH13 es el más resistente al peróxido (Figura 32).

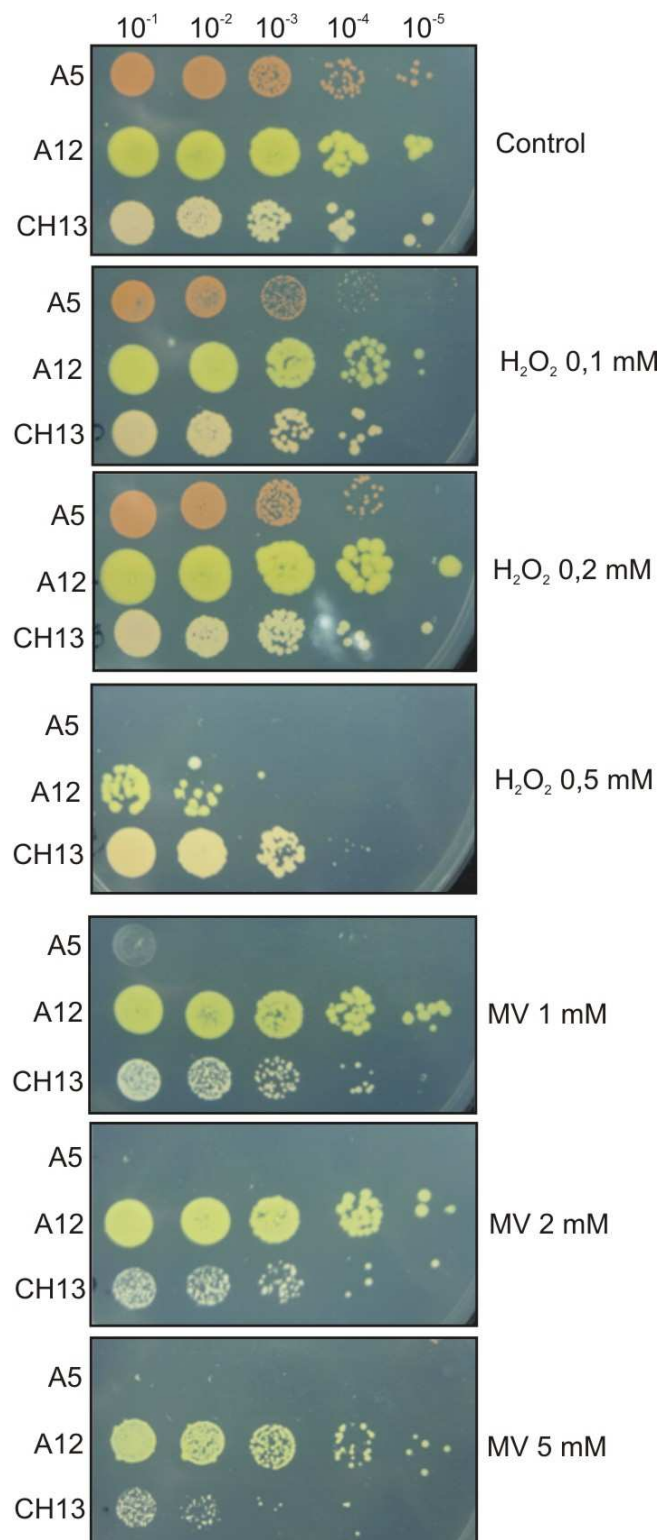


Figura 32: Sensibilidad de los aislamientos A5, A12 y CH13 frente a agentes pro-oxidantes

Se sembraron alícuotas de 10 µl de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial sobre placas de NB-agar suplementadas como se indica en la figura con H₂O₂ (0,1; 0,2 y 0,5 mM) o MV (0,5 mM). Las diluciones sembradas se indican en la parte superior de la figura. Contrariamente al comportamiento observado para los aislamientos del género

Acinetobacter y para la bacteria fototrófica A80, no encontramos una correlación entre la tolerancia a radiación UV-B y la defensa antioxidante en las tres cepas Gram positivas estudiadas. Asimismo, no se halló una relación directa entre la respuesta a agentes pro-oxidantes y los niveles medidos de enzimas detoxificadoras. Estos resultados indican que existen otros mecanismos de tolerancia en estos aislamientos no evaluados en este trabajo.

Discusión

En este capítulo de la tesis se estudió la respuesta antioxidante bacteriana y su relación con la tolerancia a radiación UV. Para ello hemos analizado el comportamiento de los aislamientos altoandinos seleccionados luego de su exposición a agentes pro-oxidantes y a UV-B, además de evaluar las actividades detoxificadoras SOD y catalasa.

Entre las cepas estudiadas se incluyen representantes de bacterias Gram positivas del filo *Actinobacteria* y Gram negativas del género *Acinetobacter*, así como el único aislamiento de una bacteria fotosintética de estos ambientes. En la Figura 33, se muestra la ubicación taxonómica de los aislamientos estudiados para una mayor comprensión de su distribución.

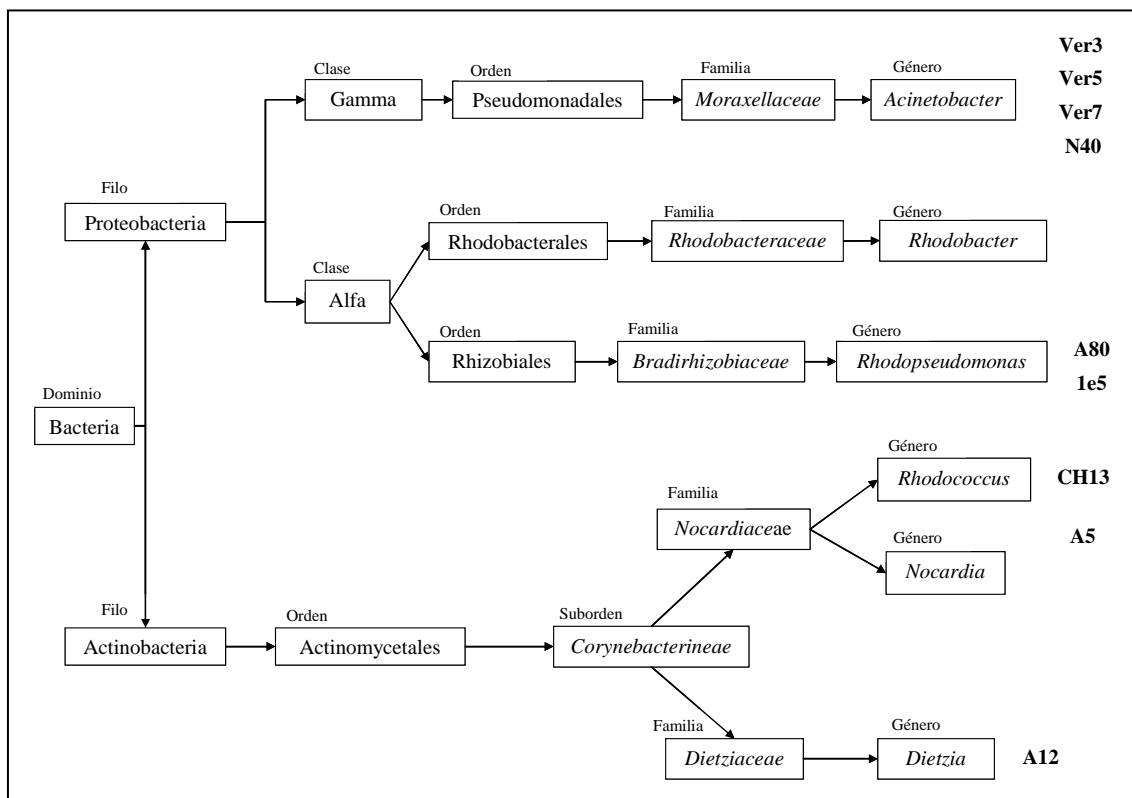


Figura 33: Ubicación taxonómica de las cepas estudiadas en este trabajo de tesis

Como se mencionó antes, la clasificación taxonómica es actualmente un tema en amplio debate. Los métodos bioquímicos tradicionales y la sola

secuenciación del rADN 16S no serían suficientes para la asignación de especie, sino que se requieren técnicas como la hibridación ADN-ADN o el análisis de secuencias de múltiples locus para obtener resultados coherentes y aceptables (Achtman & Wagner, 2008). No obstante, la comparación de fragmentos del rADN 16S con bases de datos disponibles resulta muy útil para la aproximación al género de un determinado aislamiento. Una limitación obvia de la metodología es el tamaño de los segmentos de ADN amplificados, ya que un fragmento de menos de 800 pb sólo permitirá una clasificación ambigua o incluso incorrecta debido a que el bajo número de posiciones comparadas no resulta en parámetros estadísticamente representativos. Este es el caso del aislamiento A5 que presentó un grado de homología similar con los géneros *Rhodococcus* y *Nocardia*. Para lograr una asignación correcta de este aislamiento, el L.I.M.L.A. sede del *Cepario de Extremófilos de la Puna* continúa desarrollando comparaciones de diversos fragmentos de ADN de manera de obtener una clasificación confiable de las cepas aisladas allí conservadas.

La bacteria fotosintética que logramos aislar presentó un 99,35 % de homología con el género *Rhodopseudomonas* y con cepas de *R. palustris* cuando se comparó la secuencia de 780 pb del rADN 16S con secuencias de la base de datos del *GenBank* (NCBI). Sin embargo, su asignación como *Rhodopseudomonas palustris* no posee soporte estadístico, ya que como se mencionó, la utilización exclusiva de este dato no es suficiente para la clasificación hasta la categoría “especie” de un nuevo aislamiento.

El cálculo del porcentaje de hibridación ADN-ADN es en la actualidad el método molecular más aceptado para la asignación de identidad de especie. Sin embargo, un análisis de este tipo se encuentra más allá de los objetivos de este trabajo. A fines comparativos, la cepa *R. palustris* 1e5 ha resultado útil como control en nuestros ensayos.

Mediante la comparación de secuencias del rADN 16S de cepas del género *Acinetobacter*, se construyó un árbol filogenético que permitió ubicar los aislamientos Ver3, Ver5, Ver7 y N40 en relación a otras cepas del mismo género (Figura 18). Ver5 y N40 agruparon claramente junto con otras cepas de la especie *A. Iwoffii*. Sin embargo, utilizando sólo el porcentaje de homología en el rADN 16S no es posible asignarlas como pertenecientes a esta especie. En cambio, Ver3 y Ver7 no agruparon con ninguna de las especies incluidas en la

comparación, solo presentaron alta homología (99,51%) entre ellas. Su comportamiento en las pruebas clásicas microbiológicas sugirió que pertenecerían al grupo *A. baumannii-calcoaceticus*. Teniendo en cuenta este resultado, la cepa *A. baumannii* DSM 30007 fue utilizada como control para estos dos aislamientos, aunque no encontramos evidencia suficiente para una asignación taxonómica inequívoca de las cepas Ver3 y Ver7.

Mediante ensayos de tolerancia en placa diseñados durante este trabajo, evaluamos la respuesta de los aislamientos a radiación UV-B y a agentes oxidantes. De acuerdo a nuestros resultados, los cuatro aislamientos del género ***Acinetobacter*** presentaron mayor resistencia a la exposición a UV-B que las cepas de colección usadas como control, aunque el comportamiento frente desafíos con agentes pro-oxidantes fue más diverso (Figura 21). Los aislamientos Ver3 y Ver7 mostraron una mayor tolerancia no sólo a UV-B sino también a H₂O₂ y MV (Figura 21).

Las medidas de actividad catalasa también evidenciaron diferencias entre las cepas estudiadas. Como se observa en la Figura 19, los aislamientos Ver3 y Ver7 mostraron una única banda correspondiente a niveles de actividad cinco a quince veces mayores a los de las cepas control, las cuales presentaron dos bandas luego de electroforesis en gel nativo. La ausencia de actividad catalasa detectable en *A. johnsonii* DSM 6963 es un hecho curioso ya que todas las cepas analizadas en las mismas condiciones han resultado en valores medibles con las técnicas utilizadas en nuestro laboratorio. Además, el género *Acinetobacter* ha sido descrito como catalasa-positivo por otros autores (Schreckenberger & von Graevenitz, 1999). Una posible explicación es que la catalasa de esta cepa corresponda a una proteína particularmente sensible o inestable, ya que fue la única catalasa no detectable entre los siete extractos crudos estudiados habiendo sido todos obtenidos utilizando el mismo protocolo de ruptura celular (ver *Materiales y Métodos*).

Para la actividad SOD visualizamos una única banda con patrón de inhibición compatible con una Fe-SOD en las siete cepas de *Acinetobacter* estudiadas presentando valores de actividades similares en las medidas espectrofotométricas (Figura 20).

Investigaciones previas han tratado de establecer una relación entre la respuesta a UV y las actividades enzimáticas antioxidantes de cepas bacterianas, arribando a conclusiones divergentes. Soung & Lee detectaron una actividad catalasa sorprendentemente alta en cepas radiorresistentes de *Deinococcus* sp. (Soung & Lee, 2000). Otro grupo de investigadores observó que la mutación insercional en el gen *katA* de *Deinococcus radiodurans* provocaba un incremento en la sensibilidad de esta bacteria a la radiación ionizante comparada con la cepa salvaje (Markillie y col., 1999). En contraste, las mutantes simples de *katE* y *katG* de *E. coli* experimentaron un decaimiento apenas significativo en su sobrevivencia luego de ser tratadas con radiación UV cercana, sugiriendo un rol menor para la catalasa en la protección a UV en enterobacterias (Eisenstark & Perrot, 1987).

Observaciones más concluyentes involucran la participación de la SOD en la defensa contra UV, ya que se determinó que la doble mutante de *E. coli* *sodA sodB* presentó un incremento notable en la sensibilidad a UV cercana comparado con la cepa salvaje (Knowles & Eisenstark, 1994).

Los aislamientos Ver3 y Ver7 que contienen la actividad catalasa más elevada entre las siete cepas estudiadas (Figura 20) presentaron a la vez una buena tolerancia a los agentes pro-oxidantes ensayados (Figura 21) y además la mayor resistencia a radiación UV (Figura 21). Basados en nuestros resultados, sugerimos la existencia de una correlación entre la alta actividad catalasa, la tolerancia a H₂O₂ y la resistencia a UV-B. En este sentido, observamos que la inhibición de la actividad catalasa utilizando AT provocó una marcada reducción de la tolerancia a radiación UV-B en el aislamiento Ver7 (Figura 24). En efecto, consideramos que la catalasa tiene un rol importante en la defensa contra UV aunque, tomando en cuenta la complejidad de la protección, esta enzima no debe ser el único actor en la respuesta. Se ha sugerido la participación de sistemas de reparación de ADN luz-dependientes como parte de la maquinaria de defensa contra radiación UV (Fernandez Zenoff y col., 2006). La presencia de una actividad fotoliasa capaz de reparar el daño al ADN provocado por la UV (Weber, 2005; Li y col., 2010), está siendo estudiada actualmente en aislamientos altoandinos (Albarracin & Farias, comunicación personal). Recientemente, se ha publicado que el gen de *phrA* que codifica

para una fotoliasa en *Rhodobacter sphaeroides* está positivamente regulado por señales de oxígeno singlete y por H₂O₂, involucrando un factor sigma E. A partir de estas observaciones se ha propuesto la existencia de una regulación coordinada entre los sistemas de defensa antioxidantes y la radiación UV (Hendrischk y col., 2007).

Cuando evaluamos el efecto de la exposición a pro-oxidantes y a UV sobre las enzimas antioxidantes, el aislamiento Ver7 y la cepa *A. baumannii* DSM 30007 mostraron respuestas diferentes a los desafíos (Figura 23), sugiriendo mecanismos regulatorios disímiles. La actividad catalasa aumentó un 100% en el aislamiento Ver7 luego de exponerla a tratamientos con MV y H₂O₂, mientras que *A. baumannii* DSM 30007 no mostró respuesta positiva en las mismas condiciones. Además, las enzimas antioxidantes de Ver7 parecieron ser menos sensibles a la exposición a UV-B que las de la cepa control (Figura 23), reforzando la idea de que las cepas del género *Acinetobacter* presentan estrategias diversas de defensa para hacer frente a los desafíos oxidantes y la radiación.

La respuesta de catalasa a H₂O₂ fue observada anteriormente en *E. coli* y se la ha asociado con el regulón OxyR. Este regulador se induce luego de la oxidación de OxyR mediada fundamentalmente por H₂O₂ (Loewen y col., 1985). Se han reportado homólogos de OxyR en numerosos géneros bacterianos como *Burkholderia* (Jangiam y col., 2010), *Neisseria* (Sainsbury y col., 2010), *Pseudomonas* (Heo y col., 2010), *Klebsiella* (Hennequin & Forestier, 2009), *Porphyromonas* (Wu y col., 2008) y *Rhodobacter* (Zeller y col., 2007), entre otros. OxyR es miembro de la familia de las proteínas LysR, detecta el contenido intracelular de H₂O₂ y se une al ADN en regiones promotoras específicas regulando el inicio de la transcripción de genes blanco (Storz y col., 1990).

De acuerdo a nuestros resultados, en el aislamiento Ver7 se observa un incremento en la actividad catalasa luego de la incubación con MV. Si bien, el principal activador del regulador OxyR y el más estudiado como tal es el H₂O₂, se han publicado trabajos en los cuales observaron que luego de la incubación con MV se produce un aumento del mARN de *oxyR* (Blanchard y col., 2007).

Hasta el momento, poco se conoce sobre el metabolismo y la respuesta adaptativa antioxidante en *A. baumannii*, con la excepción de un marco abierto de lectura que presenta homología con *oxyR* en la cepa *A. baumannii* sp. ADP1 (Geissdorfer y col., 1999).

El regulador más caracterizado de SODs es el sistema de dos componentes SoxRS que es fundamentalmente dependiente de superóxido (Blanchard y col., 2007). Sin embargo, según nuestras observaciones, no se detectó respuesta al MV y a H₂O₂ en las SODs de ninguna de las dos cepas (Ver7 y *A. baumannii* DSM 30007), lo cual sugiere una regulación independiente de SoxRS. Existen otros reguladores como Fur, que ha sido identificado como represor de la transcripción de genes involucrados en el importe de hierro cuando se asocia a Fe(II) (Escolar y col., 1999). En algunos trabajos, se ha observado que este regulador actuaría como represor anaeróbico del gen *sodA* que codifica para la Mn-SOD de *E. coli* (Hassan & Sun, 1992). Por otro lado, Fur ejercería un papel activador de la expresión de *sodB* (Fe-SOD) actuando tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Dubrac & Touati, 2002). Recientemente, se ha encontrado un homólogo del regulador Fur en la cepa de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T, cuya función en el metabolismo del hierro ha sido investigada aunque aún no se ha estudiado su implicancia en la regulación de SOD (Mihara y col., 2004).

Utilizando la secuencia actualmente disponible del genoma de *A. baumannii* ATCC 17978 (Smith y col., 2007), recientemente, se ha publicado un estudio proteómico que sugiere la presencia de una maquinaria antioxidante robusta en esta especie (Soares y col., 2010), aunque hasta el momento no se han reportado estudios funcionales.

Así como se encontró una correlación entre la resistencia a radiación UV y la defensa antioxidante para los aislamientos del género *Acinetobacter*, la **bacteria fotosintética** aislada **A80** mostró una tolerancia a H₂O₂ y a radiación UV-B superior a la cepa *R. palustris* 1e5, hallándose una relación entre ambos desafíos. Mediante la visualización *in situ* de la actividad SOD en geles nativos (Figura 24) observamos que existiría un incremento de esta actividad con la aireación del medio de cultivo, sugiriendo un mecanismo regulatorio de la

expresión de esta enzima dependiente de oxígeno como ha sido observado en la mayoría de las bacterias estudiadas incluyendo *E. coli* (Hassan & Fridovich, 1977) y *Rhodobacter capsulatus* (Tabares y col., 2003), entre otros.

Varias publicaciones describen estudios sobre la respuesta antioxidante en bacterias fototróficas como *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodobacter sphaeroides* (Hochman y col., 1992; Tabares y col., 2003), mientras que no se encuentra información hasta el momento sobre el rol de la defensa antioxidante en el género *Rhodopseudomonas*. Es por ello que nuestros resultados aportan los primeros datos sobre los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo y a la radiación UV en este género.

A diferencia del aislamiento A80, para las cepas del filo *Actinobacteria* no se observó un comportamiento lineal entre la tolerancia a agentes pro-oxidantes, radiación UV-B y niveles de enzimas detoxificadoras.

La ausencia de correlación entre la sensibilidad a peróxidos y los niveles de catalasa ya ha sido observada previamente en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, que pertenece al suborden *Corynebacteriaceae* (Jackett y col., 1978), al igual que los tres aislamientos altoandinos.

Es necesario tener en cuenta que la exposición a agentes oxidantes o a radiación UV-B puede inducir la expresión de genes antioxidantes que en condiciones basales presenten bajo nivel de expresión (Fuhrmann y col., 2002). La inducción de estos genes explicaría la mayor tolerancia a agentes oxidantes o a radiación UV-B que se observó en algunos casos en los que los niveles basales de SOD o catalasa son intermedios o bajos (Fuhrmann y col., 2002). Otro factor no despreciable es la permeabilidad de la membrana de bacterias Gram positivas a los agentes estudiados, ya que por su complejidad podría estar dificultando el acceso de los pro-oxidantes al interior celular.

Existen trabajos previos en cepas del género *Nocardia*, en los que se halló una correlación entre los niveles de actividades antioxidantes y la tolerancia a radiación UV y a agentes pro-oxidantes (Filice, 1983; Beaman y col., 1985). Basándonos en nuestros resultados no observamos esa relación. Un factor a tener en cuenta es la participación de los sistemas de reparación de ADN que, en este caso, como en otros, podrían influir de manera más contundente en la resistencia a la irradiación y a otros factores ambientales como la desecación

(Bohrerova & Linden, 2006; Crowley y col., 2006; LeBlanc y col., 2008). Por otro lado, la influencia de los pigmentos celulares de algunos aislamientos altoandinos en la resistencia a factores ambientales está actualmente en estudio. Recientemente, en el laboratorio de la Dra. Farías han detectado un incremento y acumulación de moléculas capaces de absorber en el UV-Vis luego de exposición a desafíos con UV en aislamientos de los géneros *Exiguobacterium*, *Sthenotrophomonas* y *Staphylococcus* (Fernandez Zenoff y col., 2006; Flores y col., 2009).

En este capítulo se sientan las bases para futuras investigaciones sobre las estrategias moleculares exhibidas por estos aislamientos para sobrevivir a las condiciones ambientales de las lagunas altoandinas. Los sistemas de defensa son diversos y complementarios entre sí, permitiendo a estos microorganismos adaptarse a situaciones de estrés ya sea bloqueando los agentes de daño o reparando los efectos nocivos cuando ya se produjeron. Esta intrincada red de mecanismos aún no ha sido develada en su totalidad. En este trabajo de tesis, se aportan los primeros resultados sobre la participación de la respuesta antioxidante en la tolerancia de los aislamientos altoandinos al extremo ambiente de la Puna.

Conclusiones generales

En este trabajo de tesis hemos abordado la investigación de la defensa antioxidante de bacterias utilizando dos sistemas de estudio diferentes:

- En primer lugar hemos analizado a nivel molecular algunos determinantes funcionales de la selectividad de metal de la superóxido dismutasa, la enzima detoxificadora que constituye la primer barrera antioxidante celular.
- Por otro lado, iniciamos la caracterización de la respuesta antioxidante de nuevos aislamientos bacterianos altoandinos y su probable participación en los en los mecanismos adaptativos a factores ambientales extremos, en particular la tolerancia a radiación UV-B.

De acuerdo a nuestras observaciones existen numerosos factores que intervienen en el proceso de incorporación del cofactor metálico y en la selectividad de metal de la RcSOD. La disponibilidad intracelular y el estado redox de los iones Fe y Mn influyen directamente en el contenido metálico de la holoenzima madura, tal como observamos en los ensayos de captura *in vivo* de la RcSOD recombinante.

Por otro lado hemos observado el efecto de aspectos estructurales de la proteína que también influyen en la capacidad de captura así como en la selectividad. Considerando que la apoproteína es capaz de conformar el sitio metálico aún en ausencia de éste, y así lo sugiere la existencia de una única conformación presente en geles nativos de RcSOD, hemos observado que la energización térmica *in vitro* favorece la captura y que la dependencia con la temperatura de la población de holoenzima muestra la similar temperatura de transición para la incorporación de cualquiera de los cofactores fisiológicos de RcSOD, Fe y Mn. Esta temperatura podría corresponder a la ruptura de las interacciones entre subunidades del dímero funcional, según se ha observado para la isoenzima MnSOD de *E. coli*.

La participación de uno o varios residuos protonables fue también puesta de manifiesto en nuestros ensayos variando el pH de captura *in vitro*. Si bien

tal(es) residuo(s) no ha(n) sido identificado(s) inequívocamente, es posible pensar en una o varias histidinas.

En la actualidad continuamos realizando ensayos para evaluar la influencia de estos factores y de otros aún no identificados en la selectividad de metal de la R_cSOD.

En el capítulo IV de esta tesis se presentaron los primeros estudios sobre la relación entre la defensa antioxidante y la resistencia a UV-B de aislamientos de lagunas del Altiplano Andino.

En los aislamientos del género *Acinetobacter* se detectó una actividad catalasa excepcionalmente alta para las cepas de colección del género. Esta actividad estaría asociada con la mayor tolerancia a radiación UV-B y a H₂O₂ observada en los aislamientos más resistentes a factores ambientales, en comparación con las cepas de colección usadas como control.

En este trabajo se describe además el primer aislamiento de una bacteria fototrófica de lagunas de la Puna correspondiente al género *Rhodopseudomonas*. Mediante ensayos de gota en placa establecidos en nuestro laboratorio se observó también una correlación entre la tolerancia a agentes pro-oxidantes y radiación UV-B en este nuevo aislamiento.

A diferencia de lo observado en las cepas Gram negativas, para los aislamientos Gram positivos del filo *Actinobacteria* A5, A12 y CH13 no fue manifiesta una correlación directa entre la capacidad antioxidante y la resistencia a radiación UV-B.

Basándonos en estas observaciones podemos concluir que los mecanismos de tolerancia a los factores ambientales extremos observados en los aislamientos estudiados son complejos y diversos dentro de la población bacteriana en estudio, mostrando que son múltiples los caminos evolutivos que permiten la sobrevivencia de estos microorganismos, con mayor o menor participación de la respuesta antioxidante celular.

Resumen

La defensa antioxidante es un tema en amplio estudio desde hace al menos 40 años. Se han investigado aspectos funcionales y regulatorios de los sistemas de defensa, así como se han caracterizado catalíticamente y estructuralmente las enzimas detoxificadoras. Sin embargo, existen aún numerosos interrogantes por resolver. En el presente trabajo de tesis, nos propusimos estudiar los determinantes funcionales de la selectividad y captura de metal de la superóxido dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*. De acuerdo a nuestros resultados algunos de los factores intervinientes son la disponibilidad de metal, la estabilidad de los complejos proteína-metal, los cambios conformacionales que sufre la apoproteína y la protonación de uno o varios residuos de histidina en el proceso de incorporación de metal.

Un segundo abordaje de este trabajo es el estudio de la participación de la defensa antioxidante en la tolerancia a radiación UV-B de aislamientos altoandinos. Hemos hallado que cepas del género *Acinetobacter* con alta actividad catalasa presentaron también una elevada tolerancia a radiación UV-B y H_2O_2 . Se realizó, además, el primer aislamiento de una bacteria fotosintética de lagunas del Altiplano del género *Rhodospseudomonas*. Esta cepa mostró mayor tolerancia a H_2O_2 y a radiación UV-B comparada con una cepa del mismo género utilizada como control. En cambio, esta correlación no se observó en aislamientos Gram positivos del filo *Actinobacteria* incluidos en este trabajo.

De acuerdo a nuestros resultados, la defensa antioxidante juega un rol importante en la tolerancia a radiación UV-B como se observó para los aislamientos del género *Acinetobacter* y para la bacteria fotosintética. Sin embargo, los mecanismos de protección de los microorganismos contra los factores ambientales de la Puna son diversos y complejos, no existiendo un único sistema de defensa sino más bien un conjunto de estrategias complementarias entre sí.

Bibliografía

- Abreu, I. A., A. Hearn, H. An, H. S. Nick, D. N. Silverman y D. E. Cabelli (2008). "The kinetic mechanism of manganese-containing superoxide dismutase from *Deinococcus radiodurans*: a specialized enzyme for the elimination of high superoxide concentrations." *Biochemistry* 47(8): 2350-2356.
- Achtman, M. y M. Wagner (2008). "Microbial diversity and the genetic nature of microbial species." *Nat Rev Microbiol* 6(6): 431-440.
- Adler, H. I., J. E. Ogg y M. R. Zelle (1956). "Protection of *Escherichia coli* against ultraviolet irradiation by catalase and related enzymes." *J Bacteriol* 72(4): 494-496.
- Aebi, H. (1984). "Catalase *in vitro*." *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- Beaman, B. L., C. M. Black, F. Doughty y L. Beaman (1985). "Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils." *Infect Immun* 47(1): 135-141.
- Beauchamp, C. y I. Fridovich (1971). "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels." *Anal Biochem* 44(1): 276-287.
- Benzie, I. F. (2000). "Evolution of antioxidant defence mechanisms." *Eur J Nutr* 39(2): 53-61.
- Beyer, W. F., Jr. y I. Fridovich (1991). "In vivo competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 266(1): 303-308.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto y H. J. Forman (2008). "Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling." *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1549-1564.
- Blanchard, J. L., W. Y. Wholey, E. M. Conlon y P. J. Pomposiello (2007). "Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks." *PLoS One* 2(11): e1186.
- Blankenship, R. E. (1992). "Origin and early evolution of photosynthesis." *Photosynth Res* 33: 91-111.

- Bohrerova, Z. y K. G. Linden (2006). "Assessment of DNA damage and repair in *Mycobacterium terrae* after exposure to UV irradiation." J Appl Microbiol 101(5): 995-1001.
- Bond, C. J., J. Huang, R. Hajduk, K. E. Flick, P. J. Heath y B. L. Stoddard (2000). "Cloning, sequence and crystallographic structure of recombinant iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56(Pt 11): 1359-1366.
- 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.
- Carlioz, A. y D. Touati (1986). "Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?" EMBO J 5(3): 623-630.
- Catala, A. (2006). "An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay." Int J Biochem Cell Biol 38(9): 1482-1495.
- Clark, J. B. (1952). "Catalase activity in *Escherichia coli*." J Bacteriol 64(4): 527-530.
- Colquhoun, J. A., S. C. Heald, L. Li, J. Tamaoka, C. Kato, K. Horikoshi y A. T. Bull (1998). "Taxonomy and biotransformation activities of some deep-sea actinomycetes." Extremophiles 2(3): 269-277.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu y J. Lunec (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." FASEB J 17(10): 1195-1214.
- Cortez, N., N. Carrillo, C. Pasternak, A. Balzer y G. Klug (1998). "Molecular cloning and expression analysis of the *Rhodobacter capsulatus sodB* gene, encoding an iron superoxide dismutase." J Bacteriol 180(20): 5413-5420.
- Crowley, D. J., I. Boubriak, B. R. Berquist, M. Clark, E. Richard, L. Sullivan, S. DasSarma y S. McCready (2006). "The *uvrA*, *uvrB* and *uvrC* genes are required for repair of ultraviolet light induced DNA photoproducts in *Halobacterium* sp. NRC-1." Saline Systems 2: 11.
- Culotta, V. C., M. Yang y T. V. O'Halloran (2006). "Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal." Biochim Biophys Acta 1763(7): 747-758.
- Chelikani, P., I. Fita y P. C. Loewen (2004). "Diversity of structures and properties among catalases." Cell Mol Life Sci 61(2): 192-208.
- Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." IUBMB Life 50(4-5): 279-289.

- Dijkshoorn, L., A. Nemec y H. Seifert (2007). "An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*." *Nat Rev Microbiol* 5(12): 939-951.
- Djaman, O., F. W. Outten y J. A. Imlay (2004). "Repair of oxidized iron-sulfur clusters in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 279(43): 44590-44599.
- Doi, Y., S. Husain, B. A. Potoski, K. R. McCurry y D. L. Paterson (2009). "Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*." *Emerg Infect Dis* 15(6): 980-982.
- Dubrac, S. y D. Touati (2002). "Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*." *Microbiology* 148(Pt 1): 147-156.
- Duthie, M. S., I. Kimber y M. Norval (1999). "The effects of ultraviolet radiation on the human immune system." *Br J Dermatol* 140(6): 995-1009.
- Eisenstark, A. y G. Perrot (1987). "Catalase has only a minor role in protection against near-ultraviolet radiation damage in bacteria." *Mol Gen Genet* 207(1): 68-72.
- Elsen, S., L. R. Swem, D. L. Swem y C. E. Bauer (2004). "RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 263-279.
- Escolar, L., J. Perez-Martin y V. de Lorenzo (1999). "Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein." *J Bacteriol* 181(20): 6223-6229.
- Fernandez Zenoff, V., F. Sineriz y M. E. Farias (2006). "Diverse responses to UV-B radiation and repair mechanisms of bacteria isolated from high-altitude aquatic environments." *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7857-7863.
- Filice, G. A. (1983). "Resistance of *Nocardia asteroides* to oxygen-dependent killing by neutrophils." *J Infect Dis* 148(5): 861-867.
- Flores, M. R., O. F. Ordoñez, M. J. Maldonado y M. E. Farias (2009). "Isolation of UV-B resistant bacteria from two high altitude Andean lakes (4,400 m) with saline and non saline conditions." *J Gen Appl Microbiol* 55(6): 447-458.
- Fridovich, I. (1998). "Oxygen toxicity: a radical explanation." *J Exp Biol* 201(Pt 8): 1203-1209.
- Fuhrmann, H., G. Dobeleit, S. Bellair y T. Guck (2002). "Cholesterol oxidase and resistance of *Rhodococcus equi* to peroxidative stress in vitro in the presence of cholesterol." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49(6): 310-311.
- Geissdorfer, W., R. G. Kok, A. Ratajczak, K. J. Hellingwerf y W. Hillen (1999). "The genes rubA and rubB for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain

ADP1 are in an operon with estB, encoding an esterase, and oxyR." J Bacteriol 181(14): 4292-4298.

- Gella, A. y N. Durany (2009). "Oxidative stress in Alzheimer disease." Cell Adh Migr 3(1): 88-93.

- Girlich, D., L. Poirel y P. Nordmann (2010). "First isolation of the blaOXA-23 carbapenemase gene from an environmental Acinetobacter baumannii isolate." Antimicrob Agents Chemother 54(1): 578-579.

- Hajna, A. A. (1945). "Triple-Sugar Iron Agar Medium for the Identification of the Intestinal Group of Bacteria." J Bacteriol 49(5): 516-517.

- Hassan, H. M. y I. Fridovich (1977). "Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen." J Biol Chem 252(21): 7667-7672.

- Hassan, H. M. y H. C. Sun (1992). "Regulatory roles of Fnr, Fur, and Arc in expression of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A 89(8): 3217-3221.

- Havir, E. A. (1992). "The in Vivo and in Vitro Inhibition of Catalase from Leaves of *Nicotiana sylvestris* by 3-Amino-1,2,4-Triazole." Plant Physiol 99(2): 533-537.

- He, Y. Y. y D. Hader (2002). "Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria." Photochem Photobiol Sci 1(10): 729-736.

- Hendrischk, A. K., S. Braatsch, J. Glaeser y G. Klug (2007). "The phrA gene of *Rhodobacter sphaeroides* encodes a photolyase and is regulated by singlet oxygen and peroxide in a sigma(E)-dependent manner." Microbiology 153(Pt 6): 1842-1851.

- Hennequin, C. y C. Forestier (2009). "oxyR, a LysR-type regulator involved in *Klebsiella pneumoniae* mucosal and abiotic colonization." Infect Immun 77(12): 5449-5457.

- Heo, Y. J., I. Y. Chung, W. J. Cho, B. Y. Lee, J. H. Kim, K. H. Choi, J. W. Lee, D. J. Hassett y Y. H. Cho (2010). "The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide." J Bacteriol 192(2): 381-390.

- Heritier, C., L. Poirel y P. Nordmann (2004). "Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from *Shewanella algae*." Antimicrob Agents Chemother 48(5): 1670-1675.

- Hernandez, M. A., W. W. Mohn, E. Martinez, E. Rost, A. F. Alvarez y H. M. Alvarez (2008). "Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii*

RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism." BMC Genomics 9: 600.

- Hewitt, J. y J. G. Morris (1975). "Superoxide dismutase in some obligately anaerobic bacteria." FEBS Lett 50(3): 315-318.

- Hochman, A., A. Figueredo y J. D. Wall (1992). "Physiological functions of hydroperoxidases in *Rhodobacter capsulatus*." J Bacteriol 174(10): 3386-3391.

- Hrimpeng, K., B. Prapagdee, P. Banjerdkiy, P. Vattanaviboon, J. M. Dubbs y S. Mongkolsuk (2006). "Challenging *Xanthomonas campestris* with low levels of arsenic mediates cross-protection against oxidant killing." FEMS Microbiol Lett 262(1): 121-127.

- Huang, A., M. Teplitski, B. Rathinasabapathi y L. Ma (2010). "Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*." Can J Microbiol 56(3): 236-246.

- Hussein, M. R. (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." J Cutan Pathol 32(3): 191-205.

- Im, Y. J., M. Ji, A. Lee, R. Killens, A. M. Grunden y W. F. Boss (2009). "Expression of *Pyrococcus furiosus* superoxide reductase in *Arabidopsis* enhances heat tolerance." Plant Physiol 151(2): 893-904.

- Imlay, J. A. (2003). "Pathways of oxidative damage." Annu Rev Microbiol 57: 395-418.

- Jackett, P. S., V. R. Aber y D. B. Lowrie (1978). "Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*." J Gen Microbiol 104(1): 37-45.

- Jackson, S. M. y J. B. Cooper (1998). "An analysis of structural similarity in the iron and manganese superoxide dismutases based on known structures and sequences." Biometals 11(2): 159-173.

- Jangiam, W., S. Loprasert, D. R. Smith y S. Tunpradabkul (2010). "*Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates OxyR and the *katG-dpsA* operon under conditions of oxidative stress." Microbiol Immunol 54(7): 389-397.

- Jenney, F. E., Jr., M. F. Verhagen, X. Cui y M. W. Adams (1999). "Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase." Science 286(5438): 306-309.

- Jung, J. Y., M. S. Park, S. E. Kim, B. H. Park, J. Y. Son, E. Y. Kim, J. E. Lim, S. K. Lee, S. H. Lee, K. J. Lee, Y. A. Kang, S. K. Kim, J. Chang y Y. S. Kim (2010). "Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit." BMC Infect Dis 10: 228.

- Keele, B. B., Jr., J. M. McCord y I. Fridovich (1970). "Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme." *J Biol Chem* 245(22): 6176-6181.
- Kehrer, J. P. (2000). "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." *Toxicology* 149(1): 43-50.
- Kim, D., K. S. Baik, M. S. Kim, S. C. Park, S. S. Kim, M. S. Rhee, Y. S. Kwak y C. N. Seong (2008). "*Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil." *J Microbiol* 46(4): 396-401.
- Kim, S. H., G. B. Cai, Y. A. Bae, E. G. Lee, Y. S. Lee y Y. Kong (2009). "Two novel phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase genes of *Paragonimus westermani* induced by oxidative stress." *Parasitology* 136(5): 553-565.
- Knowles, R. L. y A. Eisenstark (1994). "Near-ultraviolet mutagenesis in superoxide dismutase-deficient strains of *Escherichia coli*." *Environ Health Perspect* 102(1): 88-94.
- Koerner, R. J., M. Goodfellow y A. L. Jones (2009). "The genus *Dietzia*: a new home for some known and emerging opportunist pathogens." *FEMS Immunol Med Microbiol* 55(3): 296-305.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lantz, R. C. y A. M. Hays (2006). "Role of oxidative stress in arsenic-induced toxicity." *Drug Metab Rev* 38(4): 791-804.
- Larimer, F. W., P. Chain, L. Hauser, J. Lamerdin, S. Malfatti, L. Do, M. L. Land, D. A. Pelletier, J. T. Beatty, A. S. Lang, F. R. Tabita, J. L. Gibson, T. E. Hanson, C. Bobst, J. L. Torres, C. Peres, F. H. Harrison, J. Gibson y C. S. Harwood (2004). "Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*." *Nat Biotechnol* 22(1): 55-61.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Laval, J. (1996). "Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress." *Pathol Biol (Paris)* 44(1): 14-24.
- LeBlanc, J. C., E. R. Goncalves y W. W. Mohn (2008). "Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1." *Appl Environ Microbiol* 74(9): 2627-2636.

- Li, J., Z. Liu, C. Tan, X. Guo, L. Wang, A. Sancar y D. Zhong (2010). "Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6-4) photoproduct by photolyase." *Nature* 466(7308): 887-890.
- Li, K., E. Hartig y G. Klug (2003). "Thioredoxin 2 is involved in oxidative stress defence and redox-dependent expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter capsulatus*." *Microbiology* 149(Pt 2): 419-430.
- Li, W. J., Y. Jiang, R. M. Kroppenstedt, L. H. Xu y C. L. Jiang (2004). "*Nocardia alba* sp.nov., a novel actinomycete strain isolated from soil in China." *Syst Appl Microbiol* 27(3): 308-312.
- Liao, Y. J., L. Wen, J. F. Shaw y C. T. Lin (2007). "A highly stable cambialistic-superoxide dismutase from *Antrodia camphorata*: expression in yeast and enzyme properties." *J Biotechnol* 131(1): 84-91.
- Loew, O. (1900). "A New Enzyme of General Occurrence in Organisms." *Science* 11(279): 701-702.
- Loewen, P. C., J. Switala y B. L. Triggs-Raine (1985). "Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently." *Arch Biochem Biophys* 243(1): 144-149.
- Lombard, M., D. Touati, M. Fontecave y V. Niviere (2000). "Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*." *J Biol Chem* 275(35): 27021-27026.
- Ludwig, M. L., A. L. Metzger, K. A. Patridge y W. C. Stallings (1991). "Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution." *J Mol Biol* 219(2): 335-358.
- Luk, E., M. Yang, L. T. Jensen, Y. Bourbonnais y V. C. Culotta (2005). "Manganese activation of superoxide dismutase 2 in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 280(24): 22715-22720.
- Mann, T. y D. Keilin (1938). "Haemocuprein and Hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 126: 303-315.
- Marino, D., E. M. Gonzalez y C. Arrese-Igor (2006). "Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses." *J Exp Bot* 57(3): 665-673.
- Markillie, L. M., S. M. Varnum, P. Hradecky y K. K. Wong (1999). "Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants." *J Bacteriol* 181(2): 666-669.

- Martinez, C. A., M. E. Loureiro, M. A. Oliva y M. Maestri (2001). "Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress." *Plant Sci* 160(3): 505-515.
- Martinkova, L., B. Uhnakova, M. Patek, J. Nesvera y V. Kren (2009). "Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*." *Environ Int* 35(1): 162-177.
- McCord, J. M. y I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* 244(22): 6049-6055.
- McCord, J. M., B. B. Keele, Jr. y I. Fridovich (1971). "An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(5): 1024-1027.
- McNeil, M. M. y J. M. Brown (1994). "The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology." *Clin Microbiol Rev* 7(3): 357-417.
- Meier, B., C. Michel, M. Saran, J. Huttermann, F. Parak y G. Rotilio (1995). "Kinetic and spectroscopic studies on a superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* that is active with iron or manganese: pH-dependence." *Biochem J* 310 (Pt 3): 945-950.
- Mihara, K., T. Tanabe, Y. Yamakawa, T. Funahashi, H. Nakao, S. Narimatsu y S. Yamamoto (2004). "Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T." *Microbiology* 150(Pt 8): 2587-2597.
- Mizuno, K., M. M. Whittaker, H. P. Bachinger y J. W. Whittaker (2004). "Calorimetric studies on the tight binding metal interactions of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase." *J Biol Chem* 279(26): 27339-27344.
- Mulkidjanian, A. Y. y W. Junge (1999). *The Phototrophic Prokaryotes*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Mussi, M. A., A. S. Limansky y A. M. Viale (2005). "Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins." *Antimicrob Agents Chemother* 49(4): 1432-1440.
- Mussi, M. A., V. M. Relling, A. S. Limansky y A. M. Viale (2007). "CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake." *FEBS Lett* 581(29): 5573-5578.

- Nemec, A. y L. Dijkshoorn (2010). "Variations in colistin susceptibility among different species of the genus *Acinetobacter*." J Antimicrob Chemother 65(2): 367-369.
- Nigam, S. y T. Schewe (2000). "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation." Biochim Biophys Acta 1488(1-2): 167-181.
- Niviere, V. y M. Fontecave (2004). "Discovery of superoxide reductase: an historical perspective." J Biol Inorg Chem 9(2): 119-123.
- Niviere, V. y M. Lombard (2002). "Superoxide reductase from *Desulfoarculus baarsii*." Methods Enzymol 349: 123-129.
- Oda, Y., F. W. Larimer, P. S. Chain, S. Malfatti, M. V. Shin, L. M. Vergez, L. Hauser, M. L. Land, S. Braatsch, J. T. Beatty, D. A. Pelletier, A. L. Schaefer y C. S. Harwood (2008). "Multiple genome sequences reveal adaptations of a phototrophic bacterium to sediment microenvironments." Proc Natl Acad Sci U S A 105(47): 18543-18548.
- Ogawa, F., C. S. Sander, A. Hansel, W. Oehrl, H. Kasperczyk, P. Elsner, K. Shimizu, S. H. Heinemann y J. J. Thiele (2006). "The repair enzyme peptide methionine-S-sulfoxide reductase is expressed in human epidermis and upregulated by UVA radiation." J Invest Dermatol 126(5): 1128-1134.
- Ordoñez, O. F., M. R. Flores, J. R. Dib, A. Paz y M. E. Farias (2009). "Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation." Microb Ecol 58(3): 461-473.
- Ose, D. E. y I. Fridovich (1976). "Superoxide dismutase. Reversible removal of manganese and its substitution by cobalt, nickel or zinc." J Biol Chem 251(4): 1217-1218.
- Parker, M. W. y C. C. Blake (1988). "Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures." FEBS Lett 229(2): 377-382.
- Pattison, D. I. y M. J. Davies (2006). "Actions of ultraviolet light on cellular structures." EXS(96): 131-157.
- Pedersen, H. L., N. P. Willassen y I. Leiros (2009). "The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 65(Pt 2): 84-92.
- Petropoulos, I. y B. Friguet (2006). "Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair." Free Radic Res 40(12): 1269-1276.

- Pilares, L., J. Aguero, J. A. Vazquez-Boland, L. Martinez-Martinez y J. Navas (2010). "Identification of atypical *Rhodococcus*-like clinical isolates as *Dietzia* spp. by 16S rRNA gene sequencing." *J Clin Microbiol* 48(5): 1904-1907.
- Pugh, S. Y. y I. Fridovich (1985). "Induction of superoxide dismutases in *Escherichia coli* B by metal chelators." *J Bacteriol* 162(1): 196-202.
- Rainey, F. A., S. Klatte, R. M. Kroppenstedt y E. Stackebrandt (1995). "*Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*." *Int J Syst Bacteriol* 45(1): 32-36.
- Rey, F. E. y C. S. Harwood (2010). "FixK, a global regulator of microaerobic growth, controls photosynthesis in *Rhodospseudomonas palustris*." *Mol Microbiol* 75(4): 1007-1020.
- Rey, F. E., Y. Oda y C. S. Harwood (2006). "Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*." *J Bacteriol* 188(17): 6143-6152.
- Ringeling, P. L., S. L. Davy, F. A. Monkara, C. Hunt, D. P. Dickson, A. G. McEwan y G. R. Moore (1994). "Iron metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. Characterisation of bacterioferritin and formation of non-haem iron particles in intact cells." *Eur J Biochem* 223(3): 847-855.
- Rochette, P. J., J. P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E. A. Drobetsky y E. Sage (2003). "UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells." *Nucleic Acids Res* 31(11): 2786-2794.
- Romano, A. D., G. Serviddio, A. de Matthaëis, F. Bellanti y G. Vendemiale (2010). "Oxidative stress and aging." *J Nephrol* 23 Suppl 15: S29-36.
- Sainsbury, S., J. Ren, J. E. Nettleship, N. J. Saunders, D. I. Stuart y R. J. Owens (2010). "The structure of a reduced form of OxyR from *Neisseria meningitidis*." *BMC Struct Biol* 10: 10.
- Saitou, N. y M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.
- Sambrook, J., E. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular cloning a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Samuilov, V. D. (2005). "Energy problems in life evolution." *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 246-250.
- Sarkar, G. y S. S. Sommer (1990). "The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis." *Biotechniques* 8(4): 404-407.
- Scandalios, J. G. (1968). "Genetic control of multiple molecular forms of catalase in maize." *Ann N Y Acad Sci* 151(1): 274-293.

- Scheuring, S., R. P. Goncalves, V. Prima y J. N. Sturgis (2006). "The photosynthetic apparatus of *Rhodospseudomonas palustris*: structures and organization." *J Mol Biol* 358(1): 83-96.
- Schreckenberger, P. C. y A. von Graevenitz (1999). *Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium*, and other non-fermentative Gram negative rods. *Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, R. H. Tenover. Washington, D.C., ASM Press.
- Shiu, C. T. y T. M. Lee (2005). "Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*." *J Exp Bot* 56(421): 2851-2865.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* 82(2): 291-295.
- Smith, M. G., T. A. Gianoulis, S. Pukatzki, J. J. Mekalanos, L. N. Ornston, M. Gerstein y M. Snyder (2007). "New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis." *Genes Dev* 21(5): 601-614.
- Soares, N. C., M. P. Cabral, C. Gayoso, S. Mallo, P. Rodriguez-Velo, E. Fernandez-Moreira y G. Bou (2010). "Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress." *J Proteome Res* 9(4): 1951-1964.
- Soung, N.-K. y Y. N. Lee (2000). "Iso-catalase Profiles of *Deinococcus* spp." *J Biochem Mol Biol* 33(2).
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey y N. Ward-Rainey (1996). "Anoxygenic phototrophy across the phylogenetic spectrum: current understanding and future perspectives." *Arch Microbiol* 166(4): 211-223.
- Starke, D. W., Y. Chen, C. P. Bapna, E. J. Lesnefsky y J. J. Mielal (1997). "Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 23(3): 373-384.
- Storz, G., L. A. Tartaglia y B. N. Ames (1990). "The OxyR regulon." *Antonie Van Leeuwenhoek* 58(3): 157-161.
- Sullivan, D. R., J. Shields y G. Netzer (2010). "Fatal case of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* necrotizing fasciitis." *Am Surg* 76(6): 651-653.
- Svobodova, A., D. Walterova y J. Vostalova (2006). "Ultraviolet light induced alteration to the skin." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150(1): 25-38.

- Switala, J. y P. C. Loewen (2002). "Diversity of properties among catalases." Arch Biochem Biophys 401(2): 145-154.
- Tabares, L. C. (2006). La defensa antioxidante en bacterias fotosintéticas: Caracterización bioquímica y espectroscópica de la Superóxido Dismutasa de *Rhodobacter capsulatus*". Instituto de Biología Molecular de Rosario - Service de Bioénergetique, Centre d'Etudes de Sarclay. Rosario, Universidad Nacional de Rosario. PhD: 180.
- Tabares, L. C., C. Bittel, N. Carrillo, A. Bortolotti y N. Cortez (2003). "The single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus* is a cambialistic, manganese-containing enzyme." J Bacteriol 185(10): 3223-3227.
- Tabares, L. C., N. Cortez, I. Agalidis y S. Un (2005). "Temperature-dependent coordination in *E. coli* manganese superoxide dismutase." J Am Chem Soc 127(16): 6039-6047.
- Tabares, L. C., N. Cortez, B. Y. Hiraoka, F. Yamakura y S. Un (2006). "Effects of substrate analogues and pH on manganese superoxide dismutases." Biochemistry 45(6): 1919-1929.
- Tabares, L. C., N. Cortez y S. Un (2007). "Role of tyrosine-34 in the anion binding equilibria in manganese(II) superoxide dismutases." Biochemistry 46(32): 9320-9327.
- Takeuchi, H. y R. Takahashi (2007). "[Pathogenesis of Parkinson disease]." Nippon Ronen Igakkai Zasshi 44(4): 415-421.
- Todorovic, S., M. C. Justino, G. Wellenreuther, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, W. Meyer-Klaucke y L. M. Saraiva (2008). "Iron-sulfur repair YtfE protein from *Escherichia coli*: structural characterization of the di-iron center." J Biol Inorg Chem 13(5): 765-770.
- Touati, D. (2000). "Iron and oxidative stress in bacteria." Arch Biochem Biophys 373(1): 1-6.
- Valko, M., H. Morris y M. T. Cronin (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem 12(10): 1161-1208.
- Vanbroekhoven, K., A. Ryngaert, P. Wattiau, R. Mot y D. Springael (2004). "*Acinetobacter* diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting." FEMS Microbiol Ecol 50(1): 37-50.
- Varga, A. R. y L. A. Staehelin (1983). "Spatial differentiation in photosynthetic and non-photosynthetic membranes of *Rhodospseudomonas palustris*." J Bacteriol 154(3): 1414-1430.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G. F. Fitzgerald, K. F. Chater y D. van Sinderen (2007). "Genomics of *Actinobacteria*: tracing the

evolutionary history of an ancient phylum." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 495-548.

- Videla, L. A. y V. Fernandez (1988). "Biochemical aspects of cellular oxidative stress." *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 21(1): 85-92.

- Visconti, R. y D. Grieco (2009). "New insights on oxidative stress in cancer." *Curr Opin Drug Discov Devel* 12(2): 240-245.

- Weber, S. (2005). "Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase." *Biochim Biophys Acta* 1707(1): 1-23.

- Weckesser, J., H. Mayer y I. Fromme (1973). "O-methyl sugars in lipopolysaccharides of *Rhodospirillaceae*. Identification of 3-O-methyl-D-mannose in *Rhodopseudomonas viridis* and of 4-O-methyl-D-xylose and 3-O-methyl-6-deoxy-D-talose in *Rhodopseudomonas palustris* respectively." *Biochem J* 135(2): 293-297.

- Whittaker, J. W. (2002). "Prokaryotic manganese superoxide dismutases." *Methods Enzymol* 349: 80-90.

- Whittaker, J. W. (2003). "The irony of manganese superoxide dismutase." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1318-1321.

- Whittaker, J. W. (2010). "Metal uptake by manganese superoxide dismutase." *Biochim Biophys Acta* 1804(2): 298-307.

- Whittaker, M. M., T. F. Lerch, O. Kirillova, M. S. Chapman y J. W. Whittaker (2011). "Subunit dissociation and metal binding by *Escherichia coli* apo-manganese superoxide dismutase." *Arch Biochem Biophys* 505(2): 213-225.

- Whittaker, M. M., K. Mizuno, H. P. Bachinger y J. W. Whittaker (2006). "Kinetic analysis of the metal binding mechanism of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase." *Biophys J* 90(2): 598-607.

- Whittaker, M. M. y J. W. Whittaker (1999). "Thermally triggered metal binding by recombinant *Thermus thermophilus* manganese superoxide dismutase, expressed as the apo-enzyme." *J Biol Chem* 274(49): 34751-34757.

- Whittaker, M. M. y J. W. Whittaker (2008). "Conformationally gated metal uptake by apomanganese superoxide dismutase." *Biochemistry* 47(44): 11625-11636.

- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology I*. John Wiley & Sons. Townsville, Australia. Unidad 2.4.

- Wu, J., X. Lin y H. Xie (2008). "OxyR is involved in coordinate regulation of expression of *fimA* and *sod* genes in *Porphyromonas gingivalis*." *FEMS Microbiol Lett* 282(2): 188-195.

- Yamshchikov, A. V., A. Schuetz y G. M. Lyon (2010). "*Rhodococcus equi* infection." *Lancet Infect Dis* 10(5): 350-359.
- Yassin, A. F., H. Hupfer y K. P. Schaal (2006). "*Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant." *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 3): 641-645.
- Youn, H. D., E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah y S. O. Kang (1996). "A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp." *Biochem J* 318 (Pt 3): 889-896.
- Zeller, T., M. A. Mraheil, O. V. Moskvina, K. Li, M. Gomelsky y G. Klug (2007). "Regulation of hydrogen peroxide-dependent gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*: regulatory functions of OxyR." *J Bacteriol* 189(10): 3784-3792.
- Zhang, J., Z. Liu y M. Goodfellow (2004). "*Nocardia xishanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil." *Int J Syst Evol Microbiol* 54(Pt 6): 2301-2305.