



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Estudio del efecto inhibitorio de algunos compuestos químicos en la actividad reductasa de flavoenzimas de organismos patógenos

Autor: Daniel Pérez Amigot

Directora: Marta Martínez Júlvez

Facultad de Ciencias / Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
2016/2017

Abstract

This work deals with the search for chemical compounds with inhibitory action on the activity of flavoenzymes from pathogenic microorganisms. It goes more deeply into the study of NADPH-flavodoxin reductase enzyme (*XacFPR*) which comes from the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

This bacterium is well known for causing the disease called citrus canker that affects a lot of plantations and crops all around the world, provoking necrosis and the premature fall of the fruits. Therefore, this infection entails large global economic losses and it's the reason why a useful bactericide is key to be developed. In order to achieve this objective *XacFPR* was chosen as a therapeutic target due to its implication in processes of photosynthesis and response to oxidative stress, and then it is essential for the pathogen survival.

Inhibitors D2, D5 and D10 were selected as the most competent ones among a variety of compounds derived from an inhibitor previously tested (compound C12 currently discontinued). Their values of IC50 were 25,4 , 17,2 and 174,7 μM and their inhibition rates were close to 100%.

Subsequently and due to its homology structure with *XacFPR*, kinetic experiments were carried out with *AnFNR*, the NADP⁺-ferredoxin reductase enzyme that is present in *Anabaena*. In conclusion only D5 inhibitor was proved to be practically harmless against to this FNR (IC50 value of 102,4 μM and 47,31% inhibition rate).

The following study of the type of inhibition revealed a possible non-competitive inhibition mechanism for the three mentioned compounds D2, D5 and D10 with values of k_i equal to 21,3 for D2, 8,3 and 74,1 μM for D2, D5 and D10, respectively.

Resumen

Este trabajo aborda la búsqueda de compuestos químicos con carácter inhibitorio de la actividad de flavoenzimas de microorganismos patógenos. Concretamente se centra en la búsqueda de inhibidores de la enzima NADPH-flavodoxina reductasa del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis pv citri* denominada *XacFPR*.

Esta bacteria es conocida por provocar la enfermedad denominada cancrrosis o cáncer de cítricos que afecta a múltiples plantaciones y cultivos alrededor del mundo provocando necrosis y la caída prematura de los frutos. Por tanto esta infección supone grandes pérdidas económicas a nivel global y resulta de vital importancia desarrollar un bactericida útil. Con el fin de lograr este objetivo se escogió como diana terapéutica la *XacFPR*, ya que interviene en procesos de fotosíntesis y respuesta a estrés oxidativo y por tanto resulta esencial para la supervivencia del patógeno.

De entre una serie de compuestos derivados de un inhibidor ensayado con anterioridad (compuesto C12 actualmente descatalogado), se seleccionaron los más competentes realizando medidas de actividad enzimática. Estos fueron D2, D5 Y D10 con valores de IC50 de 25,4 , 17,2 y 174,7 μM respectivamente y porcentajes de inhibición próximos al 100%.

Posteriormente y debido a su homología estructural con *XacFPR*, se elaboraron ensayos con *AnFNR*, la enzima ferredoxina NADP⁺-reductasa presente en la cianobacteria de *Anabaena*. Con lo que se pudo concluir que solo D5 resultó prácticamente inocuo frente a la FNR (IC50 de 102,4 μM y 47,31% de inhibición).

Un estudio posterior del tipo de inhibición reveló un posible mecanismo de inhibición no competitiva para los tres compuestos mencionados, con valores de k_I de 21,3 μM en el caso de D2, k_I de 8,3 μM para D5 y k_I de 74,1 μM para D10.

Índice

1. Introducción.	1
• 1.1 FNR: Ferredoxina NADP(H) reductasas.	1
• 1.2 <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i> .	4
• 1.3 <i>XacFPR</i> : Diana terapéutica para el desarrollo de fármacos.	6
• 1.4 Trabajo previo.	7
2. Objetivos y planteamiento.	8
3. Formación académica.	9
4. Metodología y reactivos.	10
• 4.1 Medidas de la actividad diaforasa con DCPIP.	10
• 4.2 Cálculo de IC50.	12
• 4.3 Estudio del tipo de inhibición.	12
5. Resultados y discusión.	15
• 5.1 Inhibición de la actividad enzimática.	15
○ 5.1.1. <i>XacFPR</i>	15
○ 5.1.2. <i>AnFNR</i>	16
• 5.2 Estudio del tipo de inhibición de D2, D5 y D10.	18
6. Conclusiones.	21
7. Referencias bibliográficas.	22
8. Anexos.	23

1. Introducción

1.1 FNR: Ferredoxina NADP(H) reductasas

Las ferredoxinas NADP(H) reductasas (FNR) son un tipo de flavoenzimas dependientes de FAD que catalizan la transferencia de electrones desde la ferredoxina (Fd) o flavodoxina (Fld) reducidas, ambas transportadores de un solo electrón, a NADP^+ en la cadena de transporte electrónica que tiene lugar en la fotosíntesis.^[1] También se puede dar la reacción inversa que provee de electrones a otra variedad de reacciones como la fijación de nitrógeno, asimilación de azufre y la biosíntesis de aminoácidos.

La reacción reversible catalizada por las FNR (Reacción 1) se muestra a continuación:



En el caso de organismos que presentan fotosíntesis oxigénica las FNR plastídicas catalizan la reacción en sentido de la reducción del NADP^+ .^[2]

Estas FNRs contienen como cofactor una molécula de FAD (dinucleótido de flavina y adenina) unida no covalentemente a la enzima, que participa en procesos de oxidación y reducción puesto que la molécula es capaz de estabilizar tres estados distintos de oxidación del anillo de isoloxacina que contiene en su estructura. Se puede encontrar en estado quinona (completamente oxidado), semiquinona (parcialmente reducido por un electrón) o hidroquinona (totalmente reducido por dos electrones).

La enzima bifuncional FAD sintetasa es la responsable de la síntesis de FAD en el caso de células procariontas a partir de riboflavina (vitamina B2). Sin embargo este proceso se lleva a cabo por dos enzimas independientes en el caso de células eucariotas.^[3]

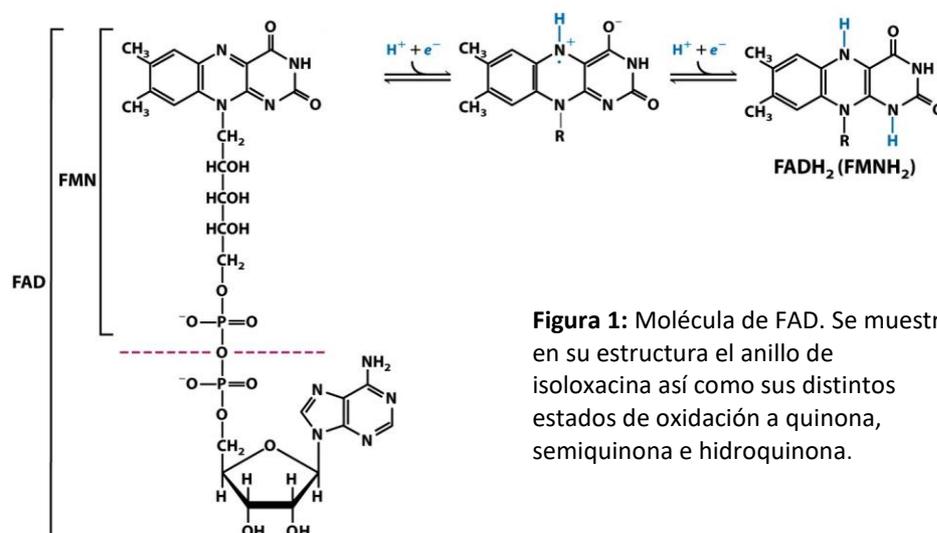


Figura 1: Molécula de FAD. Se muestra en su estructura el anillo de isoloxacina así como sus distintos estados de oxidación a quinona, semiquinona e hidroquinona.

Por otro lado el coenzima de estas FNRs es el NADP^+/H , sintetizado a partir de vitamina B3 o niacina, que puede estar presente tanto en su forma oxidada como en su forma reducida a través de un equilibrio de transferencia de un ion hidruro (equivalente a un H^+ y 2e^-). Este equilibrio se lleva a cabo gracias al anillo de nicotinamida que el NADP^+/H contiene en su estructura (figura 2). Está compuesta además por una adenosina, un grupo pirofosfato y una ribosa.

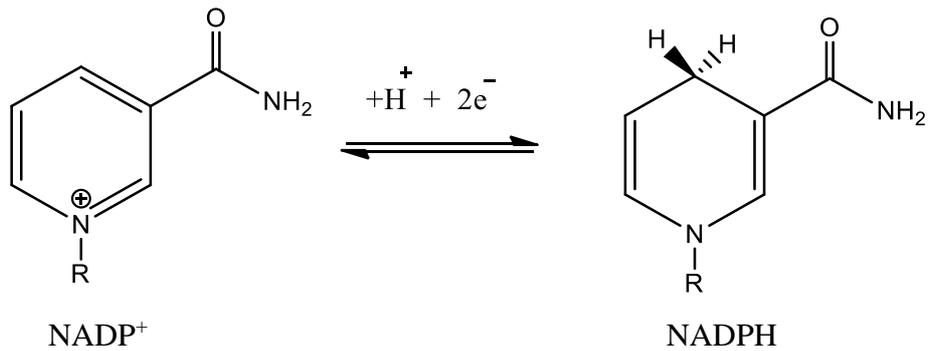


Figura 2: Equilibrio entre la forma oxidada y reducida del anillo de nicotinamida.

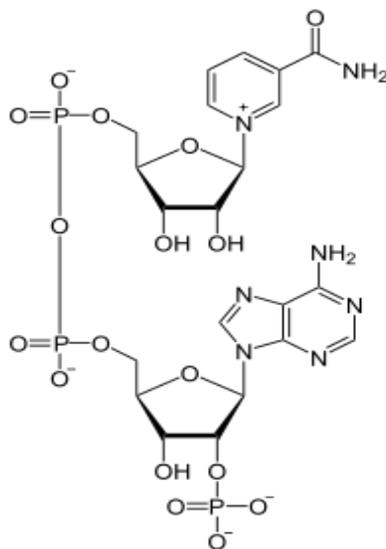


Figura 3: Estructura molecular del NADPH.

Las FNRs se clasifican en dos grandes grupos.

➤ FNRs tipo GR (glutación reductasa)

Estas enzimas catalizan la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido, el cual es utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se encuentran en mitocondrias de animales y levaduras al igual que en ciertas bacterias.

➤ FNRs tipo planta

Este grupo comprende a las enzimas oxidorreductasas que se encuentran tanto en cloroplastos (de plantas y algas), como cianobacterias y proteobacterias. A su vez las FNRs tipo planta se subdividen también en grupos: plastídicas y bacterianas.

Pese a su homología estructural, las FNRs plastídicas, presentan ciertas diferencias siendo las más destacadas el sitio de unión de la adenina del FAD (las bacterianas carecen del motivo de unión a adenosina); la propia unión del cofactor FAD en conformación extendida para el caso de las FNR plastídicas y en conformación plegada en las FNR bacterianas (denominadas FPR) y por último, la diferencia de longitud del extremo carboxilo terminal. [4]

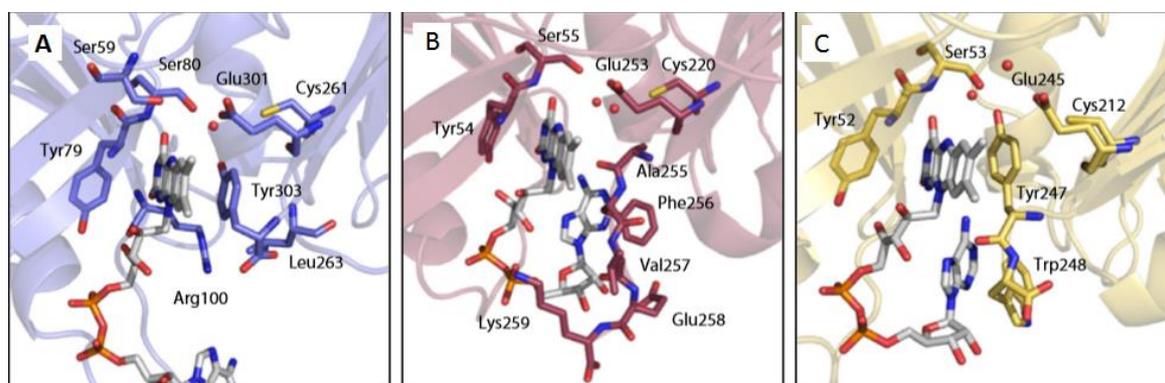


Figura 4: Entorno del FAD en la familia de las FNR para **(A)** FNR de *Anabaena* (*AnFNR*), **(B)** FPR de *Xanthomonas axonopodis pv citri* (*XacFPR*) y **(C)** FPR de *E. coli* (*EcFPR*).

Por otra parte también existe diferencia en la función que realizan en las células. Las FNRs catalizan la reducción del NADP^+ a NADPH (reacción 1) mientras que las FPRs realizan la reacción inversa oxidando NADPH. Difieren en su carácter reductor u oxidante.

Las FNR plastídicas en las plantas desempeñan un papel fundamental en su metabolismo puesto que intervienen en el proceso de fotosíntesis, concretamente en la fase lumínica en la que catalizan la última etapa de la transferencia de electrones entre dos moléculas de ferredoxina o flavodoxina y el NADP^+ , consiguiendo que éste se reduzca a NADPH. Este coenzima a su vez interviene más adelante en otras rutas metabólicas como puede ser el ciclo de Calvin, en el que se produce la fijación de CO_2 necesaria para la producción de hidratos de carbono en seres autótrofos. [5]

En bacterias, y como ya se menciona previamente, las FPRs catalizan la reacción contraria en la que dos electrones provenientes del NADPH reducen a la ferredoxina. Este proceso resulta también de vital importancia en las bacterias puesto que la ferredoxina, una vez reducida, tiene la capacidad de actuar en procesos de respuesta a estrés oxidativo, que normalmente es originado por las plantas como mecanismo de defensa contra bacterias patógenas como por ejemplo *Xanthomonas axonopodis pv citri*.

Otro tipo de bacterias aparte de *Xanthomonas* como pueden ser *E. Coli*, *Pseudomonas* o incluso aquellas capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica también contienen FPRs bacterianas, lo que les confiere resistencia a especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo). Sin embargo cuando estos microorganismos no se ven afectados por este fenómeno, las FPRs pueden participar en otra serie de procesos metabólicos como por ejemplo la fijación de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos.

1.2 *Xanthomonas axonopodis pv citri*

El fitopatógeno denominado *Xanthomonas axonopodis pv citri* (imagen 1) pertenece a la familia de las bacterias Gram negativas. Se incluye en el grupo de las γ -proteobacterias siendo aerobias estrictas, con forma de bacilos redondeados y poseen un flagelo polar monótrico o único. [6]

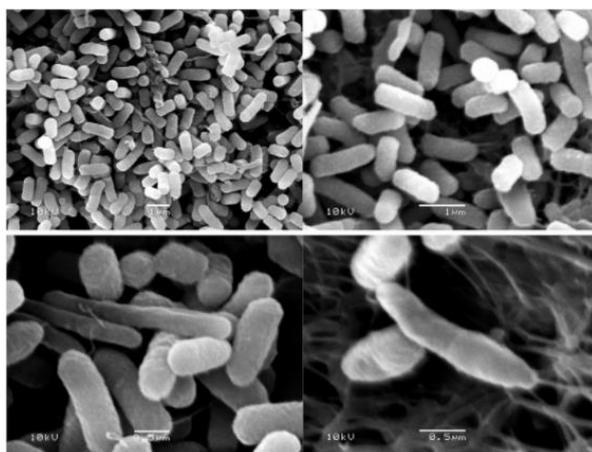


Imagen 1: Fitopatógeno de *Xanthomonas axonopodis pv citri*.

Esta bacteria es la responsable de producir la conocida enfermedad denominada cancrrosis o cáncer de cítricos (imagen 2). Afecta a una gran variedad de plantaciones y cultivos por todo el mundo ocasionando grandísimas pérdidas económicas y cuenta además con una alta diversidad patogénica. Es por ello que la mayoría de las bacterias del género *Xanthomonas* resultan ser patógenas para las plantas llegando a suponer una gran amenaza debido a su capacidad de alcanzar proporciones epidémicas.

El patógeno es capaz de infectar a través de los estomas o heridas tisulares de las plantas llegando a alcanzar el fruto. Produce lesiones en forma de manchas abultadas de color marrón y amarillo tanto en las hojas (aparecen agujeros y acaban desprendiéndose con el tiempo) como en el propio fruto, el cual comienza a mostrar síntomas de necrosis que produce la caída del fruto y una defoliación severa. Sin embargo y pese a la infección estos frutos no resultan perjudiciales para el ser humano. [7]



Imagen 2: Efectos del cáncer de cítricos provocado por *Xanthomonas axonopodis pv citri*.

El principal medio de propagación se da durante el transporte de los frutos, plantas o material que se haya expuesto a la infección. También los diversos fenómenos meteorológicos pueden contribuir a esto llegando incluso a asolar distintos lugares del mundo como Australia, Japón, África o el sureste asiático, zonas cálidas y húmedas que propician la extensión del patógeno. [8] La bacteria por otra parte es capaz de sobrevivir tanto en semillas como en restos orgánicos generando así una dificultad añadida a la hora de tratar este problema.

Actualmente no se ha desarrollado un método o bactericida efectivo contra este tipo de patógeno, por lo que el único tratamiento es la prevención mediante el control de técnicas biológicas y químicas o la erradicación de los brotes de *Xac* mediante quemado de los campos afectados. Es necesaria una investigación minuciosa dirigida al estudio del agente patógeno, de una diana terapéutica, de la susceptibilidad de las plantas y de los factores ambientales para lograr una solución a esta situación.

1.3 *XacFPR*: Diana terapéutica para el desarrollo de fármacos

La *XacFPR* es una FNR tipo planta bacteriana constituida por una cadena de 262 aminoácidos y con un peso molecular de 30 kDa. Su estructura consta de dos dominios, un dominio C terminal y un dominio N terminal. En este último se produce la unión al FAD, abarca los residuos 4-98 y se pliega en seis hebras β antiparalelas seguidas de una hélice α . El dominio C terminal abarca los aminoácidos 99-259 y está constituido por cinco hebras β paralelas rodeadas de nueve hélices α . [9]

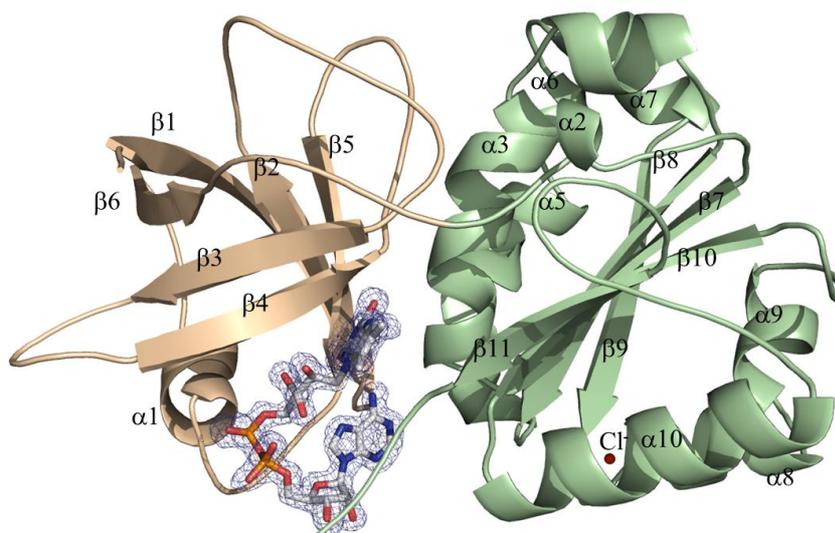


Figura 5: Estructura tridimensional de *XacFPR*. El dominio C terminal se muestra en dorado, el N terminal en verde y el FAD en varillas coloreadas. Código PDB: 4B4D.

La *XacFPR* ha demostrado ser una enzima crucial para la supervivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* puesto que está implicada en procesos de respuesta a estrés oxidativo, lo que la convierte en una importante diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos.

Para combatir un patógeno se debe inactivar (mediante la identificación y uso de compuestos químicos) alguna de sus enzimas esenciales que intervienen en rutas metabólicas o en funciones celulares sin afectar a las enzimas presentes en las plantas huésped.

Una vez seleccionada la diana el siguiente paso consiste en realizar una búsqueda de compuestos que muestren potencial inhibitorio para dicha diana, en nuestro caso *XacFPR*. Con ese fin se realizan estudios de actividad enzimática en presencia de dichos compuestos y una vez seleccionados los más efectivos, se presta atención a los diversos grupos funcionales que contienen y en general a su estructura para que en una segunda etapa de la investigación puedan ser optimizados. Para ello es necesario también conocer en profundidad la enzima que se pretende inhibir.

1.4 Trabajo previo

La actividad diaforasa de una enzima se define como la capacidad de catalizar la transferencia de electrones entre NADH o NADPH (NADPH en el caso de *XacFPR*) y diversos aceptores artificiales como el DCPIP (2, 6-diclorofenol-indofenol) que sustituye a la ferredoxina. Este aceptor en su forma oxidada presenta una coloración azul (máximo de absorción a 620 nm) que torna a incoloro una vez se ha reducido al recibir dos electrones provenientes del NADPH. La variación de absorbancia con el tiempo sirve para calcular la velocidad de la reacción.

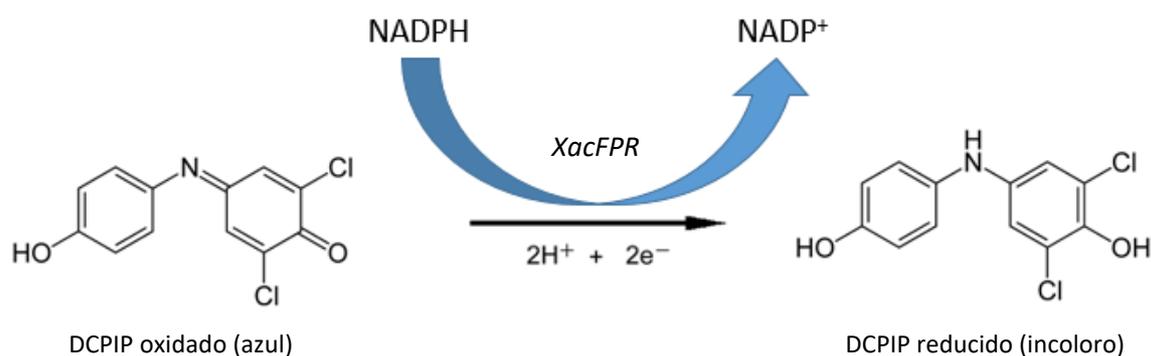


Figura 6: Estructura molecular del DCPIP en sus estados oxidado y reducido.

Previo a este trabajo se realizó un cribado de alto rendimiento de dos quimiotecas disponibles en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de las que se seleccionaron 43 compuestos que conseguían inhibir la enzima *XacFPR* y 35 de ellos se emplearon para experimentos *in vitro*. Se realizaron medidas de actividad diaforosa y se llevó a cabo un estudio más profundo del inhibidor denominado C12, que demostró poseer un alto potencial.

Se concluyó que C12 era el compuesto más efectivo por provocar hasta un 94,6 % de inhibición de la enzima con un tipo de inhibición reversible no competitiva en la que el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Sin embargo y, por desgracia, este inhibidor fue descatalogado por lo que en este trabajo se prosigue con una serie de derivados con el propósito de optimizar el compuesto C12.

2. Objetivos y planteamiento

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es estudiar compuestos que puedan inactivar a una flavoenzima (FPR) del fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis pv citri* (*XacFPR*).

La metodología utilizada será la medición de la actividad diaforasa de la enzima *XacFPR* en presencia varios compuestos con el fin de evaluar el efecto que éstos ejercen sobre la misma.

A partir del compuesto C12 identificado previamente en una quimioteca comercial, se continúa con algunos compuestos derivados del mismo y que denominamos: D2, D3, D5, D7, D9, D10, D12 y D13.

Los pasos que se siguen para alcanzar este objetivo son:

- *Realizar medidas cinéticas de XacFPR* con NADPH y con cada uno de los derivados de C12 e identificar los más efectivos, teniendo en cuenta sus valores de IC50 (dosis a la cual la actividad enzimática se reduce a la mitad) y porcentajes de inhibición.

- *Conocer el posible efecto inhibitorio* de los derivados de C12 sobre la enzima ferredoxina NADP⁺ reductasa de la cianobacteria *Anabaena* (*AnFNR*) que muestra homología estructural con la *XacFPR*, pero que pertenece a las FNRs tipo planta plástica. De esta manera se evalúan efectos no deseados sobre las plantas huésped.

- *Llevar a cabo la caracterización del tipo de inhibición* que presentan los compuestos seleccionados para conocer la naturaleza de su interacción con *XacFPR*.

3. Formación académica

Durante el transcurso de mi Trabajo de Fin de Grado he desarrollado y ampliado mis conocimientos en el campo de la investigación en un laboratorio de Bioquímica. Considero que estos aspectos son útiles para mi formación tanto para el grado como para estudios de postgrado.

Las competencias adquiridas pueden resumirse en:

- *Nuevos conocimientos en materia de Bioquímica*, más concretamente sobre estudios de actividad enzimática en presencia de compuestos con carácter inhibitorio así como la determinación del tipo de inhibición que presentan.

- *Conocimiento más exhaustivo del espectrofotómetro y de técnicas espectrofotométricas* en medidas de espectros de absorción molecular y cinéticas (variación de absorbancia respecto al tiempo).

- *Manejo más adecuado del material de laboratorio* como micropipetas y pipetas *Hamilton*.

- *Preparación de diversas disoluciones y muestras* a bajas concentraciones (del orden de mM y μ M).

- *Aumento de mis conocimientos en programas* como: *OriginPro 8.0* (tratamiento de datos cinéticos y realización de gráficas), *Kinetics* (para la obtención de datos cinéticos) y *Scan* (espectros de UV-Vis).

4. Metodología y reactivos

4.1 Medidas de la actividad diaforasa con DCPIP

Las medidas cinéticas en presencia de los distintos compuestos con carácter inhibitorio se realizan en el espectrofotómetro UV-Vis *Cary 100* con el programa *Kynetics* que mide la variación de absorbancia respecto al tiempo, más concretamente el descenso de la misma debida a la reducción del DCPIP a una longitud de onda fija de 620 nm ($\epsilon_{DCPIP,620nm} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante un intervalo de tiempo de 30 segundos. De esta manera tomando la pendiente inicial de la curva Abs vs tiempo se calcula la velocidad inicial de la reacción en las condiciones que se hayan establecido previamente en la cubeta.

En primer lugar, una vez estabilizada la lámpara del visible del espectrofotómetro, se prepara una cubeta de referencia con tampón y DCPIP. La medida de absorción de dicha mezcla se restará de los valores medidos en las cubetas que contienen las muestras.

En estos experimentos se emplea una disolución de DCPIP 0.19 mM, tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, NADPH 0.5 mM (preparada en Tris/HCl 50mM, pH 8,0), enzima *XacFRP* a una concentración 20µM (en Tris/HCl 50mM, pH 8,0 y NaCl 0.15M) y disoluciones a distintas concentraciones del compuesto a estudiar (preparadas en DMSO al 100%).

Tabla 1: Volúmenes de los reactivos en la mezcla de referencia y reacción expresados en µL para ajustes de Michaelis-Menten. Se alcanza una concentración final de enzima de 20 nM.

	DCPIP (0,19mM)	Tris/HCl (50 mM)	Compuesto (50 o 100 mM)	<i>XacFRP</i> (4 µM)	NADPH (0,5 mM)
<i>Referencia</i>	200	800	-	-	-
<i>Muestra</i>	500	495-(x+y)	y	5	x

A la hora de realizar las medidas de la actividad diaforasa de *XacFRP* se emplean diferentes concentraciones de NADPH 0,5 mM variando el volumen del mismo añadido en la mezcla de reacción y manteniendo fija la concentración de compuesto (tabla 1). De esta forma se obtienen distintos valores de velocidad inicial que se ajustan posteriormente a la función de Michaelis-Menten (Ecuación 1) donde K_M representa la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de su velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$).

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Tabla 2: Volúmenes de los reactivos en la mezcla de referencia y reacción expresados en μL para cálculos de IC50. Se alcanza una concentración final de enzima de 20 nM.

	DCPIP (0,19mM)	Tris/HCl (50 mM)	Compuesto (1-600 μM)	XacFPR (4 μM)	NADPH (0,5 mM)
<i>Referencia</i>	200	800	-	-	-
<i>Muestra</i>	500	375	20	5	100

Para el cálculo de los IC50 las medidas se llevaron a cabo a concentraciones fijas de NADPH y concentraciones variables de compuesto. El volumen empleado de cada compuesto en los experimentos fue de 20 μL tomados de diluciones previas adecuadas para alcanzar la concentración en el ensayo deseada y al mismo tiempo no superar el 2% de DMSO (tabla 2).

Tomando los volúmenes especificados en la tabla 2 de NADPH 0,5 mM y DCPIP 0,19 mM se consigue una concentración en cubeta de 50 μM y 95 μM respectivamente de estos reactivos, garantizando así que la enzima se encuentre en condiciones de saturación para cada uno de ellos. Las medidas de actividad se miden por triplicado a crecientes concentraciones de compuesto hasta llegar a una medida constante de actividad.

Los datos cinéticos obtenidos se importan al programa *Origin 8.0* y se procesan. La representación de la absorbancia frente al tiempo proporciona los valores de las pendientes de tramos iniciales de cada cinética con los que se calculan los valores de velocidad inicial v_0 .

Con los valores de v_0 obtenidos previamente se pueden calcular las $k_{cat}(s^{-1})$ o conocidas también como número de recambio, que es el equivalente al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo y a cargo de una molécula de enzima cuando se encuentra saturada de sustrato.

Para ello se hace uso de la siguiente ecuación (Ecuación 2) que relaciona la velocidad inicial v_0 (Abs/s), el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($\epsilon_{DCPIP,620nm}$) y la concentración de enzima *XacFPR* para cada una de las experiencias realizadas en el laboratorio.

$$k_{cat}(s^{-1}) = \frac{Abs/s}{\epsilon_{DCPIP}(mM^{-1}cm^{-1}) * [XacFPR]mM} \quad (\text{Ecuación 2})$$

4.2 Cálculo de los IC50

El IC50 es la concentración de compuesto que se necesita para lograr inhibir la actividad diaforasa de una enzima a la mitad del valor que presentaría en ausencia de dicho compuesto.

Debido a que varios de los compuestos presentan problemas de solubilidad a concentraciones elevadas y, en alguna de las experiencias cinéticas no se alcanza una actividad enzimática próxima a cero, se trabaja con valores de k^{app} en vez de k_{cat} . En estos casos se toma como IC50 la concentración necesaria para inhibir la actividad enzimática a la mitad del intervalo de inhibición del compuesto.

Para el cálculo de los IC50 se representan las k^{app} frente al logaritmo de la concentración de compuesto y se ajustan los datos utilizando la ecuación de farmacología conocida como Dosis-Respuesta (Ecuación 3).

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x_0 - x)p}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

En el eje “y” se representan las constantes catalíticas aparentes (k_{app}) y en el eje “x” el logaritmo decimal de la concentración de compuesto correspondiente a cada una de ellas. Para cada uno de los diferentes ensayos cinéticos A_1 hace referencia a los valores máximos de k_{app} a bajas concentraciones de inhibidor, A_2 a los valores mínimos de k_{app} a $IC_{m\acute{a}x}$ (actividad enzimática mínima) y p a la pendiente.

Por otro lado el valor de x_0 proporcionado por el programa nos permite calcular los IC50 (en unidades de μM) de forma directa realizando el inverso de su logaritmo decimal y, teniendo en cuenta A_2 se puede conocer el porcentaje de inhibición de los compuestos a $IC_{m\acute{a}x}$ comparando la actividad de la enzima a esas condiciones con la que ella misma presenta en ausencia de los compuestos con potencial inhibitorio.

4.3 Estudio del tipo de inhibición

En el caso de inhibición reversible existen tres mecanismos distintos por los cuales los compuestos pueden interaccionar con las enzimas: Inhibición competitiva, inhibición no competitiva e inhibición acompetitiva.

Cada uno de ellos se relaciona con una ecuación modificada de Michaelis-Menten (ecuación 1) donde K_M representa la constante de Michaelis-Menten y $v_{m\acute{a}x}$ la velocidad máxima. Para adaptar el tratamiento de Michaelis Menten a un ensayo con inhibición en la ecuación 1 se introduce un factor $\alpha = 1 + \frac{[I]}{k_I}$, el cual modifica el valor de $v_{m\acute{a}x}$ y/o K_M de diferente manera dependiendo del tipo de inhibición (Tabla Anexo 1).

El término $[I]$ hace alusión a la concentración de inhibidor ensayada y k_i a la constante de disociación entre el complejo enzima-inhibidor o el complejo enzima-sustrato-inhibidor (dependiendo del tipo concreto de inhibición).

Es por ello que valores bajos de esta constante indican una mayor inhibición y por tanto una menor actividad enzimática.

A continuación se enumeran y detallan las diferencias entre los tres mecanismos de inhibición reversible.

➤ Inhibición competitiva

El inhibidor es un análogo químico del propio sustrato y son mutuamente excluyentes puesto que ambos compiten por el centro activo de la enzima. El factor de inhibición α afecta únicamente a la K_M dejando invariable la $v_{m\acute{a}x}$, por ello se habla de K_M^{app} en vez de K_M ($K_M^{app} = K_M * \alpha$).

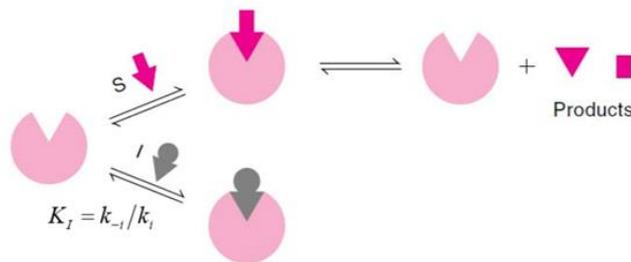


Figura 7: Esquema del tipo de inhibición competitiva. S representa el sustrato, I el inhibidor y k_i la constante de inhibición

➤ Inhibición no competitiva

El inhibidor se une en un lugar distinto al centro activo y puede interactuar tanto con la enzima como con el complejo enzima-sustrato. El factor de inhibición α produce variación exclusivamente en $v_{m\acute{a}x}$, por lo que se habla de $v_{m\acute{a}x}^{app}$ ($v_{m\acute{a}x}^{app} = v_{m\acute{a}x}/\alpha$).

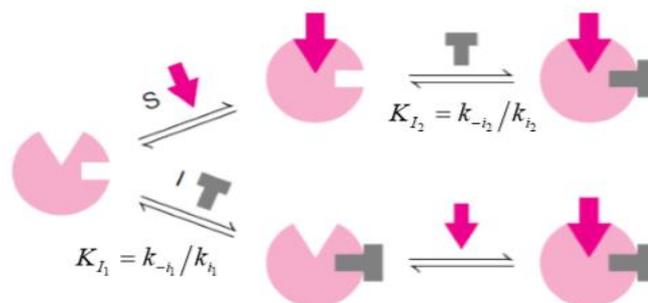


Figura 8: Esquema de inhibición no competitiva. S representa el sustrato, I el inhibidor y k_i la constante de inhibición.

El inhibidor se une solo al complejo enzima-sustrato y no compite con el sustrato por el centro activo. El factor de inhibición α modifica tanto la $v_{m\acute{a}x}$ ($v_{m\acute{a}x}^{app} = v_{m\acute{a}x}/\alpha$) como la K_M ($K_M^{app} = K_M * \alpha$).



Figura 9: Esquema del tipo de inhibición acompetitiva. S representa el sustrato I el inhibidor y k_i la constante de inhibición.

En presencia de distintas concentraciones de inhibidor se ensaya la actividad diaforasa de la enzima obteniéndose así distintas curvas ajustadas de Michaelis-Menten modificadas en las que se representan las k^{app} frente a concentraciones crecientes de NADPH. Las concentraciones que se emplean de inhibidor son distintas para cada uno de ellos.

A continuación se lleva a cabo un ajuste global de los datos experimentales, utilizando también el programa *OriginPro 8.0*, a las múltiples ecuaciones lineales que presenta la ecuación de Michaelis-Menten: Lineweaver-Burk (L-B), Eadie-Hofstee (E-H) y Hanes-Woolf (H-W). Todas estas linealizaciones se ven del mismo modo afectadas por el factor de inhibición α (Tabla Anexo 1).

5. Resultados y discusión

5.1 Inhibición de la actividad enzimática

5.1.1 *XacFPR*

Se escogieron algunos compuestos derivados del inhibidor C12 y denominados D2, D3, D5, D7, D9, D10, D12 y D13 y se calcularon sus valores de IC₅₀ empleando la ecuación Dosis-Respuesta (Ecuación 3) para estudiar su poder de inhibición de la actividad de *XacFPR*.

En la figura 10 se muestra los resultados de los compuestos probados (A) y también una comparativa de dos de ellos que muestran un comportamiento inhibitorio muy diferente (B).

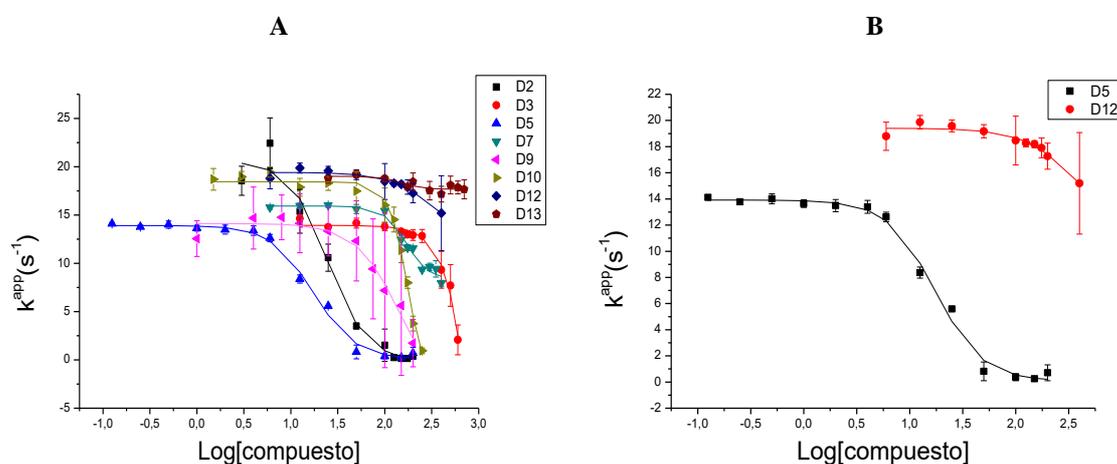


Figura 10: Curvas Dosis-Respuesta para cada uno de los inhibidores ensayados (A) y comparación entre dos compuestos con gran diferencia en poder inhibitorio, D5 y D12 (B).

Los valores de IC₅₀ de los compuestos así como su efecto inhibitorio (expresado como % de inhibición) y los valores de k^{app} a IC_{máx} (correspondientes a A2 de la Ecuación 2) se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3: Valores obtenidos de IC₅₀, k^{app} a IC_{máx} y porcentaje de inhibición obtenidos para cada uno de los compuestos ensayados sobre la enzima *XacFPR*.

	D2	D3	D5	D7	D9	D10	D12	D13
IC ₅₀ (μM)	25,4±1,1	94500	17,2±1,1	153,9±1,1	75,8±1,1	174,7±1,1	359,4±17,4	147,2±1,4
k^{app} IC _{máx} (s^{-1})	0,01±0,6	2,9±0,6	0,06±0,2	8,9±0,4	4,5±0,9	0±0,3	11,7±19	17,6±0,2
% Inhibición	99,51	78,97	99,54	44,02	64,15	100	39,72	7,55

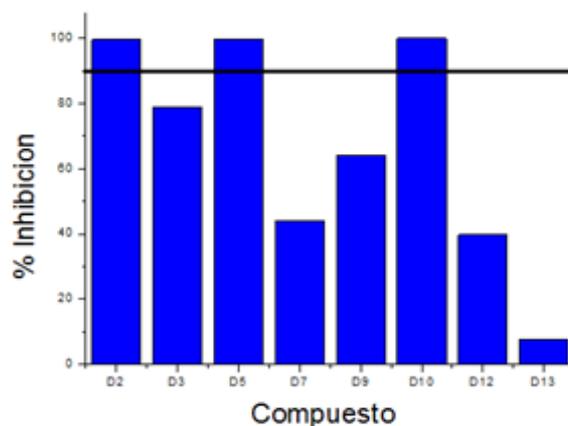


Figura 11: Porcentajes de inhibición de la actividad diaforasa de la *XacFPR* de cada compuesto. Se seleccionan aquellos que superan el 90% de inhibición (línea horizontal).

Solo tres de estos compuestos lograron inhibir la actividad de la enzima *XacFPR* por completo (D10) o casi por completo (D2, D5). Asimismo los IC50 de D2 y D5 presentaron los valores más pequeños de todos, lo que significa se necesita menos cantidad de los mismos para lograr el mismo efecto inhibitorio que D10.

El resto de compuestos (D3, D7, D9, D12 y D13), debido tanto a sus valores más elevados de IC50 como porcentajes bajos de inhibición que producen se descartaron. De esta manera los compuestos D2, D5 y D10 fueron seleccionados para estudiar el tipo de inhibición que producen en la actividad de la *XacFPR*.

5.1.2 *AnFNR*

Los compuestos D2, D5 y D10 se probaron en presencia de la enzima ferredoxina NADP⁺-reductasa de *Anabaena* (*AnFNR*). Esta enzima interviene en el proceso de fotosíntesis de la cianobacteria *Anabaena*. Presenta homología estructural y secuencial con la *XacFPR* por lo que cabría esperar que los dichos compuestos también pudieran interactuar con ella.

Además, como *AnFNR* es una FNR tipo planta plastídica las medidas cinéticas permiten conocer si la presencia de alguno de estos compuestos tiene la capacidad o no de afectar a la supervivencia de las plantas que estén infectadas con el patógeno de *Xanthomonas axonopodis pv citri* y que sean tratadas con alguno de ellos.

Para ello se realizaron estudios de actividad diaforasa en presencia de los compuestos siguiendo la misma metodología empleada para *XacFPR* y en las mismas condiciones, con una concentración final de *AnFNR* en la mezcla de reacción de 6 nM.

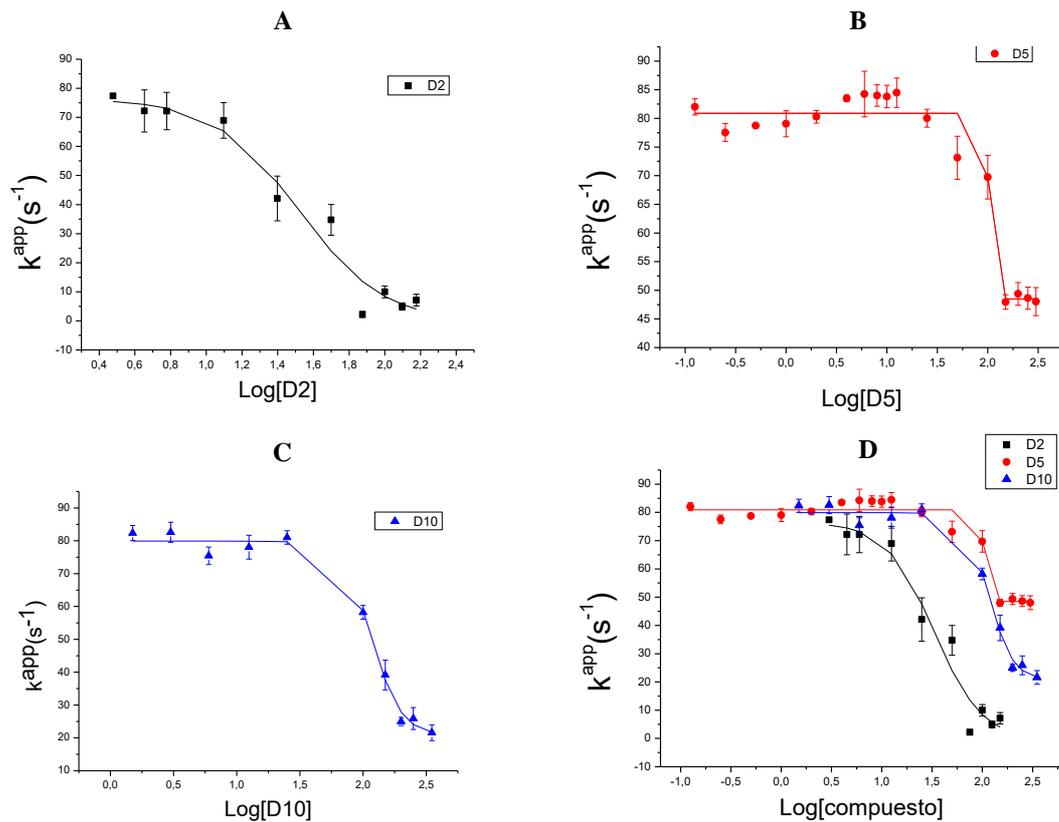


Figura 12: Ajustes de los datos cinéticos de la *AnFNR* a la ecuación Dosis-Respuesta del compuesto D2 (A), D5 (B) y D10 (C). La gráfica D muestra la superposición de los datos y ajustes de los tres compuestos.

Estos resultados muestran que tanto D2 como D10 inhiben la actividad de la *AnFNR* al 98,58 y 73,14 % respectivamente y que D5 la inhibe hasta un poco menos de la mitad (47,31 %) (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de IC_{50} , k^{app} a $IC_{m\acute{a}x}$ y porcentajes de inhibición de D2, D5 y D10 de la actividad diaforasa de *AnFNR*.

	D2	D5	D10
IC_{50} (μM)	26,89 \pm 1,2	102,4 \pm 1,1	122,4 \pm 1,1
k^{app} $IC_{m\acute{a}x}$ (s^{-1})	1,1 \pm 7,9	43,2 \pm 1,8	21,5 \pm 2,5
% Inhibición	98,58	47,31	73,14

De esta manera el compuesto D2 se comporta con *AnFNR* en términos de IC_{50} y % de inhibición de manera idéntica a como lo hace con *XacFPR*. En el caso de D10 este inhibe aproximadamente tres cuartas partes de la actividad enzimática y presenta un IC_{50} también muy similar al obtenido con *XacFPR*.

De esta manera el tratamiento de plantas afectadas por *Xanthomonas citri* con los compuestos D2 y D10 no parece compatible con la supervivencia de las mismas, puesto que a la hora de desarrollar un bactericida a partir de ellos éste podría actuar sobre las plantas de manera tan tóxica como sobre la bacteria de *Xanthomonas*.

Por el contrario el compuesto D5 resulta prometedor ya que no logra inhibir por completo la actividad de la enzima de *Anabaena* (solo un 47%) con un valor de IC50 aproximadamente seis veces superior al que presenta para *XacFPR*.

5.2 Estudio del tipo de inhibición de D2, D5 y D10

Se realizó un estudio del tipo de inhibición que presentan los compuestos D2, D5 y D10 con la enzima *XacFPR*.

Para cada uno se emplearon distintas concentraciones de los mismos y se realizó un estudio de la actividad diaforasa variando la concentración de NADPH. Los datos se ajustaron individualmente a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1) a cada concentración de compuesto.

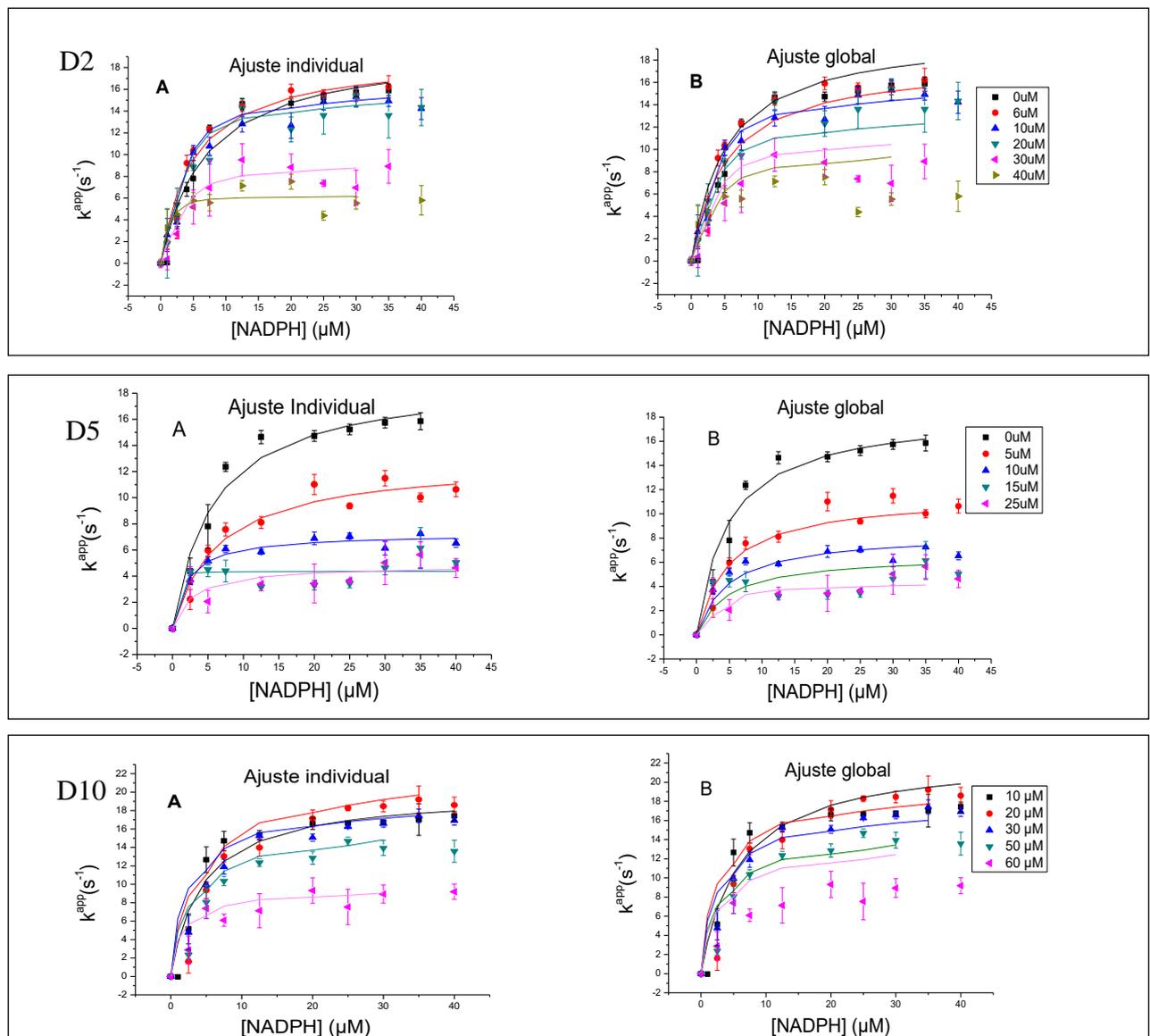


Figura 13: Ajustes individuales (A, C y E) y globales (B, D y F) de los datos cinéticos obtenidos con los compuestos D2, D5 y D10 a la ecuación Michaelis-Menten modificada para el tipo de inhibición no competitiva.

Estos ajustes individuales a la ecuación de Michaelis-Menten proporcionan valores de $v_{m\acute{a}x}$ y de K_M para cada una de las curvas. Los valores de dichos parámetros se recogen en la tabla 5.

Tablas 5: Valores obtenidos de k^{app} y de K_M a las distintas concentraciones ensayadas del compuesto D2, D5 y D10.

[D2] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$	[D5] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$	[D10] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$
0	19,9±1,5	6,9±1,6	0	19,1±1,2	5,8±1,3	10	20,0±1,4	4,5±1,3
6	19,1±1,0	5,0±0,9	5	12,8±0,9	6,5±1,7	20	24,0±2,0	8,8±2,3
10	17,1±0,9	4,9±1,0	10	7,2±0,3	2,1±0,4	30	19,8±0,7	5,4±0,8
20	16,5±0,9	4,7±1,0	15	4,4±0,4	0,1±0,7	50	17,2±1,4	6,6±1,8
30	9,9±1,1	4,5±2,0	25	4,8±0,6	2,8±2,1	60	9,9±0,8	3,8±1,4
40	6,3±0,5	0,8±0,5						

A partir de los datos de la tabla 5 los valores de k^{app} van disminuyendo conforme aumenta la concentración de cualquiera de los tres compuestos, mientras que los valores de K_M permanecen prácticamente inalterados (los valores obtenidos a mayores concentraciones de compuesto presentan menores K_M debido a un ajuste peor de los datos cinéticos). Todo ello indica que podría tratarse de un mecanismo de tipo no competitivo.

Se realizó también un ajuste global a las ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten así como a las ecuaciones de L-B, H-W y E-H para D2, D5 y D10 (Figuras de anexos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9). Según los valores de los coeficientes de correlación (R^2) mostrados en la (tabla 6) el mecanismo de inhibición al que mejor se ajustan los datos cinéticos y por tanto el más probable es el de tipo no competitivo.

Tabla 6: Coeficientes de correlación R^2 de los ajustes globales a las ecuaciones de Michaelis-Menten, L-B, E-H y H-W modificadas para los compuestos D2, D5 y D10.

D2	M-M	L-B	H-W	E-H
<i>Competitiva</i>	0,82	0,77	0,64	0,43
<i>No competitiva</i>	0,89	0,77	0,9	0,64
<i>Acompetitiva</i>	0,69	0,82	0,9	0

D5	M-M	L-B	H-W	E-H
<i>Competitiva</i>	0,34	0,45	0,74	0
<i>No competitiva</i>	0,94	0,65	0,73	0,60
<i>Acompetitiva</i>	0,83	0,68	0,72	0

D10	M-M	L-B	H-W	E-H
<i>Competitiva</i>	0,89	0,60	0,84	0
<i>No competitiva</i>	0,9	0,76	0,89	0,68
<i>Acompetitiva</i>	0,67	0,75	0,89	0,65

Estos ajustes globales proporcionan valores de k^{app} , K_M y k_I para cada compuesto (tabla 7).

Tabla 7: Parámetros obtenidos de los ajustes globales a Michaelis-Menten, L-B, H-W y E-H que mejor se adecuan a los datos cinéticos para tipo de inhibición no competitiva de D2, D5 y D10 con *XacFPR*.

	D2	D5	D10
$k^{app} (s^{-1})$	22,4±2,01	18,4±0,8	25,8±1,7
$K_M (\mu M)$	2,8±1,1	4,5±0,8	5,8±1,0
$k_I (\mu M)$	21,3±3,5	8,3±0,7	74,1±14,5

Los valores obtenidos para k^{app} y K_M al realizar los ajustes globales son para una concentración de compuesto igual a 0 μM . A concentraciones superiores de compuesto los valores de k^{app} , y por tanto el de $v_{m\acute{a}x}$, se verán afectados por el factor de inhibición α haciendo que disminuya los valores de estos parámetros cuanto mayor sea la concentración de inhibidor ($\alpha = 1 + \frac{[I]}{k_I}$).

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se puede sugerir que el tipo de inhibición más probable es el de tipo no competitivo para D2, D5 y D10. En este tipo de mecanismo existen dos valores diferentes de k_I , uno para la disociación del complejo enzima-inhibidor y otro para la disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor (figura 8). A la hora de proceder con los ajustes hemos supuesto que estos dos valores son iguales, lo que simplifica en gran medida los cálculos realizados eliminando un parámetro.

Estudios posteriores deberían calcular ambas constantes por separado a fin de justificar si la unión del sustrato a la enzima contribuye a la unión de la misma con los inhibidores o si por el contrario la dificulta. Además se debe continuar con estudios de compatibilidad de dichos compuestos con FNR tipo planta y en paralelo comprobar su efectividad en cultivos de *Xanthomonas in vitro* y posteriormente *in vivo*.

6. Conclusiones

- De ocho compuestos (D2, D3, D5, D7, D9, D10, D12 y D13) derivados del C12 (procedente de una quimioteca) se han seleccionado el D2, D5 y D10 por presentar un mayor porcentaje de inhibición (99,51 , 99,54 y 100 % respectivamente) de la actividad diaforasa de la enzima *XacFPR* y los valores de IC50 más bajos (25,4 y 17,2 μM para D2 y D5).
- El compuesto D5 compromete menos la supervivencia de la bacteria de *Anabaena* dado que su $\text{IC}_{\text{máx}}$ consigue inhibir la enzima *AnFNR* únicamente un 47,31% con un IC50 de 102,4 μM (aproximadamente seis veces más que el IC50 de este compuesto con *XacFPR*).
- Tanto los ajustes individuales como los ajustes globales realizados a las ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee confirman una inhibición reversible de carácter no competitivo para los tres compuestos D2, D5 y D10, con valores de k_i de 21,3 , 8,3 y 74,1 μM , respectivamente.

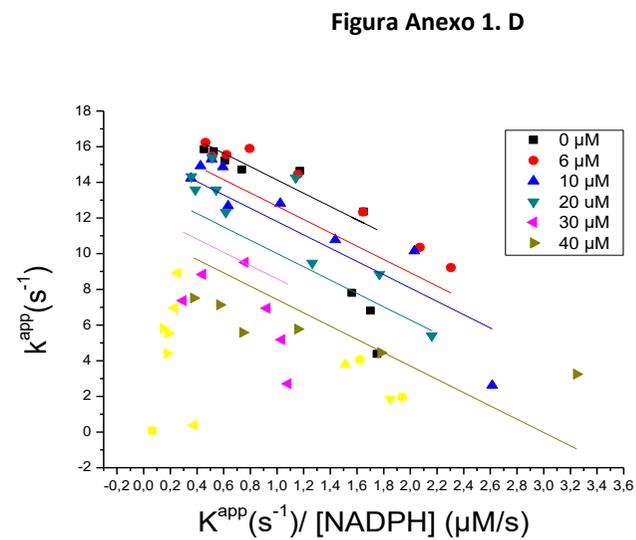
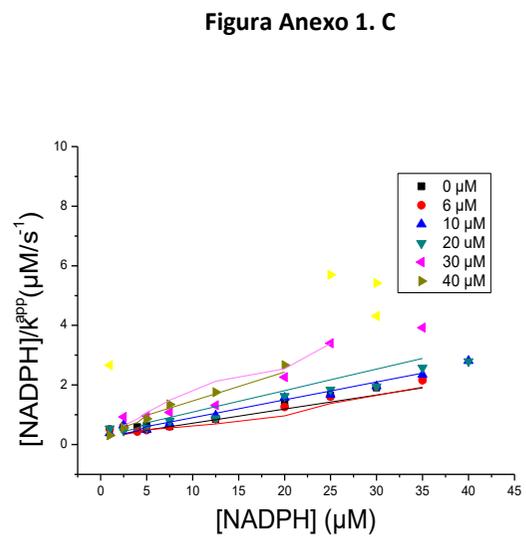
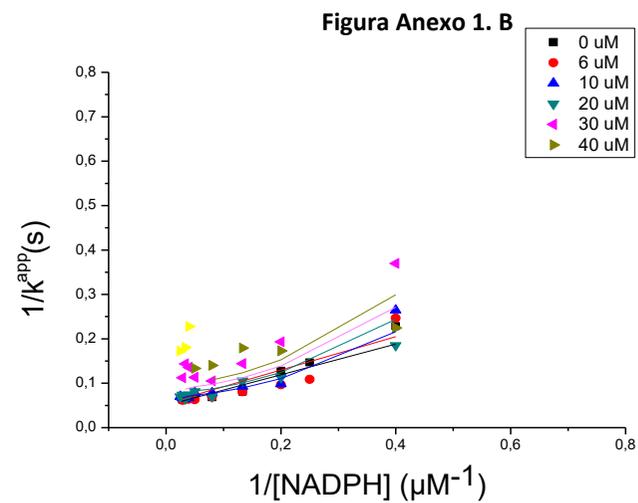
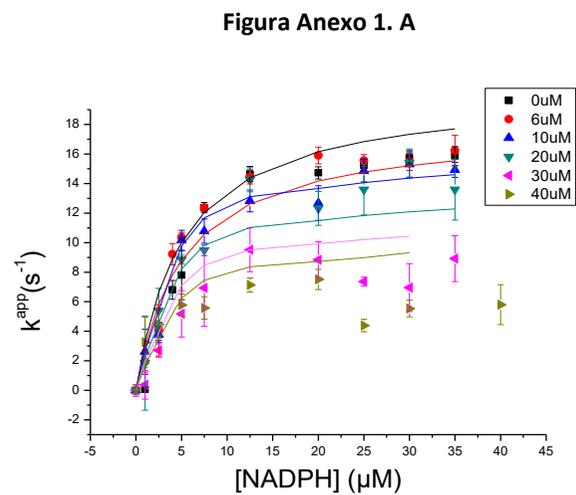
7. Referencias bibliográficas

- [1] Ana Sánchez Azqueta. "Mecanismos catalíticos en ferredoxina-NADP+ reductasas de tipo planta" 1316 (2013).
- [2] Bortolotti A., Sánchez-Azqueta A., Maya C.M., Velázquez-Campoy A., Hermoso J.A., Medina M. and Cortez N.. "The C-terminal extension of bacterial flavodoxin-reductases: Involvement in the hydride transfer mechanism from the coenzyme". *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1837, 33-43 (2014).
- [3] Fraaije, M. W. and Mattevi, A. "Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features." *Trends BiochemSci* 25(3): 126-32. (2000).
- [4] A. Sánchez-Azqueta, D.L. Catalano-Dupuy, A. López-Rivero, M.L. Tondo, E.G. Orellano, E.A. Ceccarelli and M.Medina "Dynamics of the active site architecture in plant-type ferredoxin-NADP+ reductases catalytic complexes". *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1837, 1730-1738 (2014).
- [5] Hald, S., Nandha, B., Gallois, P. and Johnson, G. N.. "Feedback regulation of photosynthetic electron transport by NADP(H) redox poise." *BiochimBiophysActa* 1777(5): 433-40 (2008).
- [6] Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS "Xanthomonasaxonopodispv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*" (2004).
- [7] Asha M. Brunings, Dean W. Gabriel, "Xanthomonascitri: breaking the surface", Blackwell Publishing Ltd., *Molecular Plant Pathology* 4(3), 141–157 (2003).
- [8] Gottwald T.R., Graham J.H., and T.S. Shubert. "Citrus canker: The pathogen and its impact". *Plant Health* (2002).
- [9] Forti, G. "Studies on NADPH-cytochrome f reductase of chloroplasts." *Brookhaven SympBiol* 19: 195201 (1966).

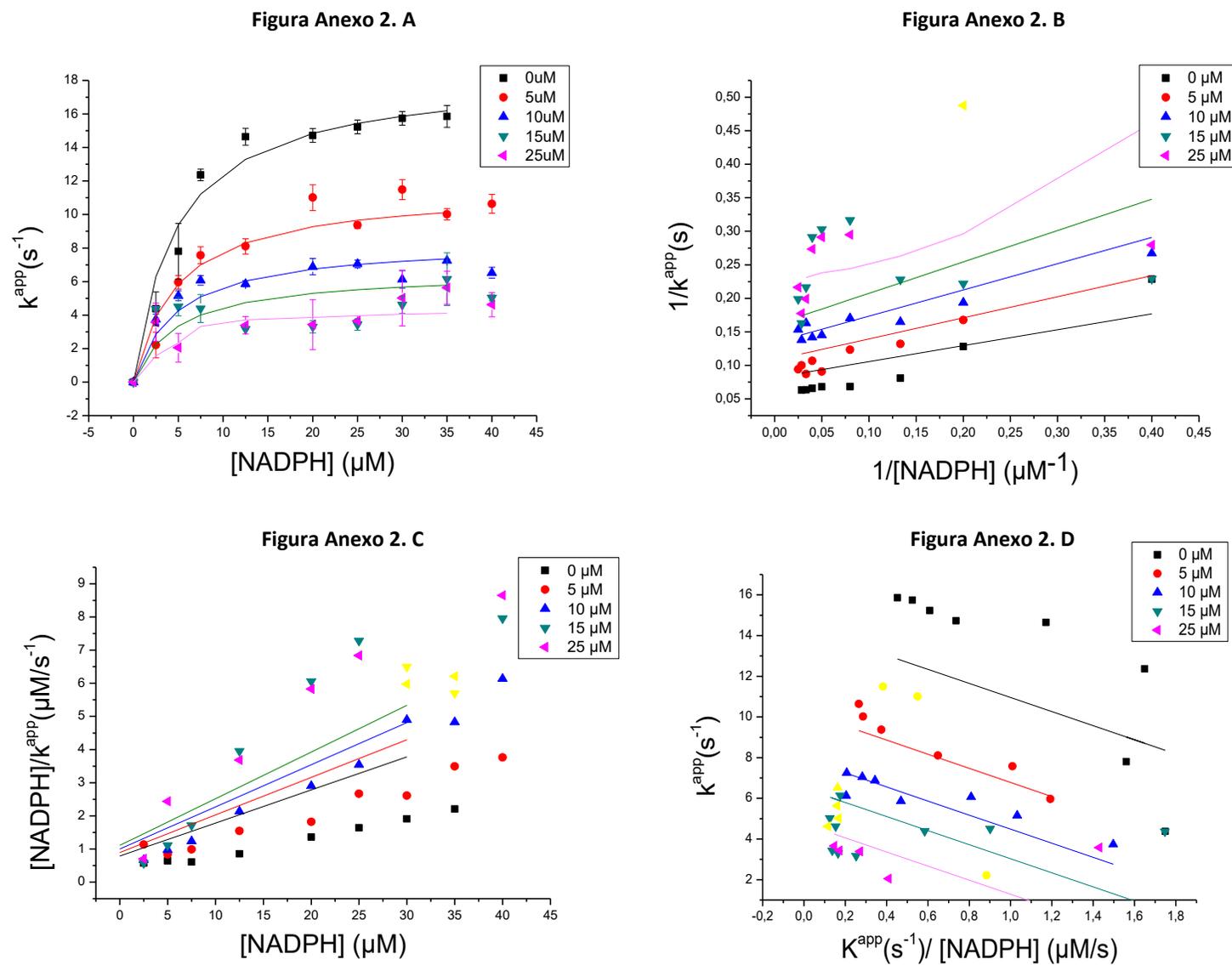
8. Anexos

Tabla Anexo 1: Ecuaciones de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee en ausencia de inhibición y para los tres mecanismos de inhibición competitiva, acompetitiva y no competitiva.

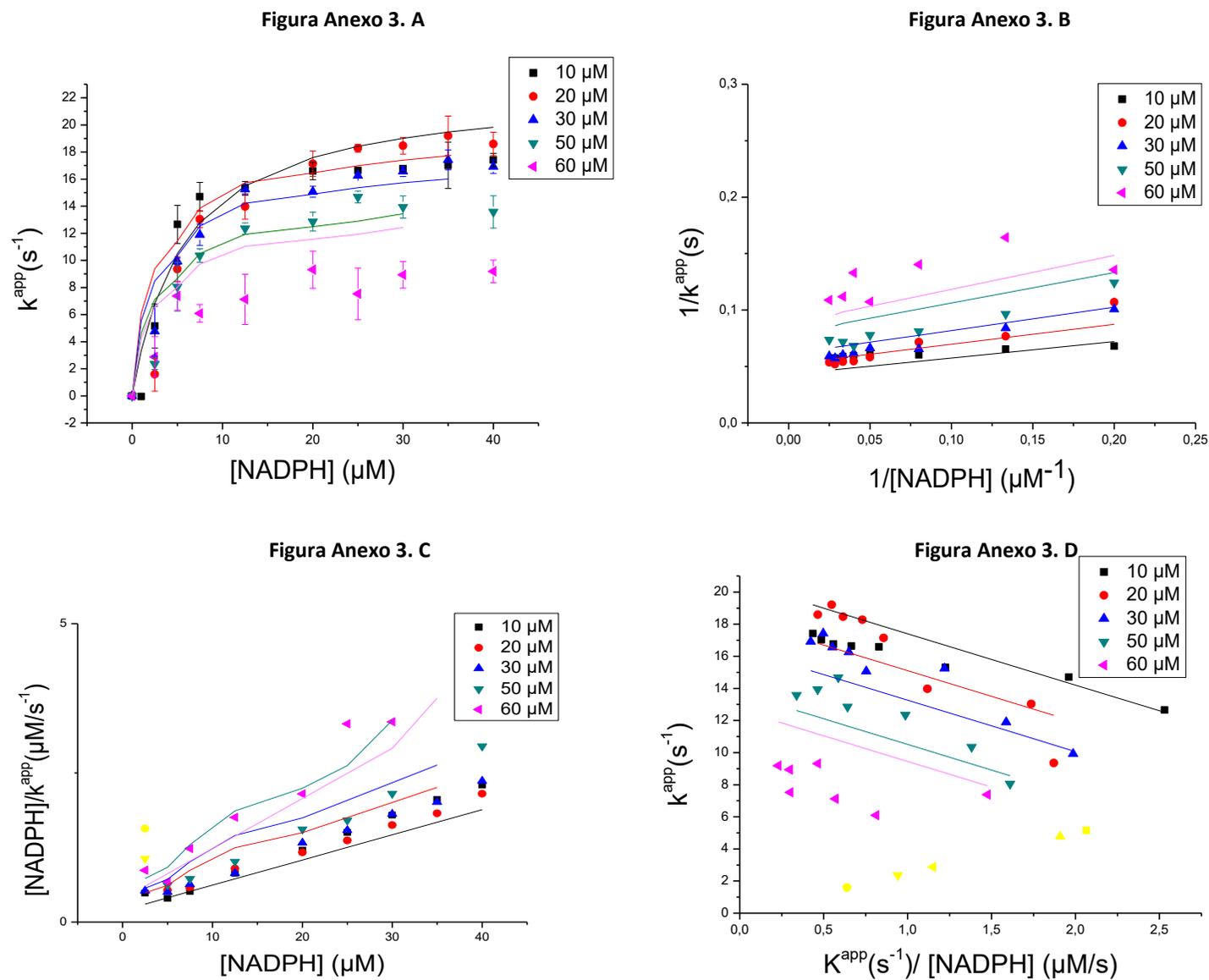
	Ec. Michaelis-Menten	Ec. Lineweaver-Burk	Ec. Hanes-Woolf	Ec. Eadie-Hofstee
Sin inhibición	$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} S} + \frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{S}{v} = \frac{K_m + S}{V_{\max}}$	$\frac{V_{\max}}{v} = \frac{K_m + S}{S}$
Inhibición competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}{V_{\max}}$	$v = V_{\max} - K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{v}{[S]}$
Inhibición acompetitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{S V_{\max}} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + K_m}{V_{\max}}$	$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} - \frac{K_m v}{1 + \frac{[I]}{K_I} [S]}$
Inhibición no competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}} + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}{V_{\max} S}$	$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}} S}{V_{\max}}$	$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} - \frac{K_m v}{[S]}$



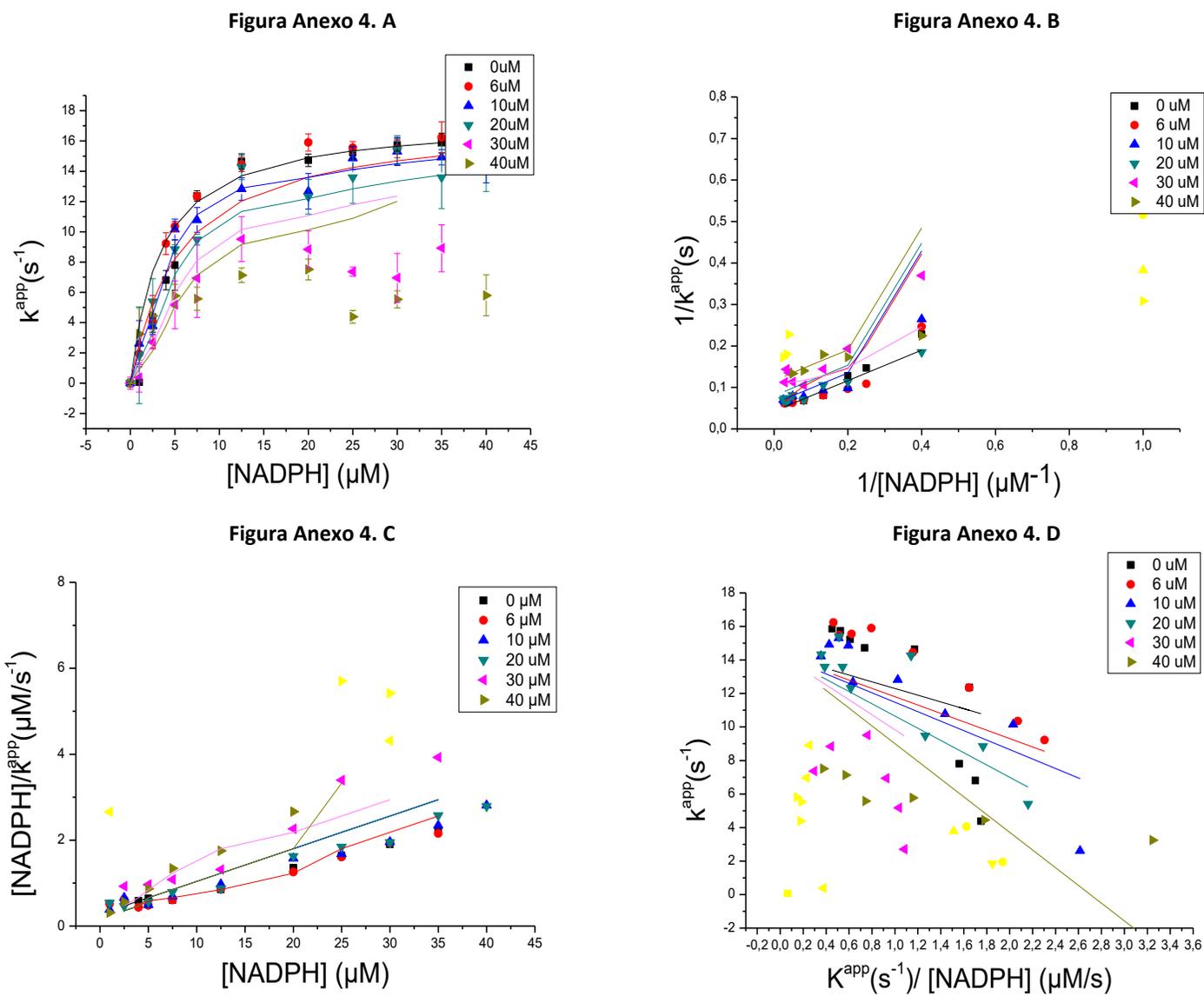
Figuras Anexo 1: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D2 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición no competitiva.



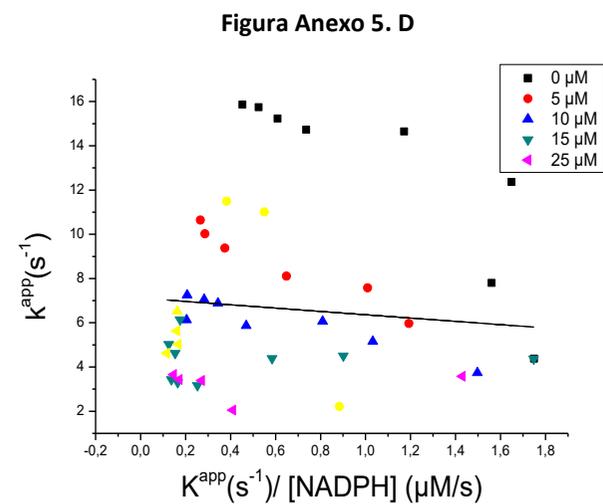
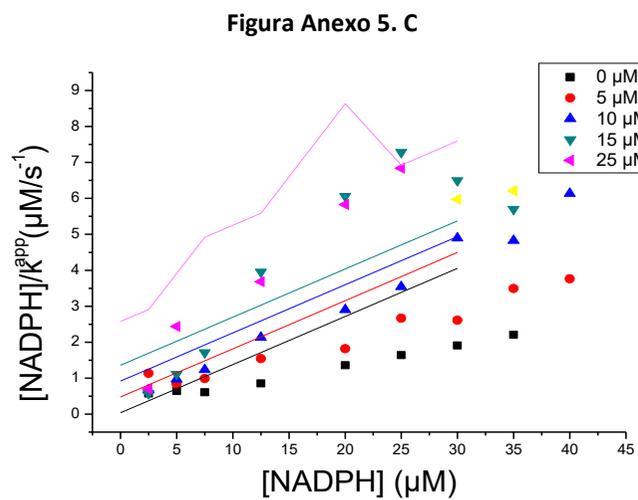
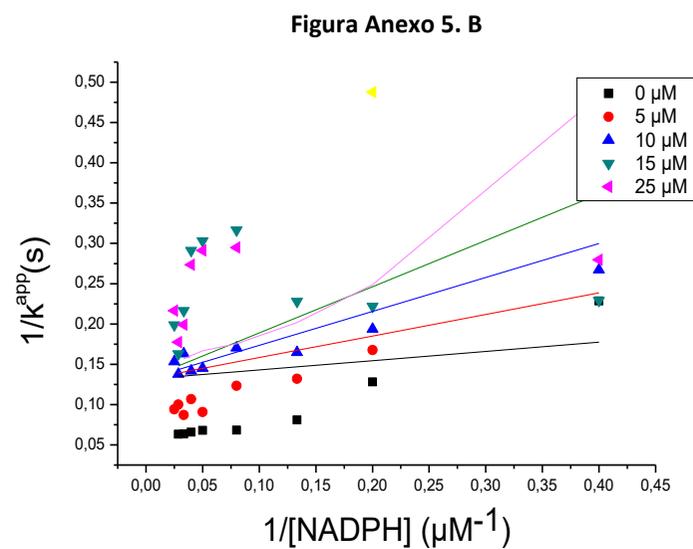
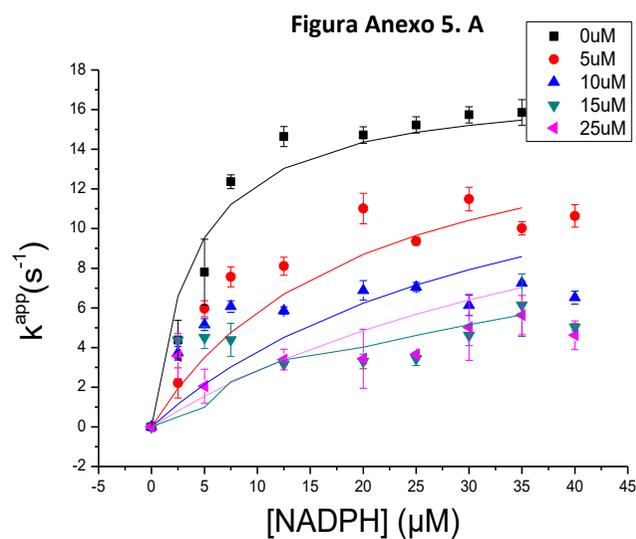
Figuras Anexo 2: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D5 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición no competitiva.



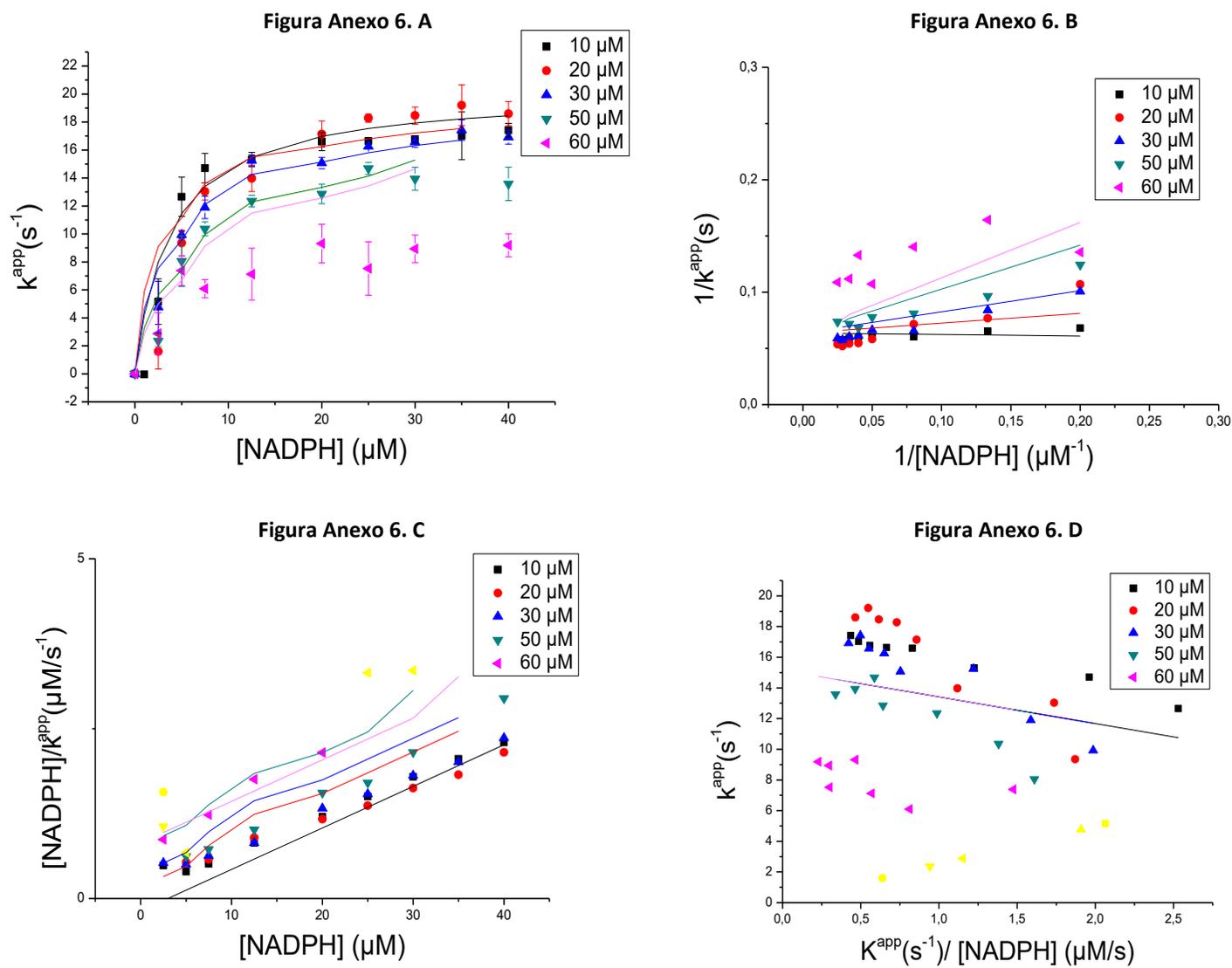
Figuras Anexo 3: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D10 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición no competitiva.



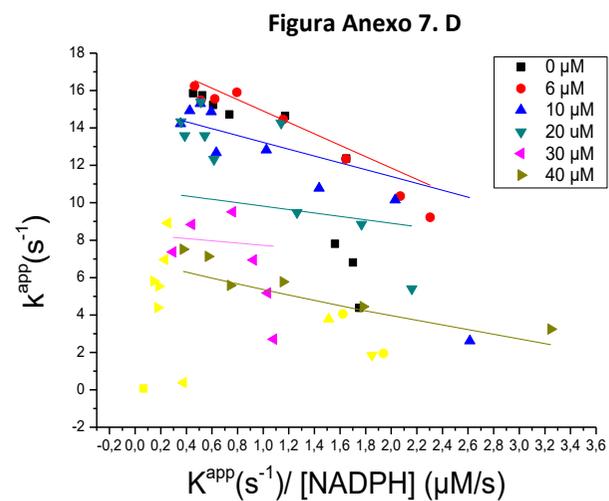
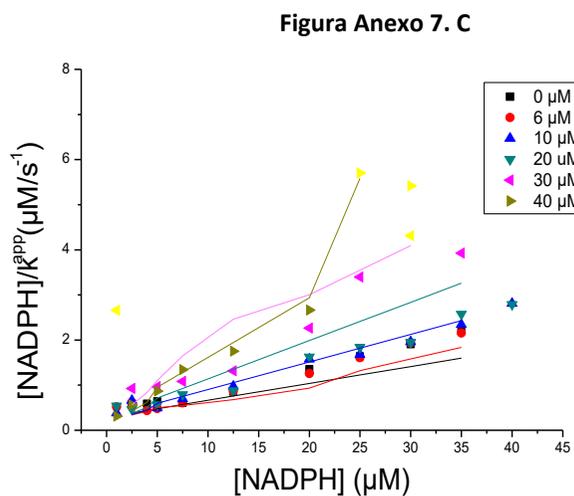
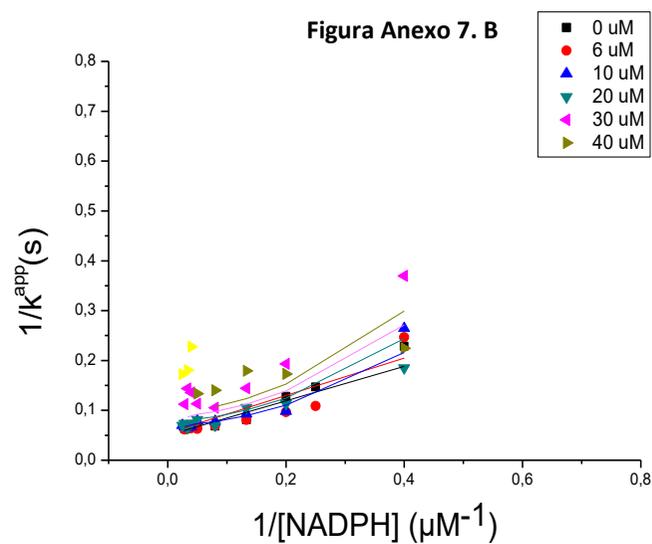
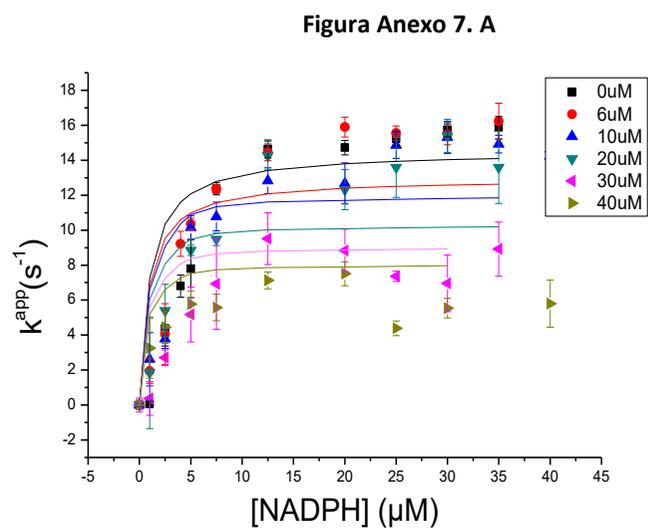
Figuras Anexo 4: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D2 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición competitiva.



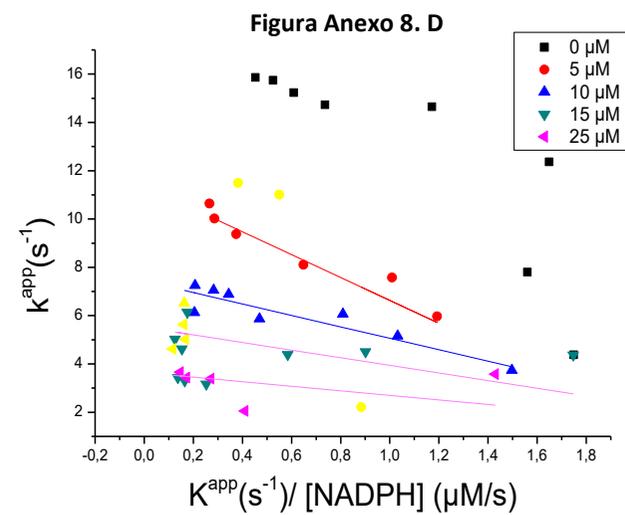
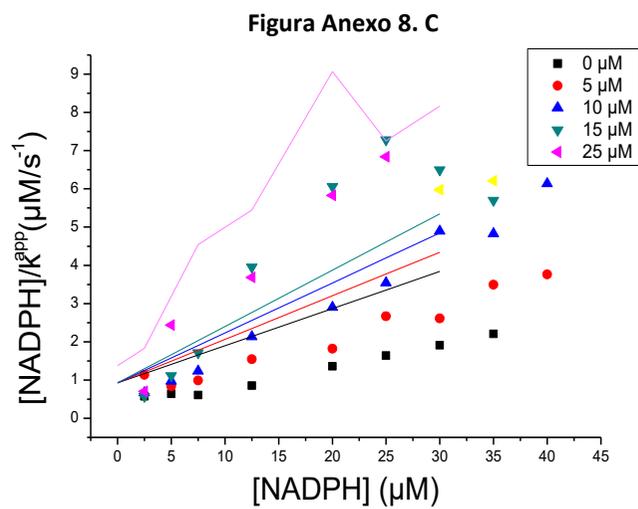
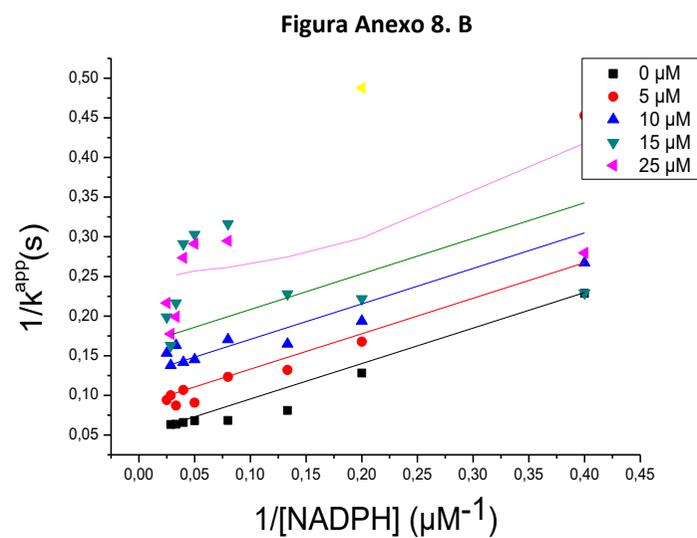
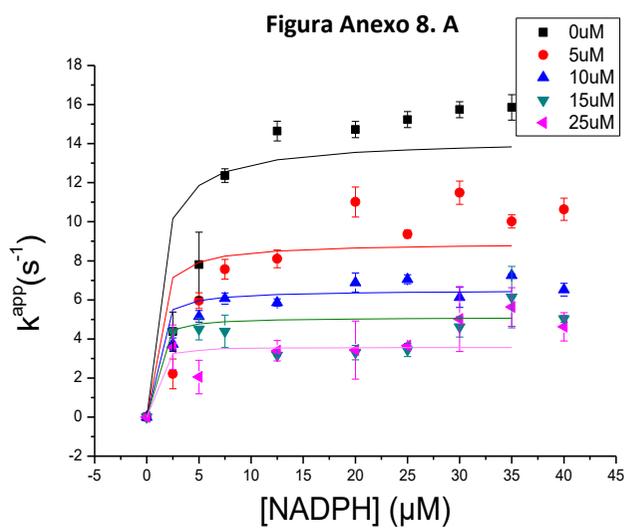
Figuras Anexo 5: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D5 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición competitiva.



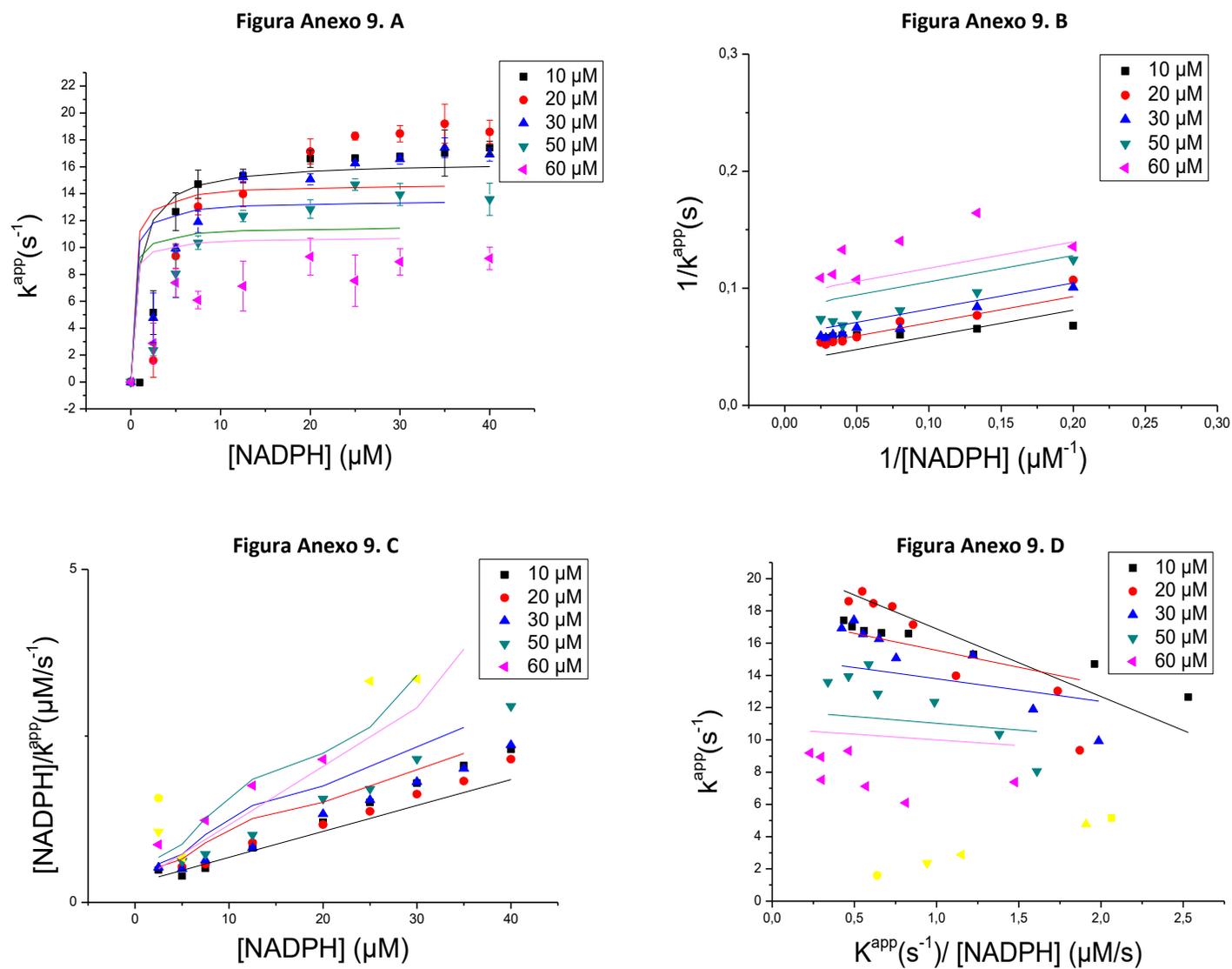
Figuras Anexo 6: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D10 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición competitiva.



Figuras Anexo 7: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D2 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición anticompetitiva.



Figuras Anexo 8: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D5 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición anticompetitiva.



Figuras Anexo 9: Datos cinéticos de *XacFPR* con el compuesto D10 ajustados a la ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten (A), Lineweaver-Burk (B), Hanes-Woolf (C) y Eadie-Hofstee (D) para el tipo de inhibición anticompetitiva.