

Puesta a punto de ensayos de cuantificación de dimerización y actividad de la superóxido dismutasa de hierro A de *Leishmania infantum*

Juan Carlos García Soriano¹, Héctor Elessar de Lucio Ortega¹, Antonio Jiménez Ruíz^{1, a}

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. antonio.jimenez@uah.es

Palabras clave: *Leishmania infantum*; superóxido dismutasa; actividad; dimerización; citocromo c; ELISA.

Resumen

Los parásitos del género *Leishmania* son los agentes causales de la leishmaniasis. Estos parásitos tienen la capacidad de sobrevivir dentro de las vacuolas fagocíticas de los macrófagos a pesar de las condiciones de pH y estrés oxidativo allí generadas. Esta resistencia se debe a diversos mecanismos biológicos que comprenden enzimas de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, entre otras. Estas enzimas son potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis. Una de estas enzimas es la superóxido dismutasa que cataliza la dismutación del anión superóxido, una especie reactiva de oxígeno con capacidad de originar otras especies reactivas más tóxicas. *Leishmania* cuenta con 4 superóxido dismutasas de hierro. La superóxido dismutasa de hierro A (Fe-SODA) se localiza en la mitocondria, lugar de producción endógena de superóxido. Se ha visto que la Fe-SODA se sobreexpresa en las formas parasitarias que infectan los macrófagos y que protege de la muerte celular inducida por el tratamiento con miltefosina. En este trabajo se ha clonado, expresado y purificado la Fe-SODA de *Leishmania infantum* con dos “etiquetas” (tags) moleculares distintas que permiten generar una versión heterodimérica para la puesta a punto de dos ensayos que permitan evaluar la eficacia de compuestos dirigidos contra la enzima. Uno de los ensayos que se ha optimizado en este trabajo ha sido un ensayo de cuantificación de la dimerización basado en la técnica ELISA usando anticuerpos contra las dos etiquetas del heterodímero, uno para pegar a la placa y el otro para evaluar el porcentaje de enzima dimérica. El segundo ensayo está dirigido a medir la actividad catalítica de la enzima. El ensayo de actividad se basa en la producción de superóxido por el sistema xantina/xantina oxidasa y en la competencia por el superóxido entre la Fe-SODA y el citocromo c, una proteína que cambia de color al reducirse por el superóxido.

Cita: García Soriano, Juan Carlos; de Lucio Ortega, Héctor Elessar; Jiménez Ruíz, Antonio (2016) Puesta a punto de ensayos de cuantificación de dimerización y actividad de la superóxido dismutasa de hierro A de *Leishmania infantum*. *Dianas* 5 (2): e20160907. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e20160907](http://www3.uah.es/dianas?e20160907) <http://www3.uah.es/dianas?e20160907>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © García-Soriano JC, de-Lucio-Ortega HE, Jiménez-Ruíz A. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Los parásitos del género *Leishmania*, agentes causales de las leishmaniasis, pertenecen a la familia de los tripanosomátidos y presentan un ciclo de vida parasitario que incluye dos hospedadores, el flebotomo como vector y el humano, u otros vertebrados, como hospedador final. En este último, el parásito se desarrolla como amastigote (células redondeadas y sin flagelos), lo que le permite llevar a cabo un parasitismo intracelular, infectando a los macrófagos, principalmente.

Una vez que el macrófago fagocita un promastigote (formas lanceoladas y flageladas provenientes del mosquito), este se diferencia a amastigote y es sometido en los fagolisosomas del macrófago a un ambiente extremo con bajo pH y elevada concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [1].

El amastigote, por tanto, cuenta con un gran número de recursos biológicos que le permiten resistir este ambiente sin problemas. Todos estos recursos biológicos son potenciales dianas terapéuticas, aprovechables en el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de la leishmaniasis.

En este trabajo nos vamos a centrar en la enzima superóxido dismutasa de hierro A (Fe-SODA) de *Leishmania infantum*, que representa uno de estos recursos del amastigote para la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, concretamente del anión superóxido.

El anión superóxido se produce cuando el oxígeno molecular capta un electrón y éste queda desapareado en la molécula, produciéndose por tanto un radical libre de oxígeno. Éste presenta cierta toxicidad, además de que tiene la capacidad de reaccionar con el óxido nítrico, ambos producidos por el macrófago, para dar lugar a una gran variedad de especies reactivas muy tóxicas [2].

Leishmania infantum presenta 4 SOD diméricas con hierro como cofactor, la Fe-SODA se localiza en su única mitocondria, lugar de producción endógena de radical superóxido, además de ser un centro integrador de señales de muerte celular, proceso en el que puede involucrarse la producción de superóxido [3], y en el que se ha visto que la Fe-SODA tiene un papel protector en el tratamiento con miltefosina, un fármaco inductor de muerte celular programada en *Leishmania* [4].

Se ha visto que la Fe-SODA se expresa en mayor abundancia en amastigotes que en los promastigotes [5]. Además, se ha visto que los promastigotes en fase estacionaria tardía, donde su capacidad infectiva es mayor, muestran una mayor actividad SOD [6]. Por todo ello, suponemos que la Fe-SODA es una enzima importante en la defensa de los parásitos contra las condiciones adversas del hospedador, y por tanto podría ser una diana terapéutica contra la leishmaniasis.

Este trabajo consiste, por un lado, en el clonaje de dos formas de la Fe-SODA, con dos etiquetas moleculares distintas, para poder así realizar un ensayo que nos permita discernir moléculas que impidan la dimerización de la enzima.

En segundo lugar, el trabajo ha consistido en la puesta a punto de un ensayo de cuantificación de enzima dimérica. La estrategia seleccionada fue realizar un ensayo ELISA, sensibilizando la placa con anticuerpos contra una de las etiquetas añadidas en el clonaje, bloqueando, incubando con la proteína y revelando con un anticuerpo contra la otra etiqueta, realizándose, además, lavados con TTBS entre cada uno de estos pasos.

Finalmente, se puso a punto un ensayo de actividad SOD en placa de 96 pocillos, tomando como referencia el ensayo adaptado por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri) [7] a partir del descrito por McCord y Fridovich en 1969 para cubeta de 3 ml [8]. El fundamento del ensayo es el que sigue: la xantina es oxidada enzimáticamente por la xantina oxidasa, y los electrones son captados por el oxígeno disuelto, formándose anión superóxido. En ausencia de SOD, el anión superóxido tiene la capacidad de transferir electrones al citocromo c oxidado, pasando éste a su forma reducida con máximo de absorbancia a 550 nm. En presencia de SOD, el anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, de manera que, el citocromo c compite con la SOD por el superóxido, disminuyendo así el flujo de electrones al citocromo c y por tanto la absorbancia a 550 nm (Figura 1).

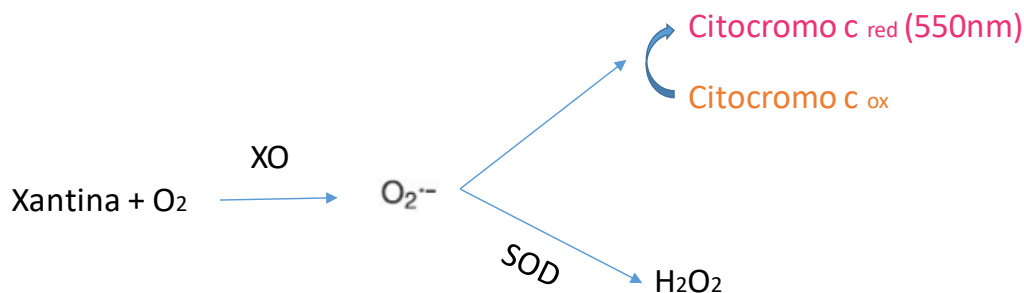


Figura 1: esquema explicativo del ensayo de actividad SOD basado en citocromo c y xantina/xantina oxidasa.

Métodos

A continuación, se detallan los métodos seguidos para alcanzar los objetivos del trabajo.

Clonaje de la Fe-SODA con dos etiquetas moleculares

Se decidió clonar, por separado, dos versiones de la Fe-SODA con una etiqueta molecular distinta en la región N-terminal de la proteína: etiqueta “HIS” y etiqueta “FLAG”. Cada una de las versiones contienen además la etiqueta “T7”. Por comodidad, a partir de este momento, estas dos formas marcadas se denominarán como SOD-HIS y SOD-FLAG. Para el clonaje se amplificó la Fe-SODA mediante PCR.

En el caso de la SOD-HIS, se usaron los siguientes cebadores:



El vector de elección fue pRSETa que incluye el codón de inicio, las secuencias HIS y T7 hacia la región N-terminal, y las dianas de corte de las enzimas de restricción BamH I y Hind III, además de un gen de selección que confiere resistencia a las bacterias contra ampicilina.

En el caso de la SOD-FLAG, el cebador directo incluye la secuencia FLAG en la región N-terminal. Los cebadores fueron los siguientes:

5' GGGGGATCCGACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTTCC-GCCGCGTCTCGATGA 3'
 5' GGGAAGCTTTTACTTCGTGGCCTTCTCATAACATCTGGCA 3'

El vector elegido fue pET24d>a que contiene el marcador T7 hacia la región N-terminal y las dianas de corte de las enzimas de restricción BamH I y Hind III. Las bacterias transformadas con esta construcción se seleccionan por un gen de resistencia a kanamicina.

Previo al clonaje en los vectores finales, los productos de PCR fueron ligados in situ en el vector pJET, que confiere resistencia a ampicilina, y transformados por choque térmico en bacterias *Escherichia coli* DH5 α . Se seleccionaron las bacterias con la construcción deseada mediante siembra en agar con ampicilina, y se comprobó la presencia del inserto adecuado en las colonias por extracción del plásmido, extracción del inserto mediante digestión con enzimas de restricción y visualización por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, se confirmó la secuencia de la Fe-SODA en el inserto por secuenciación.

Posteriormente, se extrajo el inserto para clonarlo en los vectores definitivos pRSETa y pET24d>a y transformarlos con ellas bacterias *E. coli* DH5 α . La selección de las bacterias se realizó mediante siembra en placas de agar con ampicilina en el caso de SOD-HIS (vector pRSETa), y con kanamicina en el caso de SOD-FLAG (vector pET24d>a). Para expresar la versión heterodimérica ("SOD-HT"), se realizó una transformación doble de las dos construcciones en bacterias de expresión *E. coli* BL21 (DE3) Rossetta.

Purificación de SOD-HT

Los cultivos bacterianos se indujeron con IPTG 1mM a 16°C durante 6 horas, tras lo cual se recogieron las bacterias por centrifugación y resuspendieron en el siguiente tampón: CHAPS 0.5%, PIC 1%, NaCl 300mM, HEPES 20mM, MgCl₂ 10mM y β -mercaptoetanol 3mM. Posteriormente, se lisó con lisozima a 1 mg/ml durante 1 hora y sonicación durante 30 minutos. Los componentes insolubles bacterianos se separaron por centrifugación a 9000xg durante 1 hora. La purificación se llevó a cabo por unión a una columna de cromatografía de afinidad de níquel, con afinidad por la etiqueta HIS, y elución con un gradiente de imidazol de 25 a 500 mM. La solubilidad de la proteína en el lisado, la eficiencia de la columna de afinidad y la cantidad y pureza de la proteína de las fracciones de lavado y elución fueron testadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS y tinción Coomassie.

Inmunoblot

La presencia de los dos tipos de monómeros, SOD-HIS y SOD-FLAG, en la versión heterodimérica SOD-HT tras la purificación se confirmó mediante inmunoblot. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15%. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF, se bloqueó la membrana con leche al 5% y se incubó, por un lado, durante una hora con un anticuerpo anti-HIS marcado con peroxidasa de rábano de Abcam (Cambridgeshire, Reino Unido, referencia AB49781), y por otro, primero con un anticuerpo primario de ratón anti-FLAG de Sigma-Aldrich (ref. F3165) durante 16 horas, y después, con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano de Sigma-Aldrich (ref. A0168), durante otra hora. Después del bloqueo y la incubación con cada anticuerpo se realizaron lavados con TTBS. Finalmente se reveló con una solución de peróxido y luminol de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU, ref. 170-5060 y 170-5061), y se obtuvo una imagen con un ChemiDoc™ usando el programa "ImageLab".

Ensayo de cuantificación de dimerización

La puesta a punto de este ensayo forma parte del presente trabajo, por lo que las condiciones en las que se realiza el ensayo se detallan en la sección de "RESULTADOS-Ensayo de cuantificación de dimerización".

Ensayo de actividad SOD

De igual manera, debido a que el presente trabajo incluye la puesta a punto del ensayo de actividad, las especificaciones de este se detallan en la sección de "RESULTADOS-Ensayo de actividad".

Resultados y discusión

Se discuten a continuación los resultados de la purificación de la versión heterodimérica de Fe-SODA (SOD-HT), creada mediante el clonaje por separado con dos etiquetas: HIS y FLAG, así como los resultados de la puesta a punto del ensayo de cuantificación de dimerización y el ensayo de actividad.

Purificación SOD-HT

Tras confirmar que la secuencia de la Fe-SODA en los vectores de expresión era correcta, se transformaron bacterias BL21 (DE3) Rossetta con ambas construcciones para la inducción y purificación de la versión heterodimérica SOD-HT.

La búsqueda del tiempo de inducción óptimo de la proteína se realizó mediante pruebas de inducción y solubilidad a tiempos de 2, 4, 6 y 16 horas, incubando a 16°C y recogiendo muestras en los tiempos indicados. Para el análisis de la solubilidad, además, se lisaron las bacterias y se separó la parte insoluble de la soluble mediante centrifugación a 9000xg durante una hora. Posteriormente, se solubilizó el precipitado con urea 8 M. El contenido de SOD se analizó hirviendo las muestras bacterianas en tampón de electroforesis, separándolas en un gel de poliacrilamida al 15% y tiñéndolo con Coomasie.

El tiempo de 16 horas mostró una baja solubilidad, y el de 6 horas, además de tener un mayor porcentaje de proteína soluble, mostró que la cantidad de proteína era superior que a las 2 y 4 horas (datos no mostrados).

Tras el análisis de los resultados de las pruebas anteriores, la expresión de la proteína se indujo durante 6 horas a 16 °C y se realizó una lisis y purificación de la proteína por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. El lisado antes y después de pasar por la columna de níquel, la parte insoluble y las fracciones de lavado y elución fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y tinción de Coomasie (Figura 2).

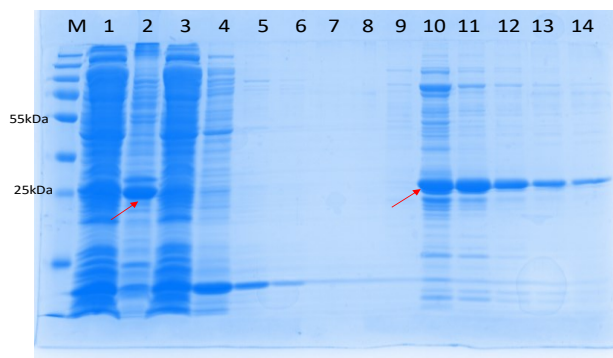


Figura 2: Tinción de Coomasie tras electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de las muestras de la lisis y purificación: M, Marcador de peso molecular. 1, Sobrenadante de la centrifugación del lisado (parte soluble). 2, Precipitado de la centrifugación del lisado disuelto en urea 8 M (parte insoluble). 3, Lisado tras atravesar la columna de níquel. 4-7, Fracciones de lavado. 8-14, Fracciones de elución. Flecha roja, banda correspondiente a Fe-SODA.

Inmunoblot

La confirmación de la purificación de SOD-HT mediante inmunoblot con anticuerpos anti-HIS y anti-FLAG se realizó con un control de SOD-HIS en paralelo (una versión homodimérica purificada anteriormente en este mismo laboratorio) (Figura 3). La existencia de banda en ambas muestras, SOD-HIS y SOD-HT, cuando el anticuerpo incubado es anti-HIS, junto con la existencia de una sola banda en la muestra de SOD-HT, cuando el anticuerpo usado es anti-FLAG, demuestra que la purificación de la SOD-HT ha sido realizada con éxito.

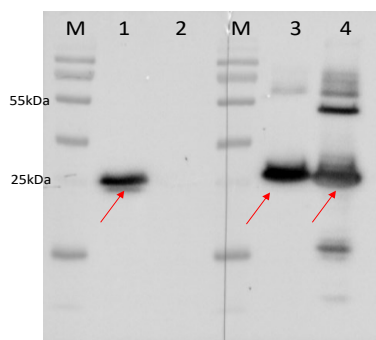


Figura 3: Confirmación por inmunoblot. M, marcador de peso molecular. 1, SOD-HT revelado incubando con anti-FLAG. 2, SOD-HIS revelado incubando con anti-FLAG. 3, SOD-HT revelado con anti-HIS. 4, SOD-HIS revelado con anti-HIS. Flecha roja, banda correspondiente a Fe-SODA.

Ensayo de cuantificación de dimerización

El ensayo para cuantificar la enzima dimérica se basa en la técnica de ELISA e incluye la sensibilización de una placa de 96 pocillos con anticuerpos anti-FLAG de Sigma-Aldrich (ref. F1804) en PBS, lo que permite recubrir el fondo de los pocillos con estos anticuerpos para favorecer la unión de la proteína heterodimérica SOD-HT por su monómero SOD-FLAG. Tras esto, se realizan lavados con TTBS y se bloquean los sitios inespecíficos con algún agente bloqueante cuyo exceso se retira también con TTBS. Una vez bloqueada la placa, se incuba la SOD-HT, tratada o no con un compuesto que inhiba la

dimerización. A continuación, se retira mediante lavados con TTBS, tanto el exceso de proteína no unida a la placa, como los monómeros SOD-HIS liberados por el tratamiento. Finalmente, se cuantifica la enzima dimérica midiendo la cantidad de monómero SOD-HIS. Para ello, se incuban los pocillos con anticuerpos anti-HIS marcados con peroxidasa de rábano de Abcam (ref. AB49781) durante 1 hora, y se revela con una solución de sustrato de peroxidasa OPD de Sigma-Aldrich (ref. P9187), parando la reacción tras unos minutos con ácido sulfúrico y midiendo la absorbancia a 490 nm.

La puesta a punto del método se realizó ensayando por triplicado distintas condiciones de sensibilización de la placa con anti-FLAG, de bloqueo de la misma, de concentración de la Fe-SODA y unión a la placa de la proteína, buscando aquellas que generen un menor porcentaje de ruido. Para el cálculo del porcentaje de ruido se comparó la señal del ensayo del heterodímero SOD-HT (SOD-HIS + SOD-FLAG) con la señal de un control negativo, el homodímero SOD-HIS, que no debería dar señal puesto que no posee el monómero SOD-FLAG por el que la SOD-HT se pega a la placa. El porcentaje de ruido se calcula, por tanto, por la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de ruido} = (\text{Absorbancia de SOD-HIS a 490 nm} / \text{Absorbancia de SOD-HT a 490 nm}) * 100.$$

En cuanto a las condiciones de sensibilización y bloqueo de la placa, se probaron dos condiciones de tiempo y temperatura. En la condición 1, se sensibilizó con anti-FLAG en PBS a 26°C durante 2 horas y se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS a 4°C durante 16 horas. En la condición 2, se sensibilizó con anti-FLAG en PBS a 37°C durante 30 minutos y luego se bloqueó con BSA al 5% en PBS a 37°C durante 90 minutos.

En cuanto a la unión a la placa se probaron dos condiciones: i) la condición A, en la que se incubó la placa directamente con la proteína y el hipotético inhibidor con agitación a 37°C durante 16 horas, y ii) la condición B, en la que el hipotético inhibidor y la proteína se incubaron fuera de la placa a 37°C durante 16 horas con agitación y luego se pegaron a la placa a 37°C durante 30 minutos con agitación.

Además, se probaron dos agentes bloqueantes: BSA, con referencia de Sigma-Aldrich A8022 (“BSA 8022”) y BSA libre de ácidos grasos, con referencia de Sigma-Aldrich A7030 (“BSA 7030”).

En primer lugar, se probó la condición 1 de sensibilización y bloqueo variando el agente bloqueante (BSA 7030 y BSA 8022) y las condiciones de unión (A y B) con una concentración prefijada de SOD de 400 nM. El porcentaje de ruido en estas condiciones se muestra en la figura 4.

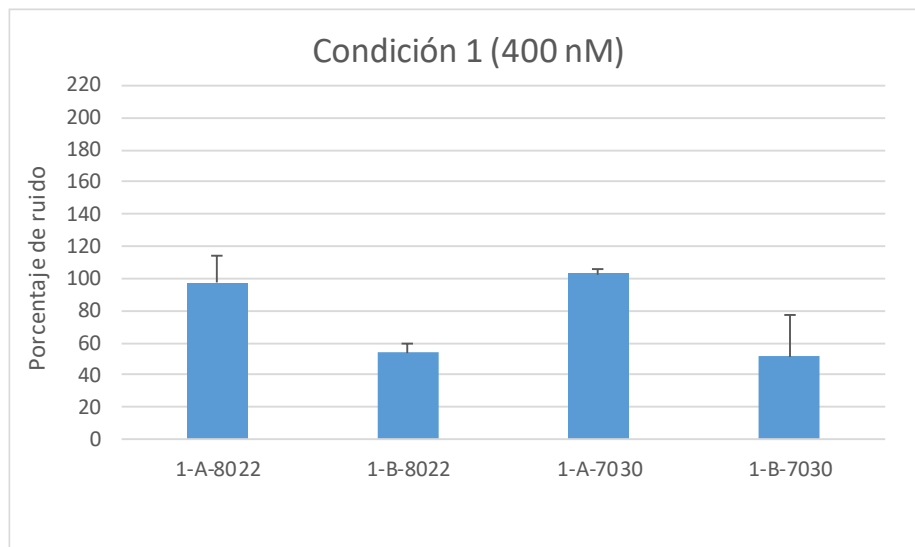


Figura 4: Efecto de las condiciones de unión de la proteína (A y B) y del agente bloqueante (BSA 7030 y BSA 8022) en el porcentaje de ruido del ensayo, usando la condición 1 de sensibilización y bloqueo y la concentración de 400 nM de SOD.

El porcentaje de ruido fue significativamente menor usando la condición B de unión a la placa. En cuanto al agente bloqueante no hubo diferencias significativas entre el uso del BSA 7030 y el BSA 8022. Se decidió continuar con la condición 1-B-7030, puesto que en el análisis de los datos hubo que descartar un valor del triplicado en la condición 1-B-8022.

Posteriormente, se ensayó, con la condición 1-B-7030, distintas concentraciones de SOD. Las concentraciones ensayadas fueron 800, 400, 200 y 100 nM (Figura 5).

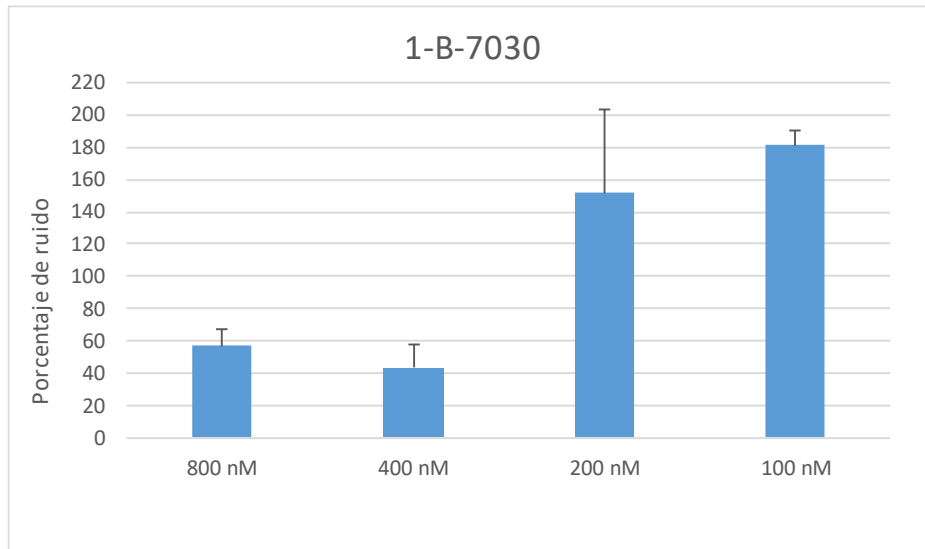


Figura 5: Efecto de la concentración de Fe-SODA en el porcentaje de ruido, usando la condición 1 de sensibilización y bloqueo, condición B de pegado a la placa y BSA 7030.

La concentración de SOD de 400 nM, junto con la condición B de unión de la proteína a la placa y el BSA 7030 como agente bloqueante fueron las condiciones que obtuvieron la mejor relación señal/ruido para la condición 1 de sensibilización y bloqueo de la placa.

A continuación, se procedió a ensayar estas mismas variables (concentración de SOD, agente bloqueante y condiciones de unión a la placa) con la condición 2 de sensibilización y bloqueo. Se ensayaron las condiciones 2-A-7030, 2-A-8022, 2-B-7030 y 2-B-8022, evaluando, a su vez, distintas concentraciones de SOD: 800, 400, 200 y 100 nM (Figura 6).

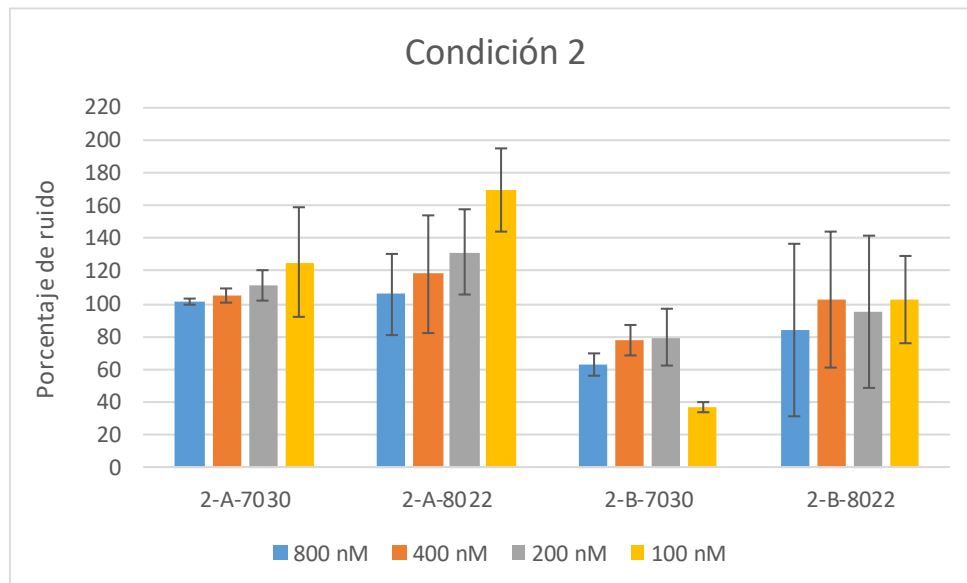


Figura 6: Efecto de las condiciones de pegado de la proteína (A y B), del agente bloqueante (BSA 7030 y BSA 8022) y de la concentración de SOD (800, 400, 200 y 100 nM) en el porcentaje de ruido del ensayo, usando la condición 2 de sensibilización y bloqueo.

La condición 2-B-7030 con una concentración de SOD de 100 nM mostró la mejor relación señal/ruido hasta el momento obtenida: $36.7 \pm 3.1\%$ de porcentaje de ruido.

A la vista de estos resultados, concluimos que las condiciones óptimas para el ensayo de cuantificación de la dimerización de la Fe-SODA son las siguientes: **condición 2** de sensibilización y bloqueo (incubación con anti-FLAG durante 30 minutos a 37°C y bloqueo con BSA al 5% en PBS durante 90 minutos), BSA libre de ácidos grasos (**BSA 7030**) como agente bloqueante, **Fe-SODA a una concentración de 100 nM** y **condición B** de unión de ésta a la placa (incubación de la proteína con el inhibidor a 37°C durante 16 horas con agitación fuera de la placa, y unión a la placa a 37°C durante 30 minutos con agitación).

Ensayo de actividad

Se realizó un ensayo con las concentraciones de los reactivos indicadas por Sigma-Aldrich [7] para cubeta de 3 ml, basado en McCord y Fridovich [8]. Los reactivos y sus concentraciones fueron los siguientes:

tampón fosfato a pH 7.8 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 mM, citocromo c 0.01 mM, xantina 0.05 mM y xantina oxidasa 0.0017 unidades/ml (Figura 7).

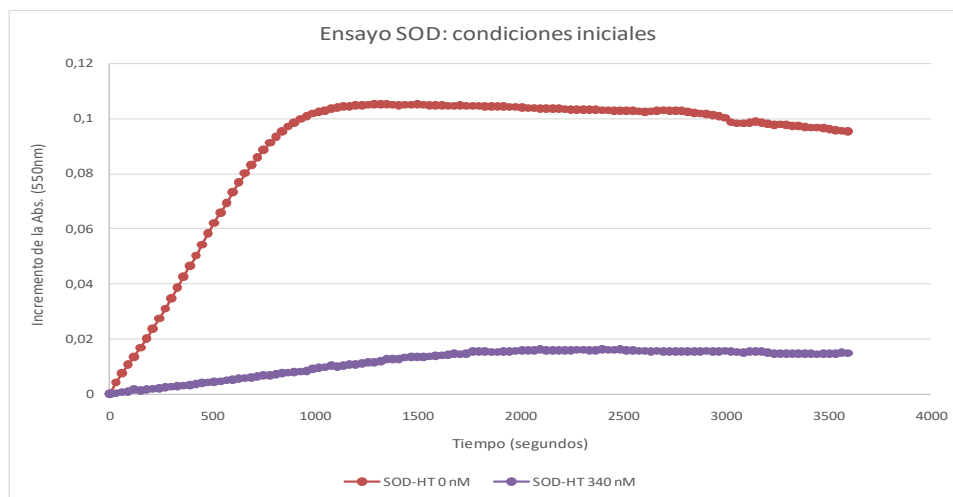


Figura 7: Incremento de la absorbancia frente al tiempo, desde el momento de la adición de la xantina oxidasa en ensayo de actividad SOD con las concentraciones de reactivos del protocolo para cubeta de 3ml de Sigma-Aldrich [7].

La muestra conteniendo la SOD-HT 340 nM mostró actividad puesto que rebajó los valores de absorbancia a 550 nm. Esto es debido a que la reducción del citocromo c por el superóxido se vio disminuida como consecuencia de la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno catalizada por la SOD.

A continuación, se procedió a optimizar el método mediante la variación de las concentraciones de diversos componentes del ensayo, manteniendo el resto de reactivos en las concentraciones iniciales descritas por Sigma-Aldrich [7].

Siendo el incremento máximo de absorbancia (en ausencia de SOD) de escasamente 0.1 unidades, se decidió optimizar el rango dinámico, es decir, incrementar el margen que hay desde el nivel máximo de señal hasta el nivel mínimo, correspondiente al ruido de fondo. Para ello se realizaron pruebas variando la concentración de xantina y citocromo c.

Se probaron las siguientes concentraciones de xantina: 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mM, no obteniéndose diferencias significativas entre ellas en cuanto a la pendiente y al incremento de absorbancia, dando un valor cercano a 0.1 (datos no mostrados). Además, la concentración 5 mM mostró precipitación visible en el fondo de los pocillos, por lo que se descartó esta concentración y se escogió la siguiente más concentrada, 2.5 mM, para asegurar que hay sustrato donador de electrones en exceso para reducir todo el citocromo c. A continuación, se probaron las siguientes concentraciones de citocromo c: 0.01, 0.02 y 0.04 mM (Figura 8).

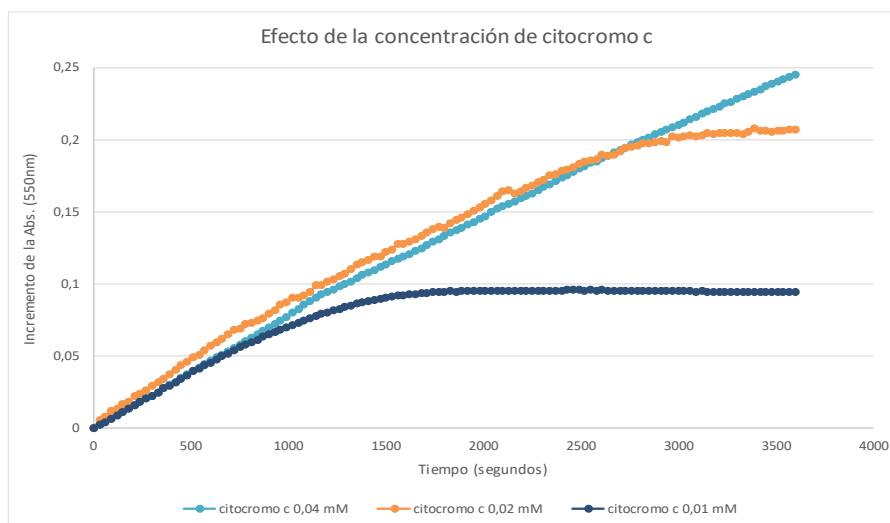


Figura 8: Efecto de la concentración de citocromo c en el incremento de absorbancia a 550 nm frente al tiempo.

El aumento de concentración de citocromo c causó un incremento significativo en el rango dinámico del ensayo. Puesto que el citocromo c es el componente más costoso del ensayo, se descartó la concentración

de 0.04 mM y se decidió optar por la concentración 0.02 mM, que duplica el incremento de absorbancia previo. Además, para reducir el tiempo del ensayo se probaron distintas concentraciones de xantina oxidasa: 300, 150 y 75 nM (0.0060, 0.0030 y 0.0015 unidades/ml) (Figura 9).

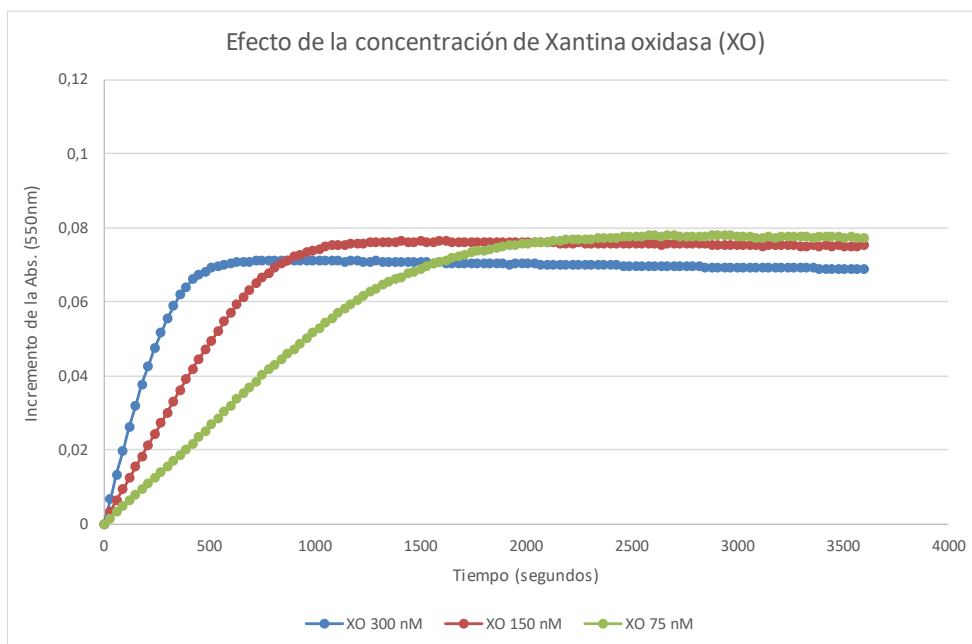


Figura 9: Efecto de la concentración de xantina oxidasa en el incremento de absorbancia a 550 nm frente al tiempo.

La concentración de 150 nM consiguió culminar la reacción en un tiempo razonable de 20 minutos, por lo que fue la concentración elegida.

Finalmente, se buscó la concentración de Fe-SODA más adecuada para el ensayo de compuestos, para lo cual se pretendía encontrar una concentración que diera una pendiente baja, pero sin llegar a inhibir completamente la reacción. Esto nos da un mayor rango para medir la inhibición de la enzima, permitiéndonos, además, detectar pequeñas inhibiciones de la actividad enzimática, lo que no podríamos percibir si la reacción estuviese completamente inhibida. En la figura 10 se muestra los resultados del ensayo probando las concentraciones 20 y 40 nM de SOD.

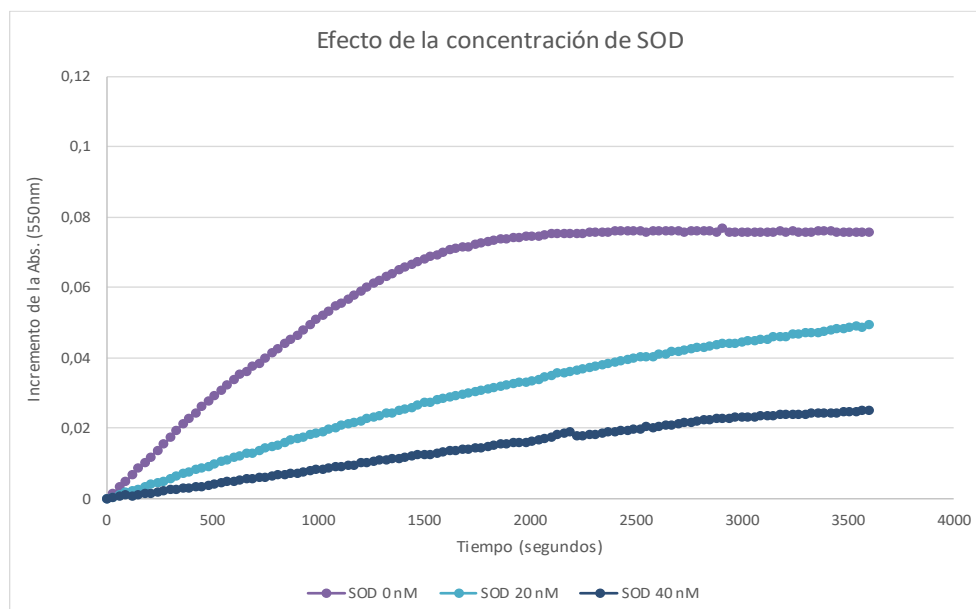


Figura 10: Efecto de la concentración de SOD en el incremento de absorbancia a 550 nm frente al tiempo.

La concentración de SOD a 40 nM fue la que tuvo una pendiente más baja (figura 10), sin llegar a inhibir completamente la reacción, por lo que fue la concentración escogida.

Por tanto, concluimos que las condiciones de concentración óptimas del ensayo de actividad SOD son las siguientes: xantina 2.5 mM, citocromo c 0.02 mM, xantina oxidasa 150 nM y SOD 40 nM.

Conclusiones

En este trabajo, se ha conseguido producir un heterodímero con dos versiones de etiquetas moleculares de la superóxido dismutasa de hierro A de *Leishmania infantum*, mediante el clonaje en *E. coli*, expresión de la proteína, y purificación por cromatografía de afinidad.

Esta Fe-SODA con dos versiones de monómero marcado, nos ha permitido poner a punto ensayos de cuantificación de la dimerización y de la actividad, que posibilitarán el cribado de compuestos dirigidos a la interfaz de dimerización de la enzima.

Las condiciones óptimas del ensayo de cuantificación de dimerización se han obtenido con la condición de sensibilización y bloqueo 2, usando como agente bloqueante BSA 7030 (libre de ácidos grasos), condición de unión de la proteína a la placa B y una concentración de SOD a 100 nM.

Las concentraciones óptimas del ensayo de actividad se han obtenido con citocromo c 0.02 mM, xantina 2.5 mM, xantina oxidasa 150 nM y SOD 40 nM.

Referencias

1. Moradin, N. and Descoteaux, A. 2012. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2:121.
2. Wink, D.A., Hines, H.B., Cheng, R.Y.S., Switzer, C.H., Flores-Santana, W., Vitek, M.P., Ridnour, L.A. and Colton, C.A. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol.* 89(6):873-896.
3. Shaha, C. 2006. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res.* 123(3):233-244.
4. Getachew, F. and Gedamu, L. 2012. *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Mol Biochem Parasitol.* 183(1):42-51.
5. Paramchuk, W.J., Ismail, S.O., Bhatia, A. and Gedamu, L. 1997. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 90(1):203-221.
6. Alzate, J.F., Arias, A.A., Moreno-Mateos, D., Álvarez-Barrientos, A. and Jiménez-Ruiz, A. 2007. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol.* 152(2):192–202.
7. Enzymatic assay of superoxide dismutase. Página web de la casa comercial Sigma-Aldrich. Visitado en junio de 2016. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-superoxide-dismutase.html>
8. McCord, J.M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244(22):6049-6055.