

Curso 2017/2018

Trabajo fin de grado

Estudio del efecto inhibitorio de algunos compuestos químicos en la actividad reductasa de la ferredoxin NADP⁺ reductasa del patógeno *Leptospira interrogans*

María Marco Clavero

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. FACULTAD DE CIENCIAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
CELULAR

Directoras:

- Dra. Marta Martínez Júlvez
- Dra. Milagros Medina Trullenque

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Material y métodos	7
Material biológico	7
Medidas de la actividad diaforasa con DCPIP	7
Determinación del IC_{50}	7
Estudio del tipo de inhibición.....	8
Determinación del coeficiente de extinción molar de los compuestos LPs.....	9
Resultados y discusión	10
Actividad diaforasa de LepFNR.....	10
Caracterización espectroscópica de los compuestos.....	10
Valores de IC_{50} de los compuestos LPs.....	11
Estudio del tipo de inhibición de los compuestos LP1, LP2 y D5	12
Conclusiones	19
Conclusions	20
Bibliografía	21
Anexos	22

Resumen

Este trabajo está dentro de una línea de investigación centrada en la búsqueda de compuestos que presenten acción bactericida contra el microorganismo patógeno *Leptospira interrogans*, el cual causa la enfermedad denominada Leptospirosis, una zoonosis muy extendida a nivel mundial.

Leptospira es una bacteria Gram negativa que presenta en su metabolismo una enzima, la Ferredoxina NADP(H) reductasa (*LepFNR*) que se está estudiando como diana farmacológica en otros organismos patógenos (la FPR del fitopatógeno *Xanthomonas*). Sus diferencias tanto estructurales como funcionales con las análogas presentes en organismos eucariotas hacen que esta proteína sea un buen candidato para actuar sobre ella y que no afecte al hospedador.

La enfermedad de Weill (Leptospirosis en humanos) presenta cuadros desde leves hasta graves, y en estos últimos casos el fallo renal puede causar la muerte, por lo que encontrar un tratamiento o una vacuna sería una forma de parar la extensión de dicha enfermedad.

En esta memoria se estudia el poder de inhibición de la actividad de la *LepFNR* de 7 compuestos (LP1-LP7) identificados mediante un cribado masivo de una quimioteca formada por 1120 compuestos. Además, se ha estudiado otro compuesto más, el D5, que es un buen candidato como inhibidor de la enzima análoga en *Xanthomonas*. El objetivo era comprobar si este mismo compuesto podía ser prometedor en otro tipo de microorganismo con características diferentes en una proteína con función similar.

Este trabajo ha consistido en la medida del IC_{50} de estos compuestos mediante la actividad diaforasa de la *LepFNR* y el estudio del tipo de inhibición que ejercen tres de ellos sobre dicha actividad (LP1, LP2 y D5). Con los datos obtenidos se han realizado ajustes globales a las funciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk (inversa), ambas modificadas por el factor de inhibición, lo cual permite determinar el tipo de inhibición.

Se ha concluido que, si bien todos los compuestos estudiados inhiben la actividad de la *LepFNR* como mínimo hasta un 80 %, los valores de IC_{50} que presentan son demasiado altos para ser buenos inhibidores ($>50 \mu M$). De los estudios de inhibición realizados con los tres compuestos se deduce que LP1 (con el menor IC_{50} de los compuestos LPs) actúa como inhibidor competitivo mientras que LP2 (que inhibe al 100% la actividad) y D5 llevan a cabo su acción inhibitoria mediante un tipo de inhibición no competitivo.

A partir de la estructura de LP1 y LP2 se pueden diseñar compuestos de segunda generación que mejoren la inhibición de la actividad de la *LepFNR* y así avanzar en el descubrimiento de fármacos para tratar la *Leptospirosis*.

Abstract

This work is within a line of research focused on the search for compounds that show bactericidal action against the pathogenic microorganism *Leptospira interrogans* which causes the disease called Leptospirosis, a zoonosis widely spread worldwide.

Leptospira is a Gram-negative bacterium that presents in its metabolism an enzyme, the Ferredoxin NADP (H) reductase (*LepFNR*) that is being studied as a pharmacological target in other pathogenic organisms (FPR of the phytopathogen *Xanthomonas*). Their structural and functional differences with the analogous ones present in eukaryotic organisms make this protein a good candidate to act on it and that does not affect the host.

Weill's disease (Leptospirosis in humans) ranges from mild to severe, and in these latter cases renal failure can cause death, so finding a treatment or a vaccine would be a way to stop the spread of this disease.

In this report the power of inhibition of *LepFNR* activity of 7 compounds (LP1-LP7) identified by a massive screening of a library formed by 1120 compounds is studied. In addition, another compound has been studied, D5, which is a good candidate as an inhibitor of the analogous enzyme in *Xanthomonas*. The objective was to verify if this same compound could be promising in another type of microorganism with different characteristics in a protein with similar function.

This work consisted in the measurement of the IC_{50} of these compounds by the activity diaphorase of *LepFNR* and the study of the type of inhibition exerted by three of them on it activity (LP1, LP2 and D5). With the obtained data, global adjustments have been made to the Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk (inverse) functions, both modified by the inhibition factor, which allows determining the type of inhibition.

It has been concluded that, although all the compounds studied inhibit the activity of *LepFNR* at least up to 80%, the IC_{50} values present are too high to be good inhibitors ($> 50 \mu M$). From the inhibition studies carried out with the three compounds, it can be deduced that LP1 (with the lowest IC_{50} of the LPs compounds) acts as a competitive inhibitor, while LP2 (which inhibits activity at 100%) and D5 carry out their inhibitory action by a type of non-competitive inhibition.

From the structure of LP1 and LP2, second-generation compounds can be designed that improve the inhibition of *LepFNR* activity and thus advance in the discovery of drugs to treat Leptospirosis.

Introducción

Las FNRs (Ferreodoxina NADP(H) reductasas) son un tipo de enzimas monoméricas que contienen como grupo prostético un dinucleótido de adenina y flavina denominado FAD, unido de manera no covalente.^[1] Su papel biológico es la transferencia reversible de electrones entre el NADP(H) y diferentes donadores de electrones, entre los que encontramos la ferredoxina y la flavodoxina.

La reacción catalizada por este tipo de enzimas es la siguiente:



Por análisis de secuencia, se han clasificado las FNRs en dos grandes grupos; tipo GR o glutatión reductasa y tipo planta. Las de tipo planta, a su vez, se subdividen en plastídicas y bacterianas. Las FNRs plastídicas están involucradas en el proceso de fotosíntesis de organismos como algas, cianobacterias y numerosos vegetales, así como en tejidos no fotosintéticos como raíces o semillas. Por otro lado, las FNRs bacterianas (denominadas FPRs) catalizan la transferencia de equivalentes de reducción desde el NADPH a flavodoxinas o ferredoxinas, los cuales son incorporados a su cadena y son parte de procesos ante respuesta a estrés oxidativo, fijación de nitrógeno o detoxificación.^[4,5,6] Esto implica que el proceso en este tipo de FNRs es en el sentido de la oxidación de NADPH a NADP⁺ en la reacción 1.

Es importante destacar que las FNRs plastídicas se han encontrado también en apicoplastos en organismos parásitos obligados como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* y *Leptospira interrogans*.^[1,5] Al comparar la secuencia de las FNRs de estos organismos con las anteriores ya mencionadas, se ha observado que las pertenecientes a *P. falciparum* y *T. gondii* muestran elevada homología con las presentes en raíces de plantas superiores, mientras que la de *L. interrogans* comparte algunas características con FNRs tanto fotosintéticas como de las raíces, aunque podríamos clasificarlas dentro de un grupo concreto.^[1]

Debido a esta excepcionalidad, el estudio de *Leptospira* puede ayudar a encontrar relaciones entre organismos o nuevas funciones de enzimas.

Leptospira es un género bacteriano del orden de las espiroquetas, que incluye tanto especies saprófitas como patógenas. Más concretamente, se han encontrado 13 especies patogénicas. Todas ellas comparten características morfológicas, como su forma de espiral de 6-20 µm de largo y un diámetro de 0.1 µm. Como distintivo de estas espiroquetas, encontramos que en ambos extremos tienen una curva en forma de gancho y gracias a unos filamentos axiales (axostilos) son bacterias móviles. En cuanto a su membrana externa, podemos clasificarlas dentro de Gram negativas (el lipopolisacárido tiene una estructura muy similar con las Gram negativas típicas), aunque presenta una glucosamina fosforilada y metilada.^[3]

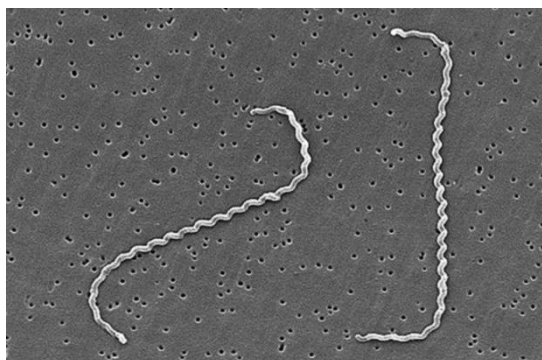


Figura 1. Micrografía de barrido de *Leptospira interrogans*. ^[7]

La relevancia de la FNR en este microorganismo es que podría postularse como un mecanismo avanzado de infección en el hospedador. Además, al no haber flavoproteínas relacionadas filogenéticamente en animales, podría usarse como diana farmacológica en el tratamiento de la infección por este patógeno.

Cuando la infección por *L. interrogans* es severa causa una enfermedad denominada leptospirosis.

La leptospirosis o enfermedad de Weill es una enfermedad sistémica que afecta a animales (mayormente) y humanos y que cursa con fiebre, insuficiencia renal y hepática, manifestaciones pulmonares... Es una zoonosis que afecta de forma mayoritaria a animales domésticos como perros, caballos y cerdos. Se transmite a través de la orina de animales infectados y no se han observado casos de transmisión humano a humano. *Leptospira* vive en los túbulos proximales de los riñones de los portadores; sin embargo, no se conoce el modo en el que se asocia a las células del epitelio. ^[3]

Esta enzima fue la primera que se encontró en una bacteria con características de FNR plastídica, pese a que las similitudes con las FNRs plastídicas tampoco son muy concluyentes. Las similitudes estructurales y bioquímicas que comparte con las FNRs de plantas revelan una transferencia lateral de genes que a nivel de *L. interrogans* podría haberle conferido ventajas evolutivas. *LepFNR* forma monómeros en disolución. Esta enzima acomoda el FAD en una conformación extendida entre los dos dominios de la proteína. ^[2]

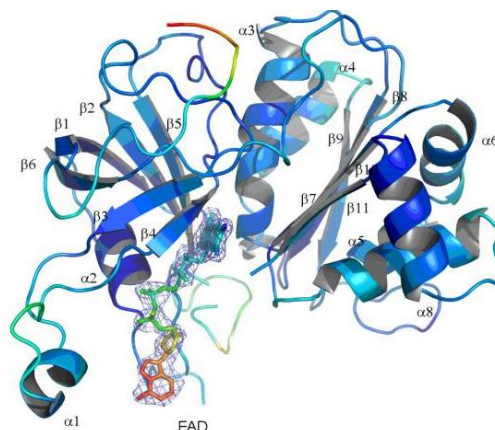


Figura 2. Estructura de *LepFNR* en modelo de cintas. Los elementos de estructura secundaria se muestran como espirales (hélices alfa) o como flechas (hebras beta). El cofactor FAD se representa en varillas en su zona de unión a proteína

El grupo FAD se une a la enzima mediante una red de puentes de hidrógeno. Entre los residuos que intervienen en esta unión, encontramos que los más relevantes son Ser97, Ile115, Lys117 y Leu95. Un aspecto muy importante es que en el caso de *LepFNR*, la Ile115 es determinante en el reconocimiento de la flavina y sin embargo no es un residuo conservado en todas las FNRs. Además, *LepFNR* acomoda el FAD en una conformación extendida en contraste a la conformación plegada que presenta dicho cofactor en las FNRs plastídicas.

Como ya hemos mencionado antes, las características de esta enzima nos permiten pensar en ella como una diana farmacológica en el tratamiento de la Leptospirosis. Gracias a lo que sabemos de las reductasas, usar o diseñar inhibidores específicos puede ser un modo de combatir la infección y supervivencia de *Leptospira*.

Previamente al estudio aquí realizado, se llevó a cabo una búsqueda masiva de posibles compuestos inhibidores de *LepFNR* usando una librería de compuestos químicos como fuente de pequeñas moléculas. Esta librería contenía 1120 moléculas compuesta de un 90% de fármacos comercializados y un 10% de alcaloides bioactivos o derivados. Los compuestos se seleccionaron por un cribado de alto rendimiento (High-throughput screening) realizado en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), del que se seleccionaron 84 compuestos que inhibían la actividad reductasa in vitro (actividad diaforasa) de la *LepFNR*. De estos compuestos, en este trabajo se han estudiado 7 a los que se han denominado LP1-LP7.

La actividad diaforasa es la capacidad que presentan algunas enzimas de catalizar la transferencia de electrones desde el sustrato (en este caso NADPH) a diversos aceptores artificiales. El aceptor usado aquí es el 2,6-diclorofenolindofenol o DCPIP, que es capaz de aceptar dos electrones en un único paso. Esto permite sustituir a la ferredoxina (aceptor natural de la *LepFNR*) proporcionando un grado de color azul medible, gracias a que su máximo de absorción se encuentra a 620 nm ($\epsilon_{620} = 21 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y al aceptar los electrones del NADPH disminuye dicha absorción tornando de azul a incoloro. La pérdida de absorbancia se relaciona directamente con la velocidad inicial de reacción.

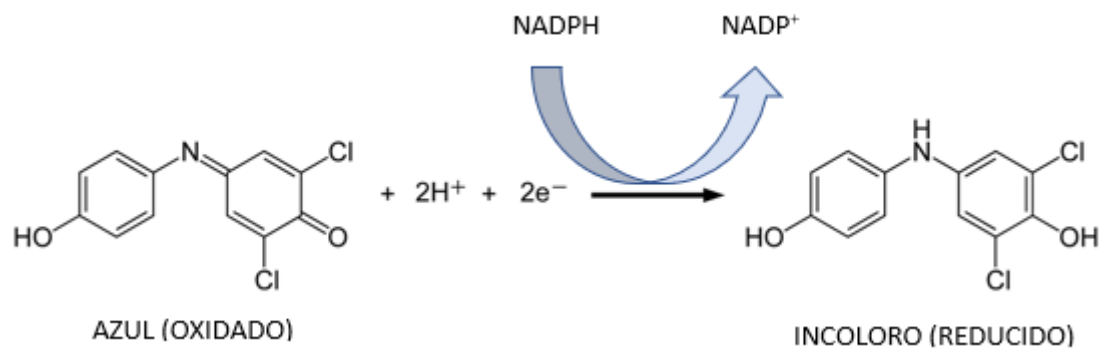


Figura 3. Reducción del DCPIP. Se observa que, al aceptar los dos electrones, la reducción implica un cambio de color; más concretamente el paso de azul a incoloro.

A continuación, vamos a exponer el estudio realizado con 8 compuestos que se seleccionaron por inhibir la actividad diaforasa de la *LepFNR*. Con 3 de ellos se ha estudiado el mecanismo de inhibición con el que actúan. Con ello se avanza en la búsqueda de fármacos que actúen de manera específica y efectiva sobre esta enzima sin afectar al hospedador.

Material y métodos

Material biológico

Se partió de una solución pura de *LepFNR* a una concentración de 13,26 μM en Tris/HCl 50 mM, pH 8. La concentración de la enzima en los experimentos cinéticos fue de 4nM en la mezcla de reacción.

Medidas de la actividad diaforasa con DCPIP

Los ensayos cinéticos se llevaron a cabo en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8 a 25 °C. La concentración de enzima fue de 4 nM y como sustrato de la misma, se usó NADPH 1 mM, de forma que las adiciones de sustrato a la mezcla de reacción fueron entre 0.5-70 μL . El espectrofotómetro utilizado fue un UV-Visible Cary 100.

Tabla 1. Relación de volúmenes (en μL) de los componentes de la mezcla de reacción en el ensayo de la actividad diaforasa de la *LepFNR*.

	Referencia	Muestra
Tris/HCl 50 mM, pH 8	800	496-y-z
DCPIP (0.19 mM)	200	500
NADPH (1 mM)	--	y
<i>LepFNR</i> (1 μM)	--	4
DMSO (100%)	--	z

Para medir la actividad diaforasa de *LepFNR* se registró en el espectrofotómetro el descenso de la absorbancia (debido a la reducción del DCPIP) a 620 nm durante 30 s. La pendiente en los primeros instantes de la reacción corresponde a la velocidad inicial del proceso. Esto se realizó a distintas concentraciones de NADPH para obtener datos cinéticos que luego se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, donde $v_{\text{máx}}$ es la velocidad inicial máxima, $[S]$ es la concentración de sustrato (NADPH) y K_M es la constante de Michaelis-Menten.

$$v = \frac{v_{\text{máx}} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Ecuación 1. Ecuación de Michaelis-Menten.

La actividad diaforasa de *LepFNR* se midió también en presencia de 2% de DMSO (disolvente de los compuestos) para comprobar si afectaba o no a los parámetros cinéticos de la enzima. Los volúmenes de los reactivos fueron los mismos que los mostrados en la tabla 1 pero añadiendo 20 μL de DMSO al 100% que se restaron al volumen añadido de tampón Tris/HCl 50 mM, pH 8.

Determinación del IC_{50}

El IC_{50} de un compuesto es la concentración del mismo necesaria para inhibir la actividad enzimática a la mitad del valor que presenta la enzima en ausencia de dicho compuesto. Las medidas de actividad diaforasa se llevaron a cabo a una concentración fija de NADPH (50 μM),

a la que este sustrato satura a la enzima y concentraciones crecientes de los distintos compuestos. Los volúmenes utilizados fueron los siguientes:

Tabla 2. Relación de volúmenes (en μL) utilizados en la medida de la actividad diaforasa de la *LepFNR* para la determinación del IC_{50} de los compuestos.

	Referencia	Muestra
Tris/HCl 50 mM, pH 8	800	426
DCPIP (0.19 mM)	200	500
NADPH (1 mM)	--	50
Compuesto (10-100 mM)	--	y
<i>LepFNR</i> (1 μM)	--	4
DMSO (100%)	--	20-y

La concentración de inhibidor añadida a la mezcla de reacción varía en función de la concentración final que queremos estudiar. El volumen del mismo cambiará de forma que no se supere el 2% de DMSO.

A partir de los valores de velocidad inicial a diferentes concentraciones de compuesto se calculan las constantes cinéticas aparentes (velocidades divididas por la concentración de enzima) y estas se refieren a los valores respecto a la enzima sin compuesto, obteniendo el % de actividad. Este % de actividad se representa frente al logaritmo de la concentración correspondiente de cada compuesto. Los datos se ajustan a la ecuación de dosis-respuesta (ecuación 2), donde A_1 corresponde a la absorbancia mínima, A_2 a la absorbancia máxima, p al factor de Hill y x_0 proporciona el valor del IC_{50} .

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

Ecuación 2. Ecuación dosis-respuesta.

Estudio del tipo de inhibición

El estudio del tipo de inhibición de la actividad de la *LepFNR* por un compuesto determinado se realizó mediante medidas de la actividad enzimática a distintas concentraciones de dicho compuesto. Los datos cinéticos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1) y se linealizaron mediante la representación de Lineweaver-Burk (LB).

En el caso de la inhibición reversible, existen tres mecanismos de inhibición que suponen una modificación de la ecuación de Michaelis-Menten, introduciendo un factor α ($\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$), el cual puede afectar a la $v_{\max}$ (inhibición no competitiva), K_M (competitiva) o a ambas (acompetitiva). En la expresión del factor α , $[I]$ hace referencia a la concentración del compuesto ensayado ("inhibidor") y la K_I a la constante de disociación de los diferentes complejos enzima-inhibidor que se pueden formar. Tal y como está definida, valores altos de esta constante implican poca inhibición y mayor actividad enzimática.

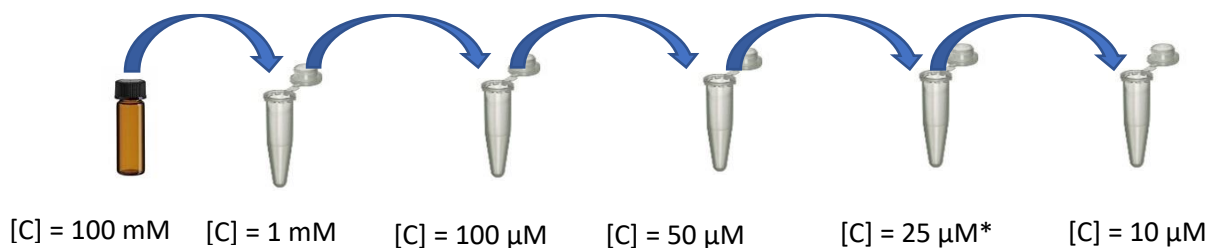
Para el estudio del tipo de inhibición, se eligieron concentraciones de los compuestos por encima y por debajo del IC_{50} , y para cada una de ellas se realizaron medidas de la actividad variando la concentración de NADPH. Los volúmenes elegidos vienen recogidos en la siguiente tabla:

Tabla 3. Relación de volúmenes (en μL) utilizados en la determinación del tipo de inhibición de los distintos compuestos.

	Referencia	Muestra
Tris/HCl 50 mM, pH 8	800	476-x
DCPIP (0.19 mM)	200	500
NADPH (1 mM)	--	x
Compuesto (10-100 mM)	--	y
<i>LepFNR</i> (1 μM)	--	4
DMSO (100%)	--	20-y

Determinación del coeficiente de extinción molar de los compuestos LPs

10 μg de cada compuesto se resuspendieron en DMSO (100%) para obtener una concentración final de 100 mM. A continuación, se realizaron diluciones seriadas de estas soluciones y con cada una de ellas se midió el espectro de absorbancia UV-vis en el rango de 200-600 nm, utilizando el espectrofotómetro Cary 100.



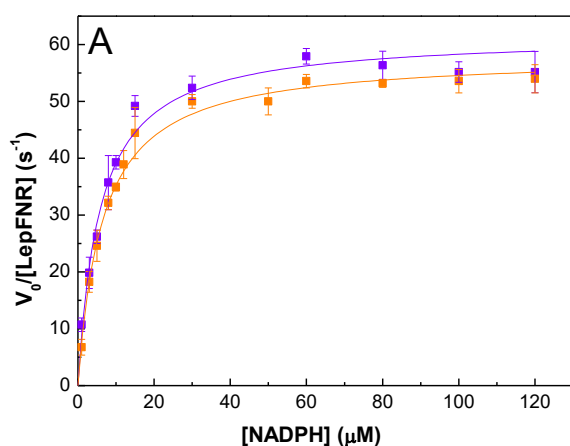
* La dilución de 25 μM solo se realizó en los casos en los que el valor de la absorbancia entre 200-600 nm a concentraciones superiores se salía del rango de medida del aparato.

* Todos los resultados y figuras que se muestran en este apartado han sido obtenidos con el programa OriginPro 8.0.

Resultados y discusión

Actividad diaforasa de LepFNR

Como punto de partida, se han caracterizado los parámetros cinéticos de *LepFNR* en presencia de DMSO, disolvente de los compuestos que se han estudiado para comprobar si dicho disolvente afecta a la actividad diaforasa de la enzima. La actividad se ensayó a concentraciones crecientes de NADPH y en presencia de DMSO al 2%.



B

	Sin DMSO	Con DMSO (2%)
K_M (μM)	$5,8 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,3$
k_{cat} (s^{-1})	$61,6 \pm 1,7$	$58,1 \pm 0,6$

Figura 4. Representación gráfica de los datos cinéticos de la actividad diaforasa de *LepFNR*. (A) Ajuste de la actividad diaforasa a la ecuación de MM en ausencia (naranja) y en presencia (morado) de DMSO (2%) y (B) valores de los parámetros de K_M y k_{cat} para ambos ajustes.

El resultado de los ensayos de control del efecto del DMSO (Figura 4) han mostrado diferencias no significativas (desvío menor de 10%). En base a este resultado, los experimentos que se realizaron en presencia de DMSO no superaron en ningún caso el 2% de DMSO en la mezcla de reacción.

Caracterización espectroscópica de los compuestos

Para la cuantificación de las soluciones de los compuestos estudiados se midió el valor de los coeficientes de extinción molar de cada uno de ellos. Los valores de los mismos se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Valores del coeficiente de extinción molar de los compuestos estudiados. En la primera columna, entre paréntesis, se muestra la longitud de onda en la que los espectros presentan un máximo, donde se calculó el valor de ϵ .

Compuesto	ϵ (mM ⁻¹ ·cm ⁻¹)
LP1 (298 nm)	7,20 ± 0,09
LP2 (291 nm)	15,90 ± 0,01
LP3 (306 nm)	4,40 ± 0,03
LP4 (313 nm)	5,30 ± 0,03
LP5 (361 nm)	22,30 ± 0,07
LP6 (368 nm)	21,90 ± 0,02
LP7 (261 nm)	19,0 ± 3,0

El coeficiente de extinción molar se determina realizando una serie de diluciones de los compuestos. Se hace un espectro de absorción en el rango de 250-600nm. Los valores de absorbancia máxima a una longitud de onda determinada se representan en función de la concentración, obteniendo una línea recta definida por una ecuación cuya pendiente es el coeficiente de extinción molar.

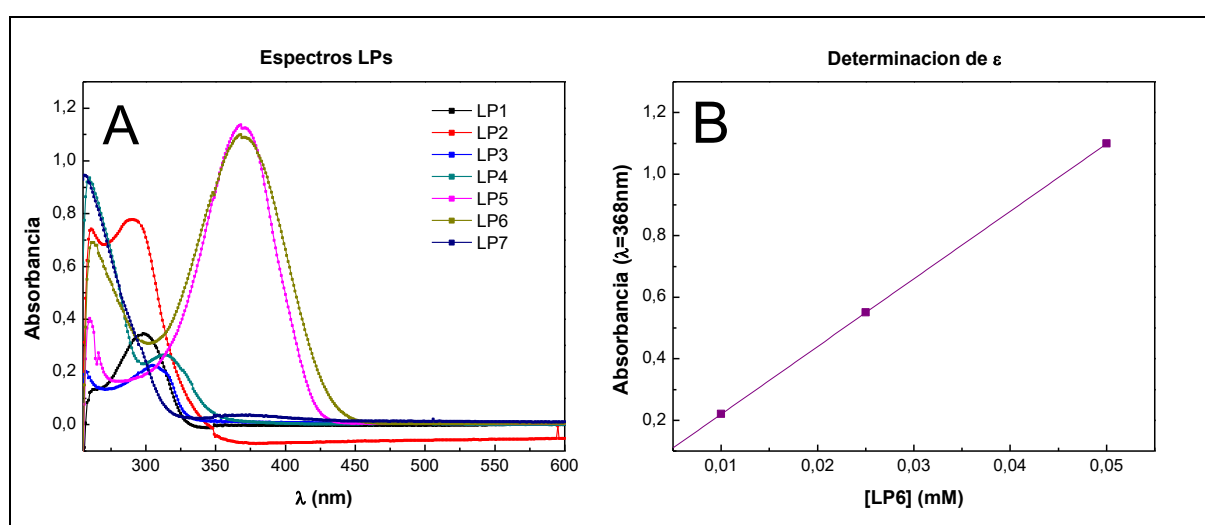


Figura 5. Representación gráfica del cálculo de ϵ para los LPs. (A) Espectros obtenidos de los distintos LPs y (B) regresión lineal de los datos obtenidos con LP6, aplicable al resto de LPs.

Valores de IC₅₀ de los compuestos LPs

La figura 6 muestra las representaciones gráficas de medidas de IC₅₀ ajustadas a la ecuación de dosis-respuesta (ecuación 2). Los 7 compuestos identificados en la quimioteca y el D5 elegido por inhibir a otra FNR presentan actividad inhibitoria (figura 6A). De los LPs, se eligieron dos junto al D5 para continuar con el estudio (figura 6B).

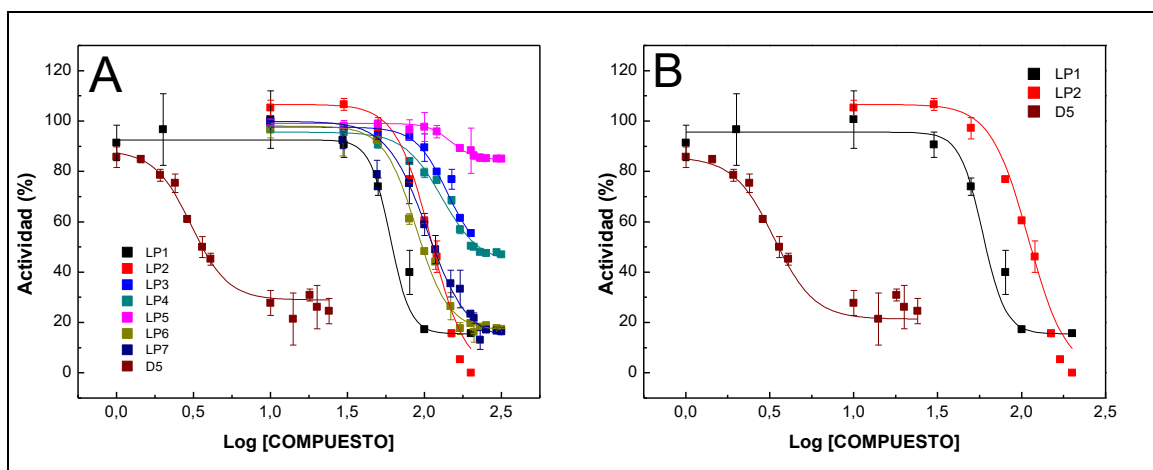


Figura 6. Curvas Dosis-Respuesta (A) de los compuestos ensayados y (B) solo los tres compuestos elegidos para estudiar el tipo de inhibición (LP1, LP2 y D5).

En la tabla 5 se muestran los valores deducidos de los ajustes de las gráficas de la figura 6. Además del IC_{50} , se calcularon los valores de las constantes cinéticas aparentes (k^{app}) y el % de inhibición a IC_{max} (mínimo valor de concentración de compuesto con el que se llega a inhibición máxima).

Tabla 5. Valores de IC_{50} , k^{app} y % de inhibición a IC_{max} para los compuestos estudiados.

	IC_{50} (μM)	K^{app} (s^{-1}) a IC_{max}	% Inhibición
LP1	$56,6 \pm 6,1$	$10,7 \pm 1,1$	84,3
LP2	$109,6 \pm 3,7$	0	100
LP3	$139,8 \pm 2,1$	$35,8 \pm 0,4$	44,5
LP4	$129,4 \pm 0,5$	$32,1 \pm 0,6$	53
LP5	$148,3 \pm 2,4$	$61,7 \pm 1,6$	15
LP6	$88,2 \pm 1,6$	$0,3 \pm 0,1$	82,6
LP7	$104,1 \pm 5,0$	$9,0 \pm 2,0$	83,6
D5	$3,3 \pm 2,7$	$9,5 \pm 1,5$	75,4

El compuesto LP1 muestra el menor valor para IC_{50} ($56,6 \mu M$) de todos los LPs aunque no llega a inhibir totalmente a la enzima (84% de inhibición). Por otro lado, el LP2, pese a mostrar un valor de IC_{50} casi el doble que LP1, consigue inhibir a la enzima totalmente. El compuesto LP5 es el que presenta el peor poder inhibitorio (15%), de forma que prácticamente la enzima se comporta en su presencia como si no estuviera. LP6 y LP7 consiguen una inhibición buena (~84%) pero sus IC_{50} superan el $50 \mu M$ en más de un 50 y 100% respectivamente. Como resultado de los ajustes de las curvas se han obtenido los valores correspondientes de IC_{50} y de las constantes cinéticas aparentes (k^{app}) y el % de inhibición a IC_{max} (mínimo valor de concentración de compuesto con el que se llega a inhibición máxima) (Tabla 5).

Estudio del tipo de inhibición de los compuestos LP1, LP2 y D5

Se estudió el tipo de inhibición de dos de los compuestos LPs (LP1 y LP2) y también del compuesto D5, que inhibe la actividad de la enzima FNR de *Xanthomonas*. Con esto se quería

averiguar cómo afectaba un compuesto que inhibe a una FNR bacteriana (*XacFNR*) a la actividad de una FNR plástica (*LepFNR*).

El compuesto LP1, con IC_{50} 56,6 μM se presenta como buen candidato como punto de partida para la generación de otros compuestos derivados de él que mejoren sus propiedades de inhibición. Por ello se eligió para estudiar el tipo de inhibición con el que actúa frente a *LepFNR*.

En cuanto al LP2, lo interesante del mismo es que llega a conseguir inhibir totalmente a *LepFNR* aunque presenta uno de los valores de IC_{50} más altos (109.6 μM) de los compuestos estudiados (Tabla 5).

Por último, el D5 presenta el valor de IC_{50} más bajo, lo cual es una ventaja *a priori*, además de ser interesante por el hecho de que inhibe a la FNR de *Xanthomonas*.

Se ensayó la actividad diaforasa de *LepFNR* en presencia de varias concentraciones de los compuestos LP1, LP2 y D5 a distintas concentraciones de NADPH. Después, los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 1). Los ajustes se muestran en la figura 7.

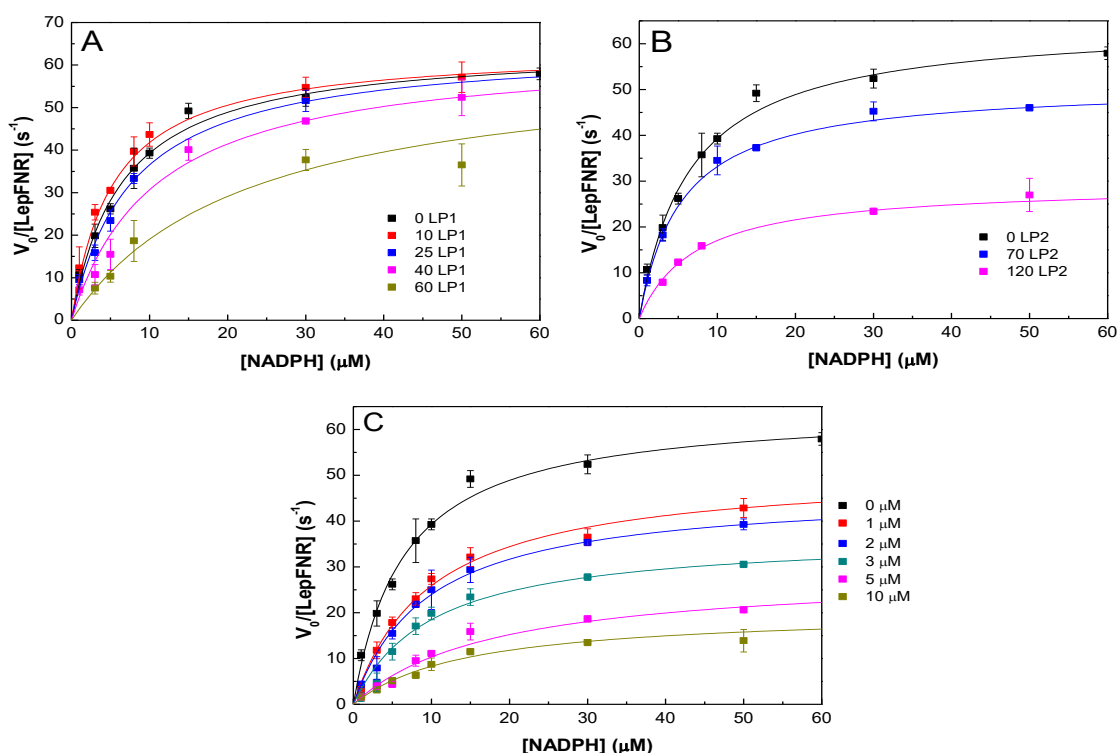


Figura 7. Datos cinéticos de la actividad diaforasa de la *LepFNR* ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten obtenidos a varias concentraciones (μM) de (A) LP1, (B) LP2 y (C) D5.

De los ajustes individuales de las curvas se calcularon los valores para los parámetros k^{app} y K_M . Dichos parámetros se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de K_M y k^{app} de la actividad diaforasa de la *LepFNR* a distintas concentraciones de los compuestos estudiados.

[LP1] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$	[LP2] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$	[D5] (μM)	$k^{app}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\mu\text{M})$
0	$64,7 \pm 2,3$	$6,5 \pm 0,7$	0	$64,7 \pm 2,3$	$6,5 \pm 0,7$	0	$64,7 \pm 1,9$	$6,5 \pm 0,6$
10	$64,0 \pm 2,3$	$5,3 \pm 0,4$	70	$51,0 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,3$	1	$51,3 \pm 3,0$	$9,8 \pm 1,3$
25	$56,8 \pm 1,6$	$6,0 \pm 0,8$	120	$29,3 \pm 1,0$	$7,2 \pm 0,6$	2	$46,7 \pm 1,6$	$9,5 \pm 0,9$
40	$63,9 \pm 4,6$	$10,8 \pm 2,7$				3	$36,9 \pm 1,6$	$10,0 \pm 1,6$
60	$61,7 \pm 9,0$	$22,4 \pm 6,0$				5	$28,9 \pm 1,9$	$18,0 \pm 2,7$
						10	$20,4 \pm 2,4$	$14,6 \pm 3,5$

Basándonos en la tendencia de los valores de los parámetros recogidos en la tabla 6, los compuestos LP1, LP2 y D5 podrían presentar diferentes comportamientos inhibitorios. LP1 se postula como un inhibidor competitivo, ya que los valores de K_M aumentan a medida que aumentamos la concentración de inhibidor. LP2, por su parte, muestra un comportamiento de inhibidor de tipo no competitivo, ya que k^{app} disminuye al aumentar la concentración de compuesto inhibidor mientras que la K_M permanece constante.

En cuanto a D5, se observa que los valores de k^{app} van disminuyendo a concentraciones crecientes de compuesto, mientras que los valores de K_M aumentan ligeramente.

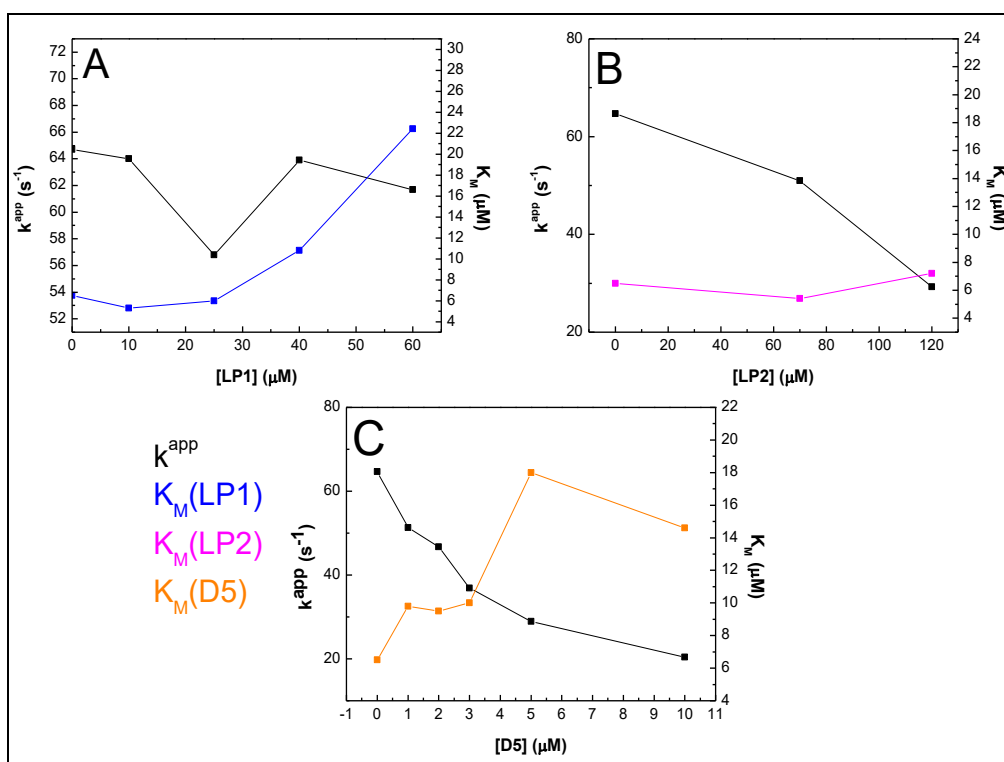


Figura 8. Representación que muestra la evolución de los parámetros de la actividad diaforasa (K_M , k^{app}) a concentraciones crecientes de compuesto. (A) LP1, (B) LP2 y (C) D5.

También se realizó un ajuste global a las ecuaciones modificadas de Michaelis-Menten así como a la ecuación de Lineweaver-Burk(LB) para los 3 tipos de inhibición. Los resultados de este ajuste global y la linealización se presentan en las figuras 9,10 y 11.

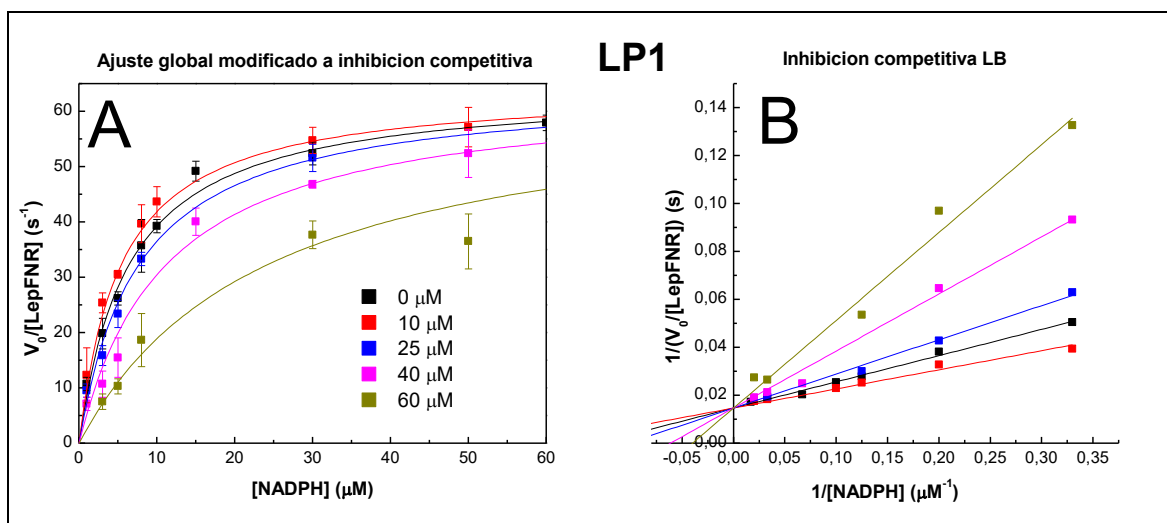


Figura 9. Representación gráfica de los ajustes globales a los datos cinéticos para la inhibición competitiva. (A) Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten modificada por el factor de inhibición y (B) linealización de Lineweaver-Burk para LP1.

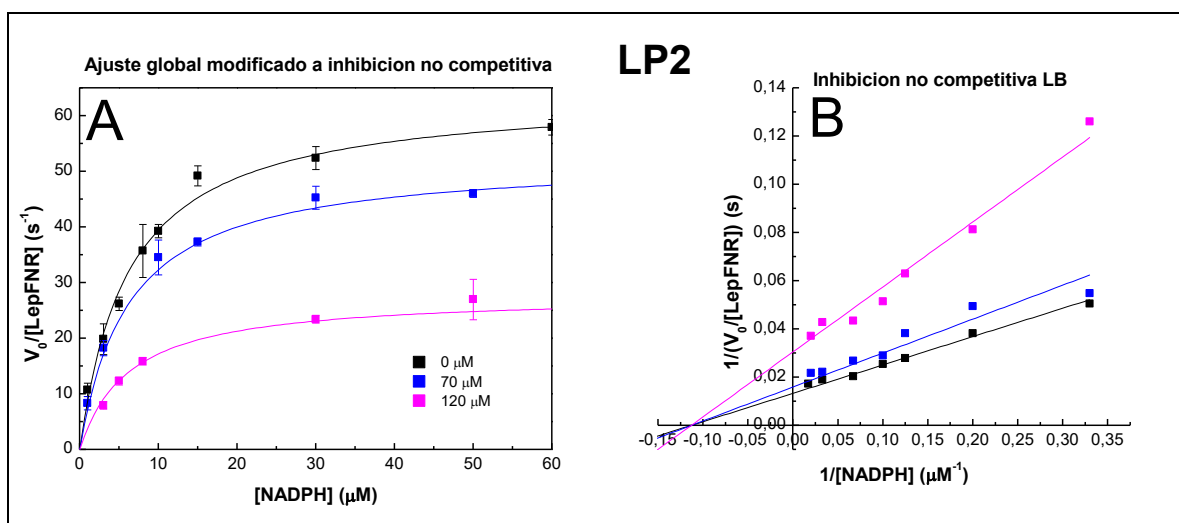


Figura 10. Representación gráfica de los ajustes globales a los datos cinéticos para la inhibición no competitiva. (A) Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten modificada por el factor de inhibición y (B) linealización de Lineweaver-Burk para LP2.

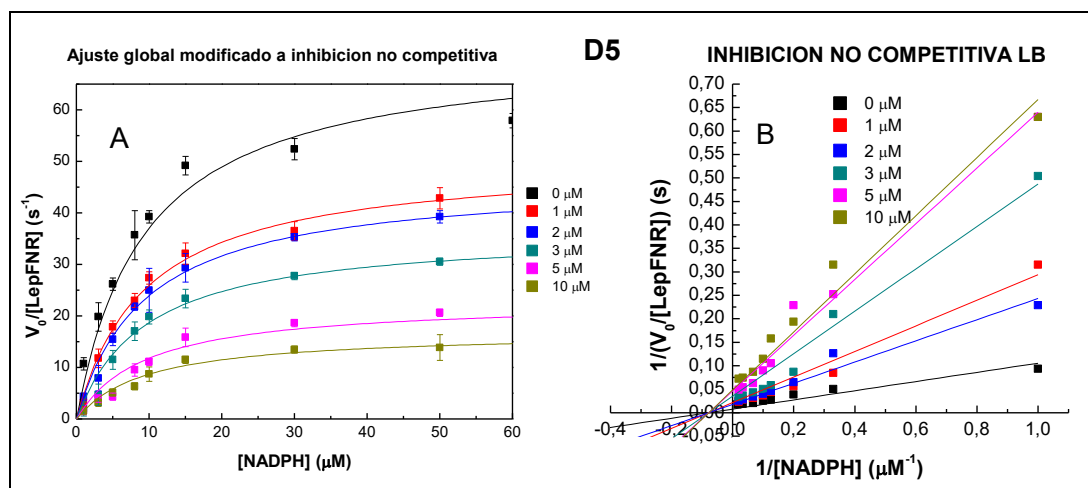


Figura 11. Representación gráfica de los ajustes globales a los datos cinéticos para la inhibición no competitiva. (A) Ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten modificada por el factor de inhibición y (B) linealización de Lineweaver-Burk para D5.

El coeficiente de regresión (R^2) que se obtiene de ambos ajustes y que se muestran en la tabla 7 permite definir el mecanismo de inhibición al que mejor se ajustan los datos (el que más se acerca a 1).

Tabla 7. Valores de R^2 de los ajustes globales a las ecuaciones de Michaelis-Menten (MM) y Lineweaver-Burk (LB) para los 3 compuestos.

	$R^2(LP1)$		$R^2(LP2)$		$R^2(D5)$	
	MM	LB	MM	LB	MM	LB
Competitiva	0,99	0,98	0,93	0,95	0,96	0,95
No competitiva	0,97	0,96	0,99	0,97	0,98	0,97
Anticompetitiva	0,94	0,76	0,97	0,83	0,93	0,78

Los resultados apuntan a que LP1 muestra un tipo de inhibición competitiva. LP2 un tipo de inhibición no competitiva y en el caso de D5 y en base al valor de los R^2 a los 3 tipos de inhibición (Tabla 7) podría actuar también con un mecanismo de inhibición no competitiva.

Las representaciones con el mejor R^2 proporcionan unos valores de los parámetros K_i (μM), K_M (μM) y k_{cat} (s^{-1}) que se muestran en la tabla 8, tanto para el ajuste de Michaelis-Menten (MM) como para la linealización de Lineweaver-Burk (LB).

Tabla 8. Parámetros obtenidos de los ajustes globales a Michaelis-Menten (MM) y Lineweaver-Burk (LB) que mejor se adecuan a los datos cinéticos para el tipo de inhibición competitivo de LP1 y no competitivo de LP2 y D5.

	LP1		LP2		D5	
	MM	LB	MM	LB	MM	LB
K_M (μM)	$4,6 \pm 0,5$	$3,5 \pm 1,4$	$6,2 \pm 0,4$	$2,3 \pm 1,3$	$9,4 \pm 0,7$	$4,2 \pm 0,3$
k_{cat} (s^{-1})	$64,4 \pm 2,5$	$67,8 \pm 4,9$	$65,6 \pm 0,7$	$48,0 \pm 4,3$	$63,3 \pm 5,3$	$62,6 \pm 4,8$
K_i (μM)	$12,4 \pm 0,8$	$7,0 \pm 2,2$	$10,9 \pm 1,9$	$9,7 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,5$

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, el mecanismo de inhibición de LP1 más probable es el de inhibición competitiva.

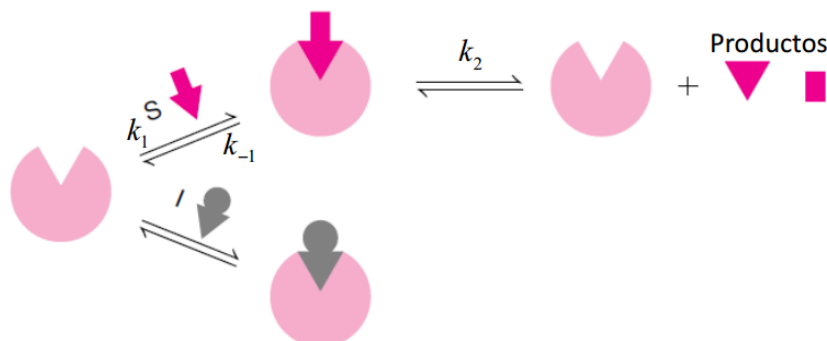


Figura 12. Esquema de la inhibición competitiva.

Este tipo de inhibición se caracteriza porque el inhibidor compite con el sustrato por unirse al mismo centro activo de la enzima y por tanto no pueden unirse de forma simultánea. Esta inhibición tiene lugar cuando el inhibidor posee una estructura similar a la del sustrato. Esta inhibición presenta valores de K_M distintos a los observados sin inhibidor (aumenta), mientras que la v_{max} no se ve afectada. Esto puede hacer pensar que la enzima tiene menos afinidad por el sustrato que la real.

Por su parte, el tipo de inhibición más probable que presentan los compuestos LP2 y D5 sobre la actividad de *LepFNR* es el no competitivo.

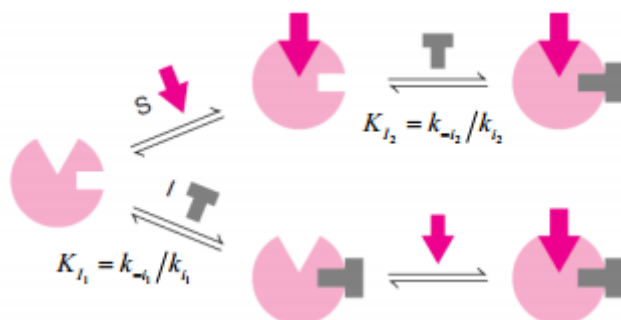


Figura 13. Esquema de la inhibición no competitiva.

Cuando tiene lugar la inhibición no competitiva, el inhibidor se une a la enzima en un sitio activo distinto al que se une el sustrato, así que puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. En este caso, se observan valores de v_{max} menores de los que se obtienen sin inhibidor, así que parece que la enzima es menos eficaz. En realidad, lo que ocurre es que como

parte de la enzima está con inhibidor, realmente no está disponible la totalidad de la enzima añadida a la mezcla de reacción.

En este tipo de inhibición, realmente existen dos K_i , una para la disociación del complejo enzima-inhibidor y otra para la disociación del complejo enzima-sustrato-inhibidor (Figura 13). Para simplificar los cálculos, en este trabajo se ha supuesto que ambas constantes tienen el mismo valor, eliminando un parámetro de la ecuación. Sin embargo, estudios posteriores deberían analizar si esto coincide con la realidad y si no es así, determinar los valores para ambas constantes. Así, se comprobaría si la unión del sustrato facilita o dificulta la unión de ambos compuestos.

Analizando la fórmula química de los compuestos LPs de este trabajo, se observan grupos conservados, como un grupo amino (-NH), un átomo de nitrógeno formando un triple enlace ($\equiv N$) y también un átomo de azufre. Estos grupos funcionales y el átomo de azufre podrían ser relevantes o imprescindibles para el proceso de inhibición. LP1 presenta un grupo fenilo sustituido por un tercpentilo y un benzotieno, mientras que LP2 es una benzamida sustituida por dos anillos aromáticos, presentando una estructura más grande y desplegada, lo que puede explicar que esto les permita interaccionar de forma diferente con la enzima y que muestren tipos de inhibición diferentes. D5 presenta también los elementos comentados de LP1 y LP2, aunque como singularidad respecto a ellos presenta también dos átomos de cloro. Presenta una estructura extendida con 3 anillos aromáticos, como LP2, y al igual que él podría ejercer un tipo de inhibición no competitiva. De esta manera, los dos átomos de cloro en su estructura podrían ser el elemento diferenciador que le permitiera ser más efectivo ($IC_{50} < 5\mu M$) que el compuesto LP2. Todas estas características químicas de los compuestos estudiados pueden usarse para el diseño de nuevos compuestos que contengan dichos elementos en su estructura. De esta manera se persigue mejorar la capacidad de inhibición, así como otras características fisicoquímicas de un futuro fármaco (p.e. solubilidad en solventes acuosos, baja toxicidad...).

En este trabajo se han estudiado 7 compuestos de 84 identificados a partir de una quimioteca de 1120, por lo que queda el estudio de los compuestos restantes, seleccionando aquellos que presenten valores de IC_{50} menores de $< 50\mu M$, ya que no hay que olvidar que el objetivo es encontrar un fármaco que actúe sobre la *LepFNR* en *Leptospira* cuando es un hospedador de un ser vivo, y manejar cantidades muy elevadas puede tener efectos negativos en el mismo. Por último, los experimentos *in vivo* tanto de estos como de nuevos compuestos inhibidores de *LepFNR* podrían mostrar procesos tales como mecanismos de protección de la bacteria *Leptospira* contra dichos compuestos, como bombas de expulsión o procesos de modificación de la enzima diana.

Conclusiones

- ✓ Los siete compuestos estudiados inhiben la actividad diaforasa de la *LepFNR* con $IC_{50} > 50 \mu M$.
- ✓ El compuesto LP1 muestra el menor valor de IC_{50} ($56,6 \mu M$) y LP2 inhibe totalmente a la enzima.
- ✓ El compuesto D5, seleccionado por actuar contra una FPR de fitopatógeno, presenta el menor valor de IC_{50} ($3,3 \mu M$) e inhibe el 75% de la actividad de *LepFNR*.
- ✓ El compuesto LP1 podría actuar a través de un mecanismo de inhibición competitiva sobre *LepFNR* mientras que LP2 y D5 podrían actuar como inhibidores no competitivos.
- ✓ Algunos grupos químicos, como el grupo amina ($-NH$), un átomo de azufre y un átomo de nitrógeno ($\equiv N$) están presentes en la estructura química de todos los inhibidores y podrían ser claves en la inhibición y por tanto en el diseño de futuros inhibidores mejorados.

Conclusions

- ✓ The seven compounds studied inhibit the diaphorase activity of *LepFNR* with $IC_{50} > 50 \mu M$.
- ✓ Compound LP1 shows the lowest value of IC_{50} ($56.6 \mu M$) and LP2 totally inhibits the enzyme.
- ✓ Compound D5, selected for acting against a phytopathogenic FPR, has the lowest IC_{50} value ($3.3 \mu M$) and inhibits 75% of *LepFNR* activity.
- ✓ Compound LP1 could act through a mechanism of competitive inhibition on *LepFNR* whereas LP2 and D5 could act as non-competitive inhibitors.
- ✓ Some chemical groups, such as the amine group (-NH), a sulfur atom and a nitrogen atom ($\equiv N$) are present in the chemical structure of all the inhibitors and could be key in the inhibition and therefore in the design of future inhibitors improved.

Bibliografía

- [1] Catalano-Dupuy, Daniela L., Matías A. Musumeci, Arleth López-Rivero, y Eduardo A. Ceccarelli. «A highly stable plastidic-type Ferredoxin-NADP (H) reductase in the pathogenic bacterium *leptospira interrogans*». *PloS one* 6, n.º 10 (2011): e26736.
- [2] Nascimento, Alessandro S., Daniela L. Catalano-Dupuy, Amanda Bernardes, Mario de Oliveira Neto, Maria Auxiliadora M. Santos, Eduardo A. Ceccarelli, y Igor Polikarpov. «Crystal structures of *Leptospira interrogans* FAD-containing ferredoxin-NADP⁺ reductase and its complex with NADP⁺». *BMC structural biology* 7, n.º 1 (2007): 69.
- [3] Adler, Ben, y Alejandro de la Peña Moctezuma. «Leptospira and leptospirosis». *Veterinary Microbiology, Zoonoses: Advances and Perspectives*, 140, n.º 3 (27 de enero de 2010): 287-96.
- [4] Arakaki, A. K., E. A. Ceccarelli, y N. Carrillo. «Plant-Type Ferredoxin-NADP⁺ Reductases: A Basal Structural Framework and a Multiplicity of Functions.» *The FASEB Journal* 11, n.º 2 (2 de enero de 1997): 133-40.
- [5] Ceccarelli, Eduardo A., Adrián K. Arakaki, Néstor Cortez, y Néstor Carrillo. «Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1698, n.º 2 (6 de mayo de 2004): 155-65.
- [6] Aliverti, Alessandro, Vittorio Pandini, Andrea Pennati, Matteo de Rosa, y Giuliana Zanetti. «Structural and functional diversity of ferredoxin-NADP⁺ reductases». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Special Issue: Enzymology in Europe, 474, n.º 2 (15 de junio de 2008): 283-91.
- [7] «Details - Public Health Image Library(PHIL)». Accedido 9 de noviembre de 2017. <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=1220>.

Anexos

Tabla A.1. Ecuación de Michaelis-Menten y linealización de Lineweaver-Burk sin inhibición y para cada tipo de inhibición.

	Función:	Inverso de Lineweaver-Burk
Michaelis-Menten (M-M)	$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} S} + \frac{1}{V_{\max}}$
M-M con inhibición competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$
M-M con inhibición acompetitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_I'}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{S V_{\max}} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_I'}}{V_{\max}}$
M-M con inhibición no competitiva	$v = \frac{V_{\max}[S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$	$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1 + \frac{[I]}{K_I}}{S}$

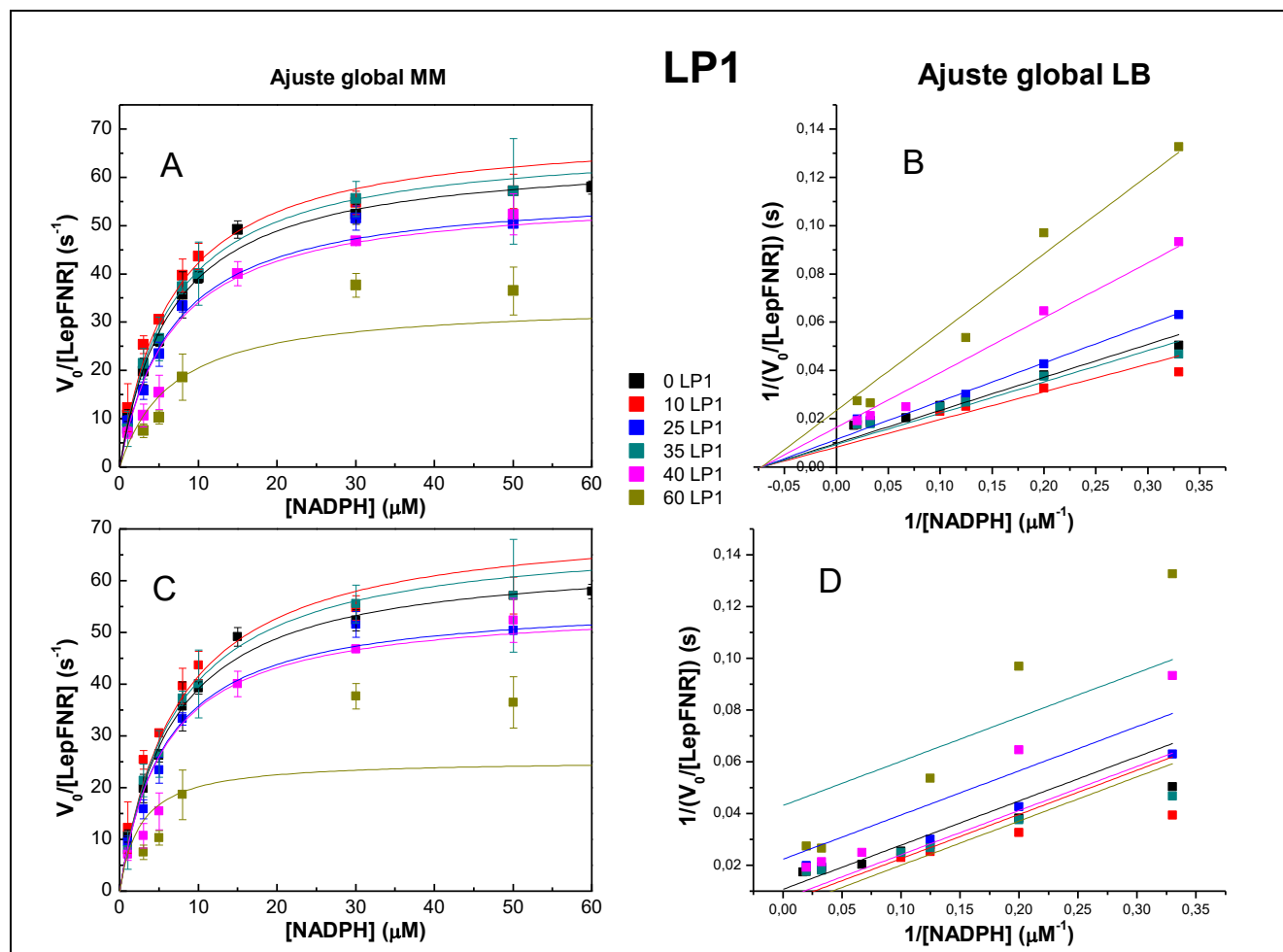


Figura A.1. Representaciones gráficas de los ajustes globales a los datos cinéticos para la ecuación de Michaelis-Menten (A, C) y su inverso Lineweaver-Burk (B, D) modificadas por el factor de inhibición de tipo no competitivo (A, B) y anticompetitivo (C, D).

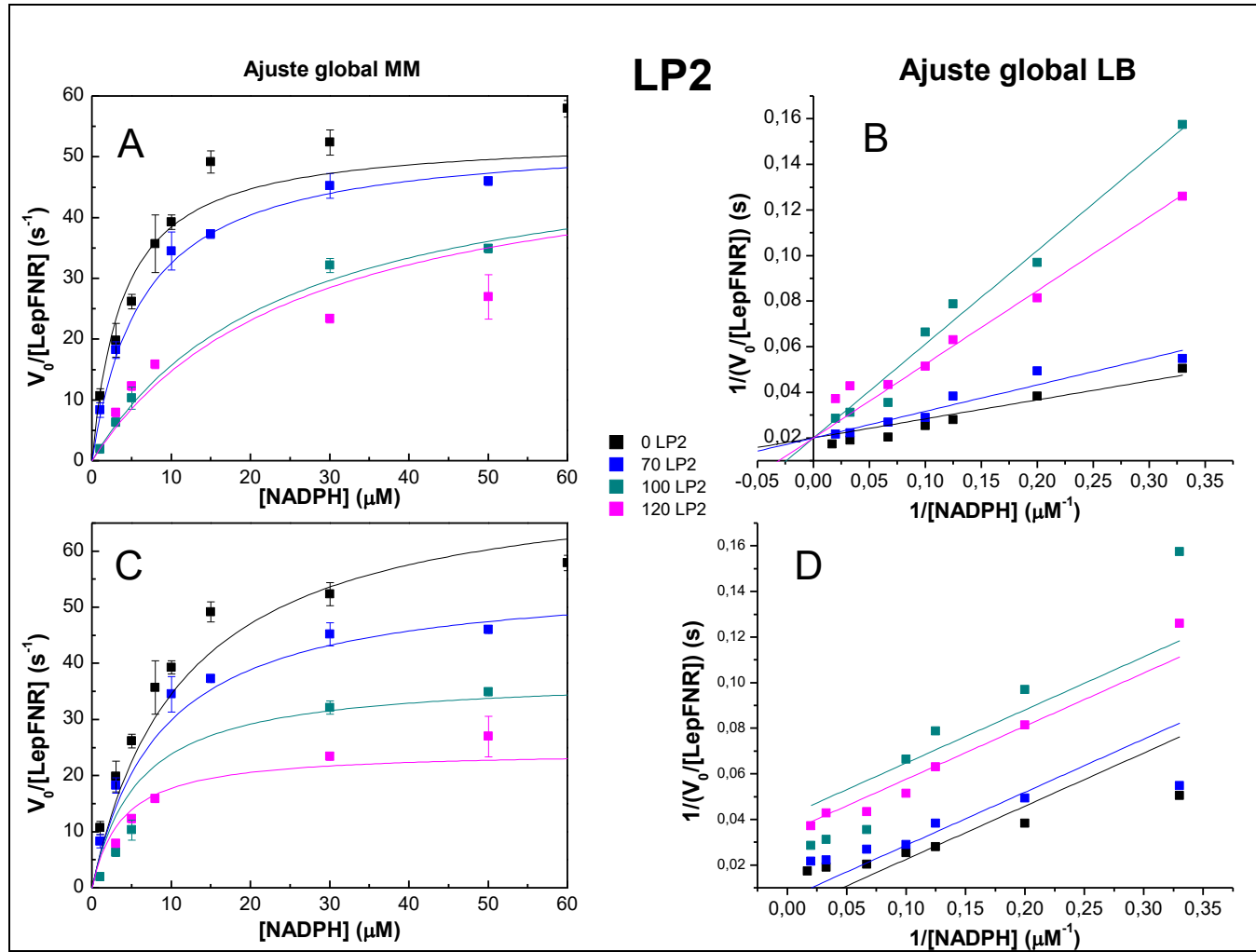


Figura A.2. Representaciones gráficas de los ajustes globales a los datos cinéticos para la ecuación de Michaelis-Menten (A, C) y su inverso Lineweaver-Burk (B, D) modificadas por el factor de inhibición de tipo competitivo (A, B) y anticompeticitivo (C, D).

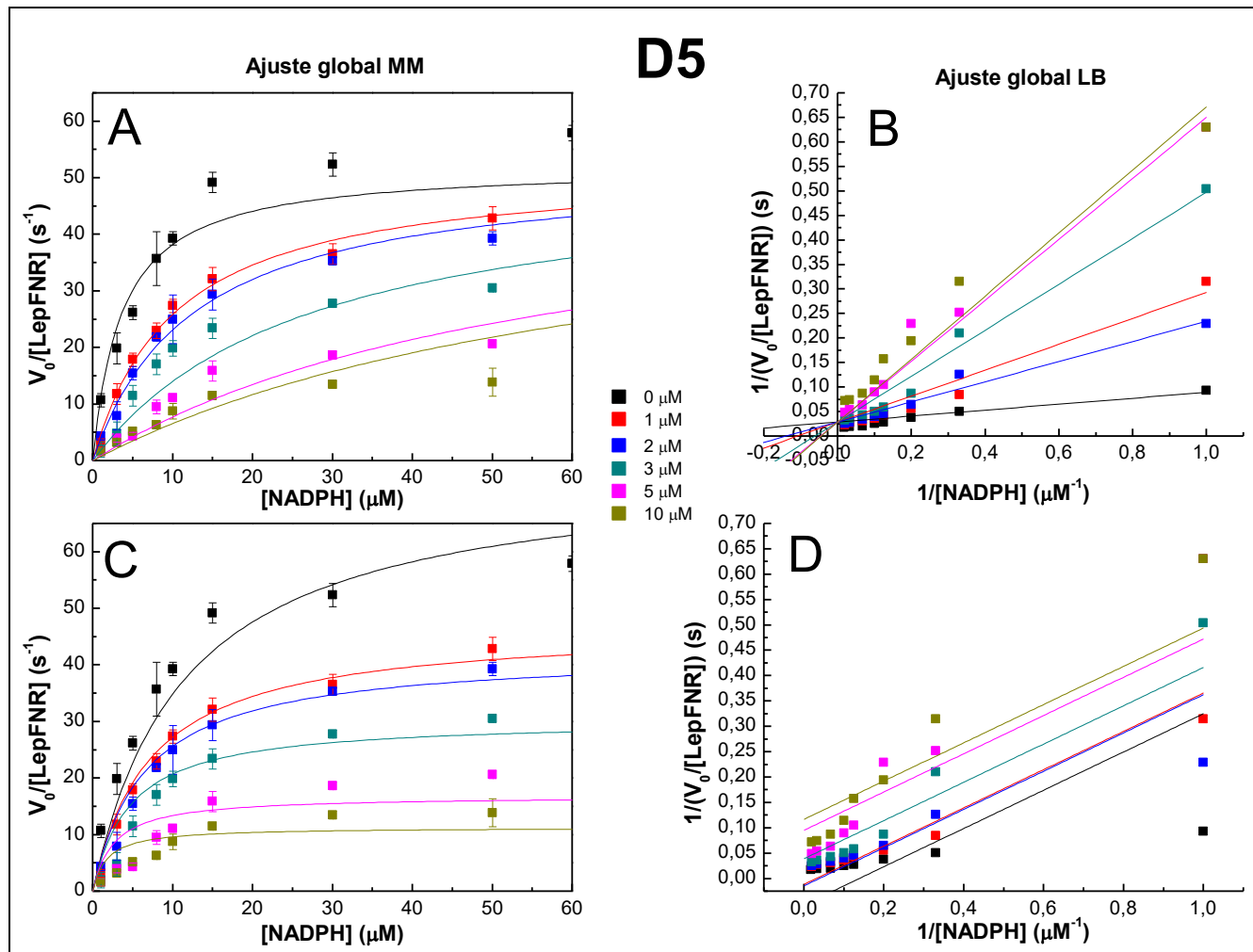


Figura A.3. Representaciones gráficas de los ajustes globales a los datos cinéticos para la ecuación de Michaelis-Menten (A, C) y su inverso Lineweaver-Burk (B, D) modificadas por el factor de inhibición de tipo competitivo (A, B) y anticompetitivo (C, D).