

Informe final publicable de proyecto

Metagenómica aplicada al descubrimiento de nuevas enzimas redox

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_166635

Fecha de cierre de proyecto: 01/04/2025

MANTA PORTEIRO, Bruno (Responsable Técnico - Científico)

COMINI OLMEDO, Marcelo Alberto (Investigador)

COSTA DUARTE, Daniela (Investigador)

IRAOLA BENTANCOR, Gregorio Manuel (Investigador)

ZEIDA CAMACHO, Ari Fernando (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \

INSTITUTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE ROSARIO, UNIVERSIDAD DE ROSARIO (CONICET-UNR), ARGENTINA \ \ NEW ENGLAND BIOLABS, INC. \

UNIVERSIDAD DE BARCELONA \ \ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA \ \ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

Durante décadas el paradigma central de la biología redox fue que ciertos aminoácidos reactivos son blanco de oxidantes y que los seres vivos poseen enzimas antioxidantes para reparar el “daño oxidativo”. Hoy sabemos que varias enzimas “antioxidantes” son traductores de señales que median entre oxidantes fisiológicos y factores de transcripción. La mayoría de estas enzimas dependen de la oxidación reversible de cisteína. A diferencia de lo que sucede con la cisteína, la oxidación reversible de metionina a sulfóxido de metionina (MSO) ha recibido menos atención y su rol en biología está menos explorado. Varios organismos poseen metionina sulfóxido reductasas (MSR), lo que sugiere que ésta oxidación es biológicamente relevante. Recientemente se descubrió una familia de enzimas con capacidad de oxidar metionina y su descubrimiento auguraba la existencia oxidadas y reductasas capaces de generar ciclos de regulación centrados en la oxidación reversible de metionina, análogo al formado por quinasas y fosfatasa. Sin embargo, desde entonces muy pocas MOX han sido descubiertas y aprendimos que las MSR no son tan ubicuas como originalmente considerábamos. Este proyecto se basó en la hipótesis de que existen nuevas MSR y MOX por descubrir, fundamentalmente en procariotas. Para descubrir en este proyecto nos propusimos combinar genómica comparativa, metagenómica funcional, ingeniería de genomas y bioquímica de proteínas encontrar estas enzimas. En el proceso se requirió la implementación de técnicas que no se usaban corrientemente en nuestra comunidad así como el desarrollo de nuevas herramientas. Completamos el proceso con éxito, teniendo como principales resultados la formación de recursos humanos, publicaciones en revistas internacionales y enzimas nuevas descubiertas por los métodos desarrollados en este trabajo, para continuar su caracterización. Un resultado intangible pero de gran valor es la sólida red de colaboradores nacionales y extranjeros que fue nutrida gracias a su participación en este proyecto.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Biología Redox

Palabras clave: metagenómica / biología redox / metionina /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Desde sus orígenes en la década del '80, el paradigma central de la biología redox fue que ciertos aminoácidos poco abundantes como ser cisteína, metionina o triptófano son blanco in vivo de moléculas oxidantes como el peróxido de hidrógeno, hipoclorito o peroxinitrito, resultando en aminoácidos “dañados” para cuya reparación los seres vivos cuentan con mecanismos enzimáticos específicos [1]. Sin embargo, en la última década el trabajo varios grupos (incluyendo importantes aportes desde Uruguay) han contribuido a cambiar este paradigma al descubrir que ciertas enzimas tradicionalmente identificadas como “antioxidantes” actúan en realidad como “antenas” de oxidantes, siendo modificadas por éstos y transmitiendo la señal redox hacia moléculas efectoras, principalmente factores de transcripción [2], [3], [4]. A diferencia de lo que sucede con la cisteína, cuya oxidación está ampliamente reportada como un mecanismo reversible y controlado de traducción de señales redox [10], la oxidación reversible de metionina ha recibido menos atención y su rol en biología está poco explorado [6], [7]. Las razones fundamentales son que los métodos proteómicos son ineficientes para identificar MSO, la forma oxidada de metionina que es biológicamente relevante [8], que no hay métodos de marcado químico eficientes para discriminar entre metionina (Met) y MSO en muestras biológicas complejas [9] y que los sensores genéticamente codificados (“biosensores”) desarrollados para detectar MSO [10], [11], [12], [13] son sustancialmente menos confiables que sus versiones para otros oxidantes o formas oxidadas de proteína [14].

La metionina es un aminoácido esencial y la mayoría de los organismos poseen enzimas llamadas metionina sulfóxido reductasas (MSR) que reparan su forma oxidada, lo que sugiere es una modificación biológicamente relevante [15], [16], [17], [18], [19]. Existen 6 familias de MSR no relacionadas evolutivamente (distinta secuencia, plegamiento, mecanismo). Tres de ellas (*msrA*, *msrB* y *msrC*) son enzimas citosólicas, sin cofactor, y presentes tanto en eucariotas como en procariotas. La redundancia se explica, en parte, porque poseen diferencias en su especificidad de sustrato. Las otras tres familias de MSR (*bisC*, *dmsA* y *msrP*) están presentes solo en procariotas y son enzimas ancladas en la membrana, orientadas hacia el medio extracelular y dependientes de molibdeno. Varios estudios sugieren que reciben electrones de la cadena respiratoria [20], [21], [22].

Si bien la oxidación de metioninas fue originalmente considerada como “daño oxidativo”, hoy sabemos que participa en varios procesos fisiológicos como ser la activación de un factor de transcripción bacteriano *hypT* que sensa hipoclorito [23], la regulación de la función de la quinasa cardíaca dependiente de calmodulina *CaMKII* [24], [25] o la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina [26], [27], entre otros. Sin embargo, la oxidación de Met por oxidantes químicos es poco probable, tanto por razones químicas como biológicas [2], [6]. En un contexto donde la biología redox ha estado fuertemente influenciada por interpretaciones químicas, esto ha significado un freno a la investigación sobre la biología redox de metionina. Sin embargo, esto cambió con el descubrimiento de enzimas específicas para la oxidación de metioninas llamadas MICALs [26], [27]. La existencia en un mismo organismo de “oxidasa de metionina” (MOX) y MSR sugería la capacidad de sustentar ciclos de regulación redox centrados en la modificación reversible de metionina, análogo al formado por quinasas y fosfatasa [6], [7], [28]. Sin embargo, entre el descubrimiento de las MOX (año 2010) y la

actualidad, el área no tuvo el desarrollo supuesto fundamentalmente debido a que la actividad MOX resulto ser muy específica de un conjunto chico y evolutivamente restringido de enzimas eucariotas [26], [29], [30] y, en segundo lugar, las MSR son menos ubicuas de lo que creíamos. Es particularmente llamativo el hecho de que varios géneros de bacterias de la microbiota intestinal, rumen y especies parasíticas no posean genes para MSR, al menos no homólogos a los conocidos actualmente. En conclusión, se había postulado un mecanismo de regulación redox sitio-específico, regulado y reversible el cual, por el momento, no puede universalizarse [6], [23], [31].

En este proyecto nos pospusimos intentar encontrar las enzimas faltantes capaces de sustentar la existencia de mecanismos reversibles basadas en la oxidación de metioninas usando herramientas experimentales enfocadas en “descubrir” mas que en caracterizar. Para descubrir enzimas propusimos emplear técnicas de metagenómica funcional experimentales y novedosas, ya que ni los mas avanzados métodos de predicción de estructura a partir de secuencias pueden predecir funciones de genes o descubrir nuevas actividades enzimáticas [32]. La aproximación que usamos califica como metagenómica “funcional”, y consiste aislar ADN de organismos o de muestras complejas (materia fecal, muestras de suelo, etc.) fragmentarlo, ligarlo a vectores y expresar las proteínas codificadas en esos fragmentos de ADN en un huésped heterólogo, comúnmente *E. coli* [33]. Estas librerías de plásmidos no son comerciales, deben generarse según cada muestra y, hasta este proyecto, en base a métodos artesanales y poco reproducibles. El segundo punto es la generación de “cepas reporteras”, es decir, un organismo de fácil manipulación donde las actividades en cuestión puedan ser exploradas ya sea por métodos de detección química o selecciones genéticas. Usando la búsqueda nuevas enzimas MSR y MOX como base, este proyecto contribuyo a desarrollar métodos, descubrir enzimas y abrir nuevas avenidas de investigación.

El Objetivo específico 1 (OE1) fue la generación de librerías de ADN genómico, lo que implicó el crecimiento de varias bacterias distintas, o la obtención de su ADN genómico por terceras partes, y su manipulación para generar fragmentos de 1500-3000 pares de bases, los cuales luego pudieran ser ligados a un plásmido para su amplificación y manipulación. Para cumplir este objetivo fue esencial el apoyo del grupo del Dr. Berkmen, cotutor de la MSc. Flórez.

El OE2 fue la generación de librerías a partir de metagenomas. Esto implicó un reto mayor ya que el material genético de partida es heterogéneo y hasta cierto punto desconocido. La meta original fue partir de material genético extraído de heces humanas, y de sitios subgingivales (microbiota oral) pero aun no llegamos a cumplir con esas muestras. Sin embargo, se logro una librerías de metagenoma a partir de heces de perro con un nivel de inserción correcto. En ambos casos, tanto de OE1 como de OE2 usamos métodos convencionales de geles de agarosa para determinar el porcentaje y largo promedio de los insertos en cada librerías (en base a una muestra de 96 colonias) y secuenciación de lecturas largas PacBio del total de la librería para determinar la cobertura (en caso de librería genómicas) o la diversidad (en caso de la librería metagenómica). Los detalles se encuentran publicados en [34]. Es importante aclarar que a lo largo de este proyecto también se hicieron intentos para generar librerías metagenómicas de fósidos, si bien por el momento no hemos lo hemos logrado, en parte por el costo de los insumos.

Un aspecto que no consideramos con la suficiente relevancia al comienzo de este proyecto fue la necesidad de generar nuevas cepas ingenierizadas de *Escherichia coli*. Contábamos con una variedad de cepas ya preparadas con anterioridad capaces de reportar para la función de selección de MSRs, así como cepas que podíamos usar en las selecciones de MOXs. Sin embargo, a lo largo de los experimentos del primer año identificamos la necesidad de generar una nueva versión de la cepa “de trabajo” para reducir el numero de falsos positivos. Para ello se puso a punto el método de edición de genomas por recombinación homologa [35] el cual, a lo largo de estos años, fue aplicado decenas de veces, produciendo ya una gran cantidad de cepas ingenierizadas “nacionales”.

En este proyecto, el OE3 fue el centro táctico del mismo y donde las herramientas generadas se integraron en propiciar un descubrimiento. Su implementación requirió un gran esfuerzo de adaptación de medios de cultivo mínimos con una composición definida, testeando durante meses diferentes combinaciones de agar, aminoácidos, azúcares, etc. Este proceso aun no esta reportado y será parte del artículo principal de la tesis de la MSc. Flórez, en elaboración. Básicamente, en la concreción de este proyecto combinamos cepas ingenierizadas auxótrofa para Met, incapaces de reducir MSO, sobre medios donde la única fuente de Met era MSO, N-acetilmetionina sulfóxido, metionina sulfona o metionina sulfoximina, con las librerías de plásmidos que -potencialmente- portan enzimas capaces de convertir estas formas de metionina en metionina biodisponible y permitir el crecimiento de la cepa. El resultado es que se obtuvieron cientos de hits, los cuales se analizaron fenotípicamente en medios de selección capaces de discriminar entre hits reales y “bypass” (revertantes de auxotrofia), y luego se analizaron una decena de hits potencialmente interesantes como MSR, llegándose a 15 muy relevantes de los cuales se dio continuidad a uno, por no tener identidad de secuencia con ninguna MSR conocida. Respecto a las otras formas de metionina, no se obtuvieron colonias capaces de crecer, lo que sugiere que al menos en nuestras librerías no hay enzimas que puedan catalizar estas reacciones. Esto nos llevo directamente al OE6, sobre el cual estamos trabajando.

Es importante destacar que a lo largo de estos experimentos contamos con el apoyo de un nuevo colaborador, Dr. Sina Ghaemmaghami

de la Universidad de Rochester, Estados Unidos, experto en proteómica, quien estudio en detalle el proteoma de las cepas ingenierizadas para demostrar sus niveles de oxidación, alteraciones redox y capacidades metabólicas cambiadas. Adicionalmente con el objetivo de estudiar aspectos mecanísticos de algunos hits, se generaron cepas con “compromiso redox” mediante la delección de las enzimas gor y trxB, responsables del sistema GSH:Grx y Trx. Estas cepas las genero la becaria Belén Márquez en apoyo a este proyecto, y fueron caracterizadas por espectrometría de masa/proteómica.

El OE4 tenia como meta el desarrollo del método de “screening” para “actividad MOX” y aplicación del mismo al descubrimiento de nuevas enzimas a partir de librerías de genomas, como se mencionó en el proyecto original, no disponemos de un buen método de selección genética para descubrir MOX. La expresión de MICALs en DELTA6 no compromete la viabilidad celular (Manta, no publicado). En consecuencia, optamos por métodos de “screening” con reporteros fluorescentes (“biosensores”) derivados de MetROX y MetSOX [10] y desarrollados por el responsable (Manta, no publicado). Se indico en la propuesta de que se trataba de el único OE de alto riesgo y, como tal, no logamos obtener resultados contundentes que sugieran que el método de detección funciona como esperamos, por lo cual por el momento se interrumpió este OE. Como nota relevante, gracias la colaboración con el Dr. Comini y Zeida, diseñamos un nuevo biosensor que creemos puede funcionar pero aun no pudimos testearlo por falta de recursos humanos y materiales.

El OE5 se caracterizaba por ser el único íntegramente bioinformático, apoyado primeramente en compañeros bioinformáticos del LGM, cuando el mismo estaba dirigido por Gergorio Iraola, y por una técnica contratada, la MSc. (ahora Doctora) Daniela Costa. Como se menciono anteriormente, la renuncia del Dr. Iraola y la escasa productividad de la MSc. Costa comprometieron este OE, el cual termino apoyado por el Dr. Mariotti. Realizamos un tamizado bioinformático de todos los genes con PFAM de Msr, sobre un pool de unas 4000 especies procariotas, información que fue analizadas para identificar géneros bacterianos cultivables o de los cuales obtener ADN genómico, que no posean MSRs en su genoma. Esto nos llevo a enfocarnos en Bifidobacteria XXXX, cepa que fue compradas en un banco de cepas, crecida y su gADN extraído para hacer librerías (según OE1). Este proceso esta en curso.

Metodología/Diseño del estudio

Metodológicamente el proyecto se baso en estrategias y herramientas simples, de bajo costo, y orientadas a su aplicación “tipo navaja suiza”. A su vez, tuvo como meta principal el desarrollo de una herramienta polifunción, como ser las librerías de plásmidos que desarrollamos.

La metodología no difiere de la presentada en el proyecto original, por lo cual se resume aquí. Las cepas bacterianas para biología molecular y producción de proteínas recombinantes fueron adquiridas en NEB y las cepas de otros organismos en ATCC. La cepa para la selección genética fue desarrollada por el responsable del proyecto usando recombinación homologa [35] en base a una cepa E. coli MC4100 auxótrofa para metionina deficiente en 5 MSR [20] que no crece en MSO como única fuente de Met. Su genoma esta secuenciado [36]. Una versión capaz de eliminar los “bypass” metabólicos fue generada por recombinación homologa, y llamada “delta7” (no publicado). Todos los plásmidos necesarios para la expresión a niveles fisiológicos en base a pDSW204 [37]) o sobreexpresión para proteína recombinante, en base en pET32a [38], de las MSR de E. coli ya fueron generados y los que refieren a nuevos hits se generaron por métodos convencionales de biología molecular, usando kits de NEB. Las librerías de genes se hicieron en plásmidos genéricos comunes como pUC19 y también en vectores desarrollados por nuestro grupo (pAL), que son de expresión constitutiva y usan otro origen de replicación y antibiótico como base [39]). Los biosensores fueron desarrollados por colaboradores según se indico mas arriba y el nuevo biosensor (OE4) fue sintetizado y clonado pero aun no se testeo en detalle.

La construcción de librerías de plásmidos fue un reto en si mismo. Partimos de la existencia de librerías que nos proveyeron colaboradores como el Dr. Berkmen, las cuales fueron realizadas décadas atrás y con tecnologías que daban resultados muy artesanales [40]. También contamos con el apoyo de grupos colaboradores que proveyeron librerías mas modernas, realizadas con métodos de clonado dirigido [41]. Finalmente, el procedimiento fue el siguiente: a partir de ADN genómico se fragmento el mismo con métodos físicos (gTUBES), se aislaron los fragmentos con técnicas de separación y se liberaron luego de aplicar algunas estrategias para aumentar la eficiencia. El procedimiento completo fue publicado por nuestro grupo este año [34].

Las selecciones genéticas se realizaron según se describió. Brevemente, para descubrir MSR DELTA6 o DELTA7 es transformada por con librerías gADN y mgADN y sembrada en placas de selección de con M9 donde la metionina esta ausente o es reemplazada por N-acetilmetionina-sulfoxido, metionina sulfona o metionina sulfona. Luego, cada colonia es replicada a una placa de 96 pocillos 2 mL conteniendo 1 mL de medio no selectivo (LB+antibiótico) la cual se crece ON a 30°C con agitación. La placa “honda” sirve de reservorio de colonias y punto de partida para el análisis fenotípico, desde donde cada colonia se replica en medios completos (LB) o reporteros (M9 completo, sin Met, con MSO, etc.). Todos los “hits” seleccionados por el tamizado fenotípico serán secuenciados ya que es altamente probable que la gran mayoría corresponda a MSR “homologas” y no enzimas completamente nuevas. La secuenciación se

realizara por métodos estándares (Sanger) y los genes dentro del inserto determinados bioinformaticamente.

Los hits identificados fueron tamizados bioinformáticamente para identificar potenciales nuevas MSR o MOX, y luego subclonados para ensayos de complementación in vivo en DELTA6 u otras cepas, en medios de selección con MSO. Para la obtención de la proteína/enzima para estudios bioquímicos, el gen será expresado en cepas de expresión y purificado por afinidad a metales y cromatografía de exclusión molecular (SEC) [42]. Las proteínas purificadas serán caracterizadas por técnicas estándares (CD, UV-Vis, SEC analítica y MS [43]). La actividad MSR será determinada por HPLC con dabsyl-metionina-sulfóxido o péptidos oxidados según [44]. La actividad MOX in vitro será estudiada mediante sonda Carmet/CarmeTOX [45] por MS usando proteínas modelo ricas en metionina [46]. Por el momento, estamos trabajando en esta sección y el Dr. Binolfi ha provisto apoyo en los experimentos de actividad.

El apoyo bioinformático fue esencial a lo largo de todo el proyecto fundamentalmente para estudiar la conservación de las MSR, el análisis de hits secuenciados, las tareas de genómica comparativa, análisis filogenético, etc. contamos con el apoyo de colaboradores del grupo del Dr. Berkem y del Dr. Mariotti y equipo. Lamentablemente, fue difícil comprometer a colaboradores locales.

Resultados, análisis y discusión

Los resultados de este proyecto se han ido introduciendo a lo largo de este informe final y de los informes de avances anteriores. En resumidas cuentas, el proyecto aportó en 5 aspectos relevantes: formación de recursos humanos, producción científica, producción de insumos, consolidación del grupo y proyección internacional del grupo.

Enfocándonos específicamente en el capítulo de producción científica, es decir, en los resultados más específicos, los mismos están publicados en al menos 3 trabajos listados en secciones anteriores y, en resumidas cuentas, se pueden resumir en que se generó un método basado en herramientas, el cual usamos para una pregunta biológica pero puede ser usado para varias otras, y que el método llevó a descubrir nuevas enzimas, como nos habíamos propuesto. El proyecto tuvo un carácter de consolidar una idea, y abrió las puertas para compartir las herramientas hacia otros proyectos.

Las MSR también poseen aplicaciones en la industria química para desracemización de sulfóxidos [47], [48] y se consideran responsables de metabolización in vivo de drogas de uso clínico como la MSX, un inhibidor irreversible de la glutamina sintetasa [49]. Sobre el potencial uso de estas enzimas en química verde hemos dialogado con la comunidad nacional, presentando los resultados en congresos como el ENAQUI, con cierto nivel de interés de parte de algunos colaboradores. Como siempre, la falta de financiación y de capital humano compromete la ejecución de muchas ideas potencialmente valiosas para la academia o la industria.

En los otros aspectos, el proyecto rindió frutos que se pueden ver en la sección correspondiente, de producción, formación de recursos humanos, presentación en eventos, becas de movilidad, viajes y acciones con colegas del exterior, invitaciones a participar en eventos, y otras tantas variables cuantificables que determinan, a mi entender, que el proyecto fue éxito en gran parte de sus metas.

Conclusiones y recomendaciones

La principal conclusión científica de este proyecto se resumió en las secciones anteriores: es posible usar metagenómica funcional para descubrir enzimas y el único límite, pensando en las herramientas que ahora tenemos, es tener una buena pregunta biológica y un buen método de screening o selección genética. Es decir, podemos y queremos expandir el alcance de las herramientas desarrolladas, fundamentalmente en proyectos más aplicados.

La recomendación para la ANII es aumentar los montos, frecuencia y accesibilidad a los recursos, ya que se trata de una de las comunidades científicas menos financiadas de Latinoamérica, a pesar de su alta productividad según todos los indicadores. A su vez, sería razonable que no hubiera estudiantes de postgrado que -cumpliendo con los requisitos para serlo, mostrando la voluntad de serlo, y comprometiéndose a tomar una carrera que es un detrimento en lo salarial y altamente exigente- estos/as estudiantes debería tener beca de postgrado de manera prácticamente automática, sin necesidad de largos y complicados concursos. Elegir no financiar estudiantes capacitados, como sucede año tras año, es quizás la peor decisión que toma el país, y lo hace de manera regular, sistemática y metódica. Dejar de lado el apoyo a estudiantes de doctorado es abandonar el camino de la innovación antes de empezar, porque de ellos y ellas es de donde salen los nuevos inventos que podrán, algún día, romper nuestra dependencia de la exportación de materias primas de bajo valor agregado.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Plasmid Library Construction From Genomic DNA	Valeria Florez-Cardona, Jessica Khani, Emily McNutt, Bruno Manta(*), Mehmet Berkmen(*)	https://doi.org/10.1002/cpz1.70088	https://hdl.handle.net/20.500.12381/3949	En proceso
Artículo científico	Catalytic Mechanism of Mycobacterium tuberculosis Methionine Sulfoxide Reductase A	Santiago Sastre, Bruno Manta, Jonathan A Semelak, Dario Estrin, Madia Trujillo, Rafael Radi, Ari Zeida	https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00504	https://hdl.handle.net/20.500.12381/3950	En proceso
Tesis de doctorado	Metagenómica funcional aplicada al descubrimiento de nuevas enzimas redox	Valeria Florez-Cardona	FCE_2021_1_1010803		En proceso

Referencias bibliográficas

- [1] H. Sies and D. P. Jones, "Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 21, no. 7, pp. 363–383, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- [2] G. Ferrer-Sueta, B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo, and A. Denicola, "Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 24, no. 4, pp. 434–450, Apr. 2011, doi: 10.1021/tx100413v.
- [3] M. C. Sobotta et al., "Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 64–70, Jan. 2015, doi: 10.1038/nchembio.1695.
- [4] R. Radi, "Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 23, pp. 5839–5848, 05 2018, doi: 10.1073/pnas.1804932115.
- [5] A. Zeida, M. Trujillo, G. Ferrer-Sueta, A. Denicola, D. A. Estrin, and R. Radi, "Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols," *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 19, pp. 10829–10855, Oct. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.9b00371.

- [6] B. Manta and V. N. Gladyshev, "Regulated methionine oxidation by monooxygenases," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 109, pp. 141–155, 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.010.
- [7] A. Drazic and J. Winter, "The physiological role of reversible methionine oxidation," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1844, no. 8, pp. 1367–1382, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.01.001.
- [8] B. Ghesquière et al., "Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation," *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 10, no. 5, p. M110.006866, May 2011, doi: 10.1074/mcp.M110.006866.
- [9] S. Lin et al., "Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation," *Science*, vol. 355, no. 6325, pp. 597–602, Feb. 2017, doi: 10.1126/science.aal3316.
- [10] L. Tarrago, Z. Péterfi, B. C. Lee, T. Michel, and V. N. Gladyshev, "Monitoring methionine sulfoxide with stereospecific mechanism-based fluorescent sensors," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 332–338, May 2015, doi: 10.1038/nchembio.1787.
- [11] H. B. Shim et al., "Development and Optimization of a Redox Enzyme-Based Fluorescence Biosensor for the Identification of MsrB1 Inhibitors," *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 13, no. 11, p. 1348, Nov. 2024, doi: 10.3390/antiox13111348.
- [12] Z. Péterfi, L. Tarrago, and V. N. Gladyshev, "Practical guide for dynamic monitoring of protein oxidation using genetically encoded ratiometric fluorescent biosensors of methionine sulfoxide," *Methods San Diego Calif*, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.ymeth.2016.06.022.
- [13] D. W. Choi et al., "Development of a novel fluorescent biosensor for dynamic monitoring of metabolic methionine redox status in cells and tissues," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 178, p. 113031, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113031.
- [14] B. Pedre, "A guide to genetically-encoded redox biosensors: State of the art and opportunities," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 758, p. 110067, Aug. 2024, doi: 10.1016/j.abb.2024.110067.
- [15] B. Ezraty, L. Aussel, and F. Barras, "Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1703, no. 2, pp. 221–229, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.017.
- [16] U. Kappler, M. Nasreen, and A. McEwan, "New insights into the molecular physiology of sulfoxide reduction in bacteria," *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 75, pp. 1–51, 2019, doi: 10.1016/bs.ampbs.2019.05.001.
- [17] J. A. Maupin-Furlow, "Methionine Sulfoxide Reductases of Archaea," *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 7, no. 10, Sep. 2018, doi: 10.3390/antiox7100124.
- [18] P. Rey and L. Tarrago, "Physiological Roles of Plant Methionine Sulfoxide Reductases in Redox Homeostasis and Signaling," *Antioxid. Basel Switz.*, vol. 7, no. 9, Aug. 2018, doi: 10.3390/antiox7090114.
- [19] B. C. Lee, A. Dikiy, H.-Y. Kim, and V. N. Gladyshev, "Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1790, no. 11, pp. 1471–1477, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.04.014.
- [20] A. Gennaris et al., "Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons," *Nature*, vol. 528, no. 7582, pp. 409–412, Dec. 2015, doi: 10.1038/nature15764.
- [21] B. Ezraty, J. Bos, F. Barras, and L. Aussel, "Methionine sulfoxide reduction and assimilation in *Escherichia coli*: new role for the biotin sulfoxide reductase BisC," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 1, pp. 231–237, Jan. 2005, doi: 10.1128/JB.187.1.231-237.2005.
- [22] S. L. McCrindle, U. Kappler, and A. G. McEwan, "Microbial dimethylsulfoxide and trimethylamine-N-oxide respiration," *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 50, pp. 147–198, 2005, doi: 10.1016/S0065-2911(05)50004-3.
- [23] A. Drazic et al., "Methionine oxidation activates a transcription factor in response to oxidative stress," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 23, pp. 9493–9498, Jun. 2013, doi: 10.1073/pnas.1300578110.
- [24] K. Konstantinidis et al., "MICAL1 constrains cardiac stress responses and protects against disease by oxidizing CaMKII," *J. Clin. Invest.*, vol. 130, no. 9, pp. 4663–4678, Sep. 2020, doi: 10.1172/JCI133181.
- [25] J. R. Erickson et al., "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation," *Cell*, vol. 133, no. 3, pp. 462–474, May 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.02.048.
- [26] B. C. Lee et al., "MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation," *Mol. Cell*, vol. 51, no. 3, pp. 397–404, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.019.
- [27] R.-J. Hung et al., "Mical links semaphorins to F-actin disassembly," *Nature*, vol. 463, no. 7282, pp. 823–827, Feb. 2010, doi: 10.1038/nature08724.
- [28] G. Branlant, "The role of methionine sulfoxide reductase in redox signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 35, p. 29250, Aug. 2012, doi: 10.1074/jbc.L112.394387.
- [29] H. Yan et al., "Sulfoxidation regulation of MaNAC42 transcription factor influences its functions in relation to stress-induced fruit ripening in banana," *J. Exp. Bot.*, Oct. 2020, doi: 10.1093/jxb/eraa474.
- [30] A. Gallmetzer et al., "Reversible Oxidation of a Conserved Methionine in the Nuclear Export Sequence Determines Subcellular Distribution and Activity of the Fungal Nitrate Regulator NirA," *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 7, p. e1005297, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005297.
- [31] H. Valverde, F. R. Cantón, and J. C. Aledo, "MetOSite: an integrated resource for the study of methionine residues sulfoxidation," *Bioinforma. Oxf. Engl.*, vol. 35, no. 22, pp. 4849–4850, Nov. 2019, doi: 10.1093/bioinformatics/btz462.
- [32] S. Ovchinnikov et al., "Protein structure determination using metagenome sequence data," *Science*, vol. 355, no. 6322, pp. 294–298, Jan. 2017, doi: 10.1126/science.aah4043.
- [33] M. G. Chevrette and J. Handelsman, "From Metagenomes to Molecules: Innovations in Functional Metagenomics Unlock Hidden

Chemistry in the Human Microbiome,” *Biochemistry*, vol. 59, no. 6, pp. 729–730, 18 2020, doi: 10.1021/acs.biochem.0c00033.

[34] V. Florez-Cardona, J. Khani, E. McNutt, B. Manta, and M. Berkmen, “Plasmid Library Construction From Genomic DNA,” *Curr. Protoc.*, vol. 5, no. 1, p. e70088, Jan. 2025, doi: 10.1002/cpz1.70088.

[35] K. A. Datsenko and B. L. Wanner, “One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 12, pp. 6640–6645, Jun. 2000, doi: 10.1073/pnas.120163297.

[36] B. P. Anton, R. D. Morgan, B. Ezraty, B. Manta, F. Barras, and M. Berkmen, “Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BE104, an MC4100 Derivative Lacking the Methionine Reductive Pathway,” *Microbiol. Resour. Announc.*, vol. 8, no. 28, Jul. 2019, doi: 10.1128/MRA.00721-19.

[37] E. J. Stewart, F. Aslund, and J. Beckwith, “Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins,” *EMBO J.*, vol. 17, no. 19, pp. 5543–5550, Oct. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.19.5543.

[38] A. C. Correa, C. O. Ortega, G. O. Obal, P. A. Alzari, R. V. Vincentelli, and P. J. O. Oppezzo, “Generation of a vector suite for protein solubility screening,” *Microbiotechnology Ecotoxicol. Bioremediation*, vol. 5, p. 67, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00067.

[39] E. McNutt, N. Ke, A. Thurman, J. B. Eaglesham, and M. Berkmen, “SAS: Split antibiotic selection for identifying chaperones that improve protein solubility,” *Heliyon*, vol. 10, no. 5, p. e26996, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26996.

[40] K. D. Lunnen et al., “Cloning type-II restriction and modification genes,” *Gene*, vol. 74, no. 1, pp. 25–32, Dec. 1988, doi: 10.1016/0378-1119(88)90242-9.

[41] I. Frumkin and M. T. Laub, “Selection of a de novo gene that can promote survival of *Escherichia coli* by modulating protein homeostasis pathways,” *Nat. Ecol. Evol.*, vol. 7, no. 12, pp. 2067–2079, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41559-023-02224-4.

[42] B. Manta et al., “Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 19, no. 7, pp. 665–682, Sep. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4859.

[43] B. Manta, G. Obal, A. Ricciardi, O. Pritsch, and A. Denicola, “Tools to evaluate the conformation of protein products,” *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 6, pp. 731–741, Jun. 2011, doi: 10.1002/biot.201100107.

[44] J. C. Lim et al., “Characterization and solution structure of mouse myristoylated methionine sulfoxide reductase A,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 30, pp. 25589–25595, Jul. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.368936.

[45] C. Sanchez-Lopez et al., “An NMR-based biosensor to measure stereo-specific methionine sulfoxide reductase (MSR) activities in vitro and in vivo,” *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, Jun. 2020, doi: 10.1002/chem.202002645.

[46] X. Liang, A. Kaya, Y. Zhang, D. T. Le, D. Hua, and V. N. Gladyshev, “Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins,” *BMC Biochem.*, vol. 13, p. 21, 2012, doi: 10.1186/1471-2091-13-21.

[47] V. Nosek and J. Mišek, “Enzymatic kinetic resolution of chiral sulfoxides – an enantiocomplementary approach,” *Chem. Commun. Camb. Engl.*, vol. 55, no. 70, pp. 10480–10483, Aug. 2019, doi: 10.1039/c9cc05470g.

[48] V. Nosek and J. Mišek, “Chemoenzymatic Deracemization of Chiral Sulfoxides,” *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 57, no. 31, pp. 9849–9852, 26 2018, doi: 10.1002/anie.201805858.

[49] K. L. Hentchel and J. C. Escalante-Semerena, “In *Salmonella enterica*, the Gcn5-related acetyltransferase MddA (formerly YncA) acetylates methionine sulfoximine and methionine sulfone, blocking their toxic effects,” *J. Bacteriol.*, vol. 197, no. 2, pp. 314–325, Jan. 2015, doi: 10.1128/JB.02311-14.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)

