

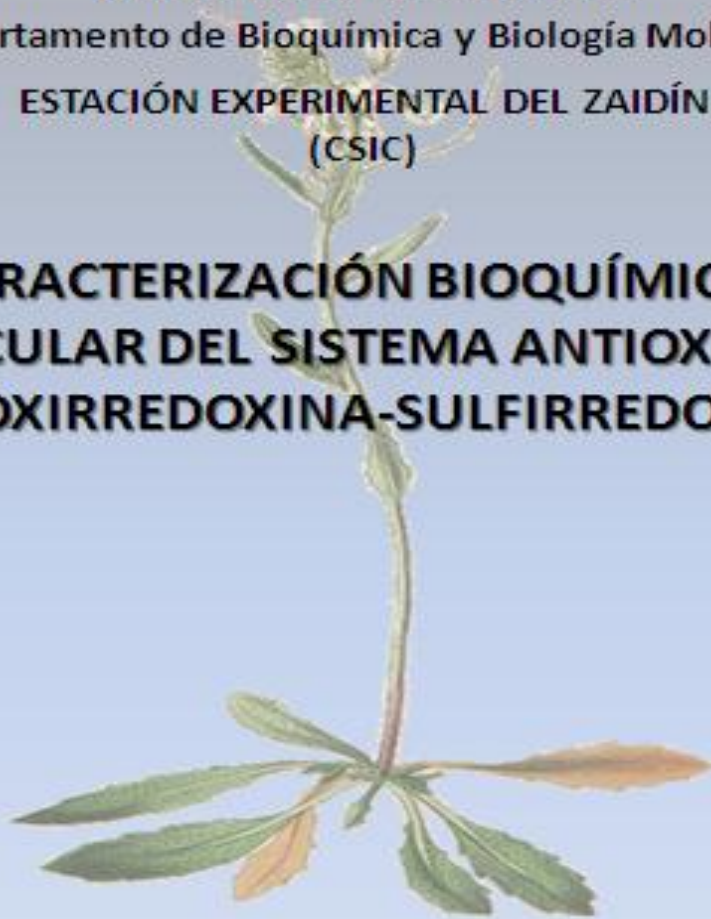


UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN  
(CSIC)

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y  
MOLECULAR DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE  
PEROXIRREDOXINA-SULFIRREDOXINA**



TESIS DOCTORAL

Iván Iglesias Baena

Granada, 2010



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS**

**ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y  
MOLECULAR DEL SISTEMA  
ANTIOXIDANTE PEROXIRREDOXINA /  
SULFIRREDOXINA”**

**TESIS DOCTORAL**

**Ldo. Iván Iglesias Baena**

**2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Iván Iglesias Baena  
D.L.: GR 771-2011  
ISBN: 978-84-694-0133-0





**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y  
MOLECULAR DEL SISTEMA  
ANTIOXIDANTE PEROXIRREDOXINA /  
SULFIRREDOXINA”**

Memoria presentada por  
el Ldo. D<sup>o</sup> Iván Iglesias  
Baena para aspirar al  
grado de Doctor en  
Farmacia.

Granada, Septiembre de 2010

Fdo: Ldo D<sup>o</sup> Iván Iglesias Baena





D. Juan José Lázaro Paniagua, Doctor en Farmacia, Investigador Científico de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y D<sup>a</sup>. Francisca Sevilla Valenzuela, Doctora en Ciencias, Profesora de Investigación del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICAN:

Que Don Iván Iglesias Baena ha realizado el trabajo de investigación titulado “Caracterización bioquímica y molecular del sistema antioxidante peroxirredoxina / sulfirredoxina” bajo nuestra dirección y que la presente memoria corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

En cumplimiento de la normativa vigente, nos complace informar favorablemente la presentación de esta Tesis Doctoral ante el Tribunal que se designe.

Dra. Francisca Sevilla Valenzuela  
Profesora de Investigación del CSIC

Dr. Juan José Lázaro Paniagua  
Investigador Científico del CSIC

Granada, Septiembre de 2010.



El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de plantas de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) de Granada, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Ha sido financiada con ayuda de las becas predoctoral del Plan de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia e Innovación asociada al Proyecto de Investigación (BFU2008-00745/BFI). Una parte del mismo, ha sido realizado durante estancias breves realizadas en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) de Murcia y en el Grupo de Estrés Oxidativo y Ciclo Celular de la Universidad Pompeu Fabra (UPF) de Barcelona. Además, se opta al grado de Doctor Europeo gracias a un proyecto de Acciones Integradas entre España y Alemania (HA2007-0077) que ha permitido realizar parte de los resultados presentados de esta Tesis en el Departamento de Bioquímica y Fisiología de Plantas de la Facultad de Biología de la Universidad de Bielefeld (Alemania).

Los resultados parciales de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas:

- “*Plant Biomass for food and energy: future and reality*”, Baeza (Jaén), Octubre 2008. Presentación de póster científico titulado “Cloning and Characterization of a Sulfiredoxin from *A. thaliana*”.
- “*Plant ROS 2009*” *Plant Oxygen Group Meeting on Reactive Oxygen and Nitrogen Species*, Helsinki (Finlandia), Julio 2009. Presentación de póster científico titulado “Colorimetric assay for Sulfiredoxin activity using inorganic phosphate detection”.
- “*Internacional symposium on the pathophysiology of reactive oxygen and nitrogen species*”, Salamanca, Mayo 2010. Presentación de póster científico titulado “*Physiological function of Sulfiredoxin and sulfinic form of 2-Cys Peroxiredoxin of plant*” y exposición oral.

Así mismo, los resultados obtenidos hasta la fecha han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Calvo IA, Gabrielli N, Iglesias-Baena I, García-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Sansó M, Zuin A, Pérez P, Ayté J, Hidalgo E. 2009. *Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. PLoS One* 4, e6619.
  
- Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lázaro JJ. 2010. *Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin. Journal of Experimental Botany* 61, 1509-1521.
  
- Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Sevilla F, Lázaro JJ. *The dual targeted plant Sulfiredoxin retroreduces the sulfinic form of mitochondrial Peroxiredoxin.* Enviado a *Plant Physiology* 07/2010.







## **AGRADECIMIENTOS**



## Agradecimientos

Quisiera aprovechar las páginas de esta Tesis, para agradecer de la forma más sincera posible a todas aquellas personas que han formado parte de este trabajo y de mi vida durante estos cuatro años inolvidables, fruto de los cuales me siento afortunado del trabajo de investigación realizado.

Para comenzar, quisiera agradecer al Dr. Juan José Lázaro, director y persona más importante durante mi doctorado, por la magnífica dirección y supervisión de esta Tesis Doctoral. Ha sido un placer trabajar estos años en un laboratorio acompañado de una de las mejores personas que he conocido jamás. Un anuncio encontrado en la facultad ha hecho crecer como persona a un recién licenciado convertido en investigador gracias a un padre científico como Juanjo, lleno de buenos consejos y diversión hasta en los peores momentos.

La Dra. Francisca Sevilla, codirectora de esta tesis, y quien me abrió las puertas de su laboratorio durante inolvidables meses. Gracias a su personalidad y calidad científica, ha ayudado a dar cuerpo a este trabajo.

Agradecer también a mi tutora de doctorado, la Dra. Maria Dolores Suárez, por su atención y amabilidad en cada momento.

La siguiente persona a la que deseo mostrar mi agradecimiento, es a mi compañero de laboratorio y ya doctor, Sergio Barranco, quien me inició en el laboratorio y me aconsejó a cada momento, y a quien deseo mucha suerte. A pesar de la distancia, no ha dejado de estar cerca y de aportar siempre buenas ideas. Gracias a su compañerismo, amistad y diversión, hace que nunca se olviden a estas personas.

A la Dra. Matilde Barón, por su apoyo y discusiones científicas que siempre fueron de tanta ayuda. Ha sido un placer tener junto al laboratorio a una investigadora ejemplar como divulgadora y luchadora.

A la Dra. Elena Hidalgo, por tan hospitalaria aceptación para realizar estancias en su laboratorio, donde me sentí como en casa. Nunca olvidaré esos seis meses de mi vida, donde crecí como investigador en la ciudad donde crecí como persona. Fue maravilloso formar parte temporalmente de un grupo tan grande. Gracias por tan buenos consejos sobre mi futuro. Gracias también al Dr. José Ayté por su amabilidad.

Al Dr. Karl Josef Dietz, por las discusiones científicas durante los tres meses en Alemania que han hecho aportar calidad científica a mi trabajo. Gracias por la hospitalidad mostrada y su atención.

Al Dr. Javier López Jaramillo, por su gran aportación desde el punto de vista estructural a este trabajo y por tantas horas de interesantes discusiones científicas. Al Dr. Tino Krell, por su colaboración para la realización de los experimentos de calorimetría. A la Dra Mariam Sahrawy, por su corrección científica y amabilidad a cada momento.

A Francisca Castro por su gran asistencia técnica en los primeros meses de mi tesis, y a quien deseo mucha salud.

A Alfonso Lázaro, eternamente agradecido por aguantarme y realizar tan alto nivel de trabajo técnico. Evolucionó desde práctico hasta ser esencial en el desarrollo de esta Tesis, siempre aderezado con una personalidad genial que va en los genes.

A todos los estudiantes en prácticas que han pasado por el laboratorio, deseando que no olviden esos días, de la misma manera que no se les olvida a ellos. Desde la ternura de Elvira, la elegancia de Nani, la corrección de Alfonso, la disposición de Alexis, el afán de Jose y el interés de Juanma. Gracias a todos.

Al Dr. Antonio Serrato que tanto me ha aportado y ayudado a nivel humano y científico. Es una suerte tener a personas de este calibre como compañero y amigo.

A mis compañeros de pasillo del departamento de Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidín, quienes te alegran cada mañana al cruzarte con ellos. Especialmente, a los vecinos Ángel, Jose Antonio, Juan, Mauricio Cristina y Trini, con quienes he reído y disfrutado de cenas navideñas de grupo geniales y viajes inolvidables.

A todos aquellos que ya no están en el laboratorio, Abdel, Juande, Fernando, Ana, Steffi, Juanjillo, Rebeca, Raúl, Jesús y Mercedes.

Mención especial para las niñas, Bea, Cristi, Hortencia, Mónica, Marisa e Iratxe, personas que llevo en el corazón y con quienes he compartido momentos tan especiales. Ellas han sido mi impulso y a ellas agradezco mucho su ánimo. Siempre serán mis niñas.

A todos aquellos compañeros de la peña de fútbol de la Estación Experimental del Zaidín, por quemar calorías junto todos ellos cada semana y recuperarlas con cervezas al acabar el partido. Ha sido para mí muy importante en esta Tesis la relación con todos ellos, sirviendo de diversión y para despejarme tras horas en el laboratorio.

No puedo olvidarme de todos aquellos que formaron parte del Sainete (Zaidinete) la Navidad de 2009, con quienes compartí momentos de mucha diversión. El hombre de negro agradece a todos los compañeros por tan buenos momentos de convivencia.

A todos los compañeros del CEBAS (Murcia), donde pasé unos meses estupendos durante mis estancias breves, junto a Ana Jiménez, Mamen, Bea, Daymi, Virginia, Loli y Quique. Gracias a todos por vuestra ayuda y compañerismo.

A toda mi familia del PRBB de Barcelona y especialmente al grupo de la Universitat Pompeu Fabra, donde permanecí de la manera más feliz que se puede trabajar y aprender. Gracias a Isabel, Mónica, Alberto, Miriam, Nati, Pol, Mercé, Alice, Ana, Sarela y Blanca. Espero poder contar con vuestra amistad. Siempre os estaré agradecido por todo el cariño mostrado.

A todos los compañeros de laboratorio de la Universidad de Bielefeld, especialmente a Andrea, Marie, Nils, Peter, Daniel, Elke, Simone, Déborah y Meena. Gracias por su compañerismo y amistad.

A mis compañeros de Facultad y de cursos de Doctorado, especialmente a Jaime, Moisés y Juan. Mención especial para Marta, a quien conservo todo el cariño del mundo por compartir junto a ella tantos años juntos y a quien agradezco todo su apoyo y comprensión. A mis amigos de toda la vida, especialmente a Alex.

Para el final, a las personas más importantes en mi vida, mi familia. Gracias a mis padres por todo su apoyo y ánimo, estando ahí cuando más los necesitas. A mi hermana Yolanda y a César, por vuestro interés y cariño. A mis tíos, primos y abuelos, acordándome especialmente de los que están en el cielo. A la persona más especial en mi vida, Bea, llena de vida nueva y que con su amor y cariño ha hecho que cada día todo tenga sentido en mi vida. También agradecer a toda la familia de Bea, por ser una familia para mí. Os quiero.

A todos ellos, gracias.

Iván Iglesias

A MIS PADRES, A BEA  
Y A NUESTRO FUTURO HIJO.

*“No existe montaña imposible de escalar,  
océano imposible de surcar  
o abismo imposible de superar.  
Basta con poner el alma en ello.  
Lo posible ya se ha hecho,  
lo imposible está en tus manos.”*

*BGF*





## **ÍNDICE GENERAL**



---

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y  
MOLECULAR DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE Prx-Srx”**

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN – SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>1.- Especies reactivas de oxígeno</b>	<b>7</b>
<b>1.1.- Generalidades</b>	<b>7</b>
<b>1.2.- Producción de ROS en plantas</b>	<b>8</b>
<b>1.3.- Papel celular de ROS</b>	<b>10</b>
<b>2.- Sistemas antioxidantes</b>	<b>11</b>
<b>3.- Peroxirredoxinas</b>	<b>14</b>
<b>3.1.- Generalidades</b>	<b>14</b>
<b>3.2.- Clasificación y mecanismo</b>	<b>16</b>
<b>3.3.- Peroxirredoxinas vegetales</b>	<b>17</b>
<b>3.4.- Sobreoxidación</b>	<b>19</b>
<b>4.- Tiorredoxinas</b>	<b>21</b>
<b>5.- Sulfirredoxina</b>	<b>24</b>
<b>5.1.- Descubrimiento y evolución</b>	<b>24</b>
<b>5.2.- Mecanismo de acción</b>	<b>25</b>
<b>5.3.- Sestrinas</b>	<b>28</b>
<b>5.4.- Estructura</b>	<b>28</b>
<b>6.- Papel biológico del sistema peroxirredoxina / sulfirredoxina</b>	<b>30</b>

	<b>Página</b>
<b>OBJETIVOS – OBJECTIVES</b>	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	39
<b>1.- Material Vegetal</b>	39
<b>1.1.- Cultivo</b>	39
<b>1.1.1.- Guisantes</b>	39
<b>1.1.2.- <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	39
<b>1.2.- Transformación de <i>A. thaliana</i> por <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	40
<b>1.3.- Tratamientos de plantas</b>	40
<b>1.3.1.- Estrés abiótico</b>	41
<b>1.3.2.- Estrés biótico</b>	41
<b>1.4.- Extractos vegetales</b>	42
<b>1.5.- Parámetros oxidativos</b>	42
<b>1.5.1.- Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	42
<b>1.5.2.- Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hoja</b>	42
<b>1.5.3.- Peroxidación lipídica</b>	43
<b>1.5.4.- Carbonilación de proteínas</b>	43
<b>1.6.- Medidas de fluorescencia</b>	44
<b>1.7.- Aislamiento de orgánulos</b>	44
<b>1.7.1.- Cloroplastos intactos y fraccionamiento cloroplastídico</b>	45
<b>1.7.2.- Mitocondrias intactas y fraccionamiento mitocondrial</b>	46
<b>1.8.- Importe a orgánulos</b>	47
<b>1.9.- Determinación de clorofila</b>	47

---

	<b>Página</b>
<b>2.- Bacterias</b>	48
<b>2.1.- Cepas y medios de cultivo</b>	48
<b>2.2.- Bacterias competentes</b>	49
<b>2.2.1.- Preparación</b>	49
<b>2.2.2.- Transformación</b>	49
<b>2.3.- Transformación con Agrobacterium</b>	50
<b>2.4.- Aislamiento de DNA plasmídico</b>	51
<b>3.- Levaduras</b>	51
<b>3.1.- Cepas y condiciones de crecimiento</b>	51
<b>3.2.- Extractos y tratamientos</b>	52
<b>3.3.- Estudios de viabilidad</b>	52
<b>3.4.- Curvas de crecimiento</b>	53
<b>3.5.- Estudio de muerte celular</b>	53
<b>3.6.- Fluorescencia mediante GFP</b>	53
<b>4.- Biología Molecular</b>	54
<b>4.1.- Extracción de DNA genómico</b>	54
<b>4.2.- Extracción de RNA mensajero</b>	54
<b>4.3.- Obtención de cDNA</b>	54
<b>4.4.- Tratamiento enzimático del DNA</b>	54
<b>4.4.1.- Poliadenilación</b>	54
<b>4.4.2.- Digestión</b>	55
<b>4.4.3.- Ligación</b>	55
<b>4.5.- Vectores y oligonucleótidos</b>	55
<b>4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa</b>	57
<b>4.7.- PCR sobre colonia</b>	57
<b>4.8.- Electroforesis de DNA en gel de agarosa</b>	58

	<b>Página</b>
4.9.- Purificación de fragmentos de DNA	58
4.10.- Mutagénesis dirigida	59
4.11.- Secuenciación de DNA	59
4.12.- RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa	60
4.13.- Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5'-RACE)	61
<b>5.- Proteómica</b>	<b>62</b>
5.1.- Determinación del contenido proteico	62
5.2.- Expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	63
5.3.- Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida	64
5.3.1.- Monodimensional	64
5.3.2.- Bidimensional	65
5.4.- Tinción y secado de geles de poliacrilamida	66
5.4.1.- Tinción de plata	66
5.4.2.- Tinción con Azul Coomassie	67
5.4.3.- Secado de geles de poliacrilamida	67
5.5.- Purificación de proteínas recombinantes	67
5.5.1.- Cromatografía de afinidad	68
5.5.2.- Cromatografía de intercambio iónico	69
5.5.3.- Cromatografía de filtración en gel	69
5.6.- Secuenciación y análisis por espectrometría de masas	69
5.7.- Sobreoxidación de Prxs y tratamiento con AMS	70
5.8.- Determinación de grupos tiol	70
5.9.- Determinación del potencial redox	71
<b>6.- Técnicas inmunológicas</b>	<b>72</b>
6.1.- Obtención de anticuerpos policlonales	72

---

	<b>Página</b>
6.2.- Western blot	73
6.3.- ELISA	74
6.4.- Inmunocitoquímica para microscopía electrónica	74
7.- Ensayos enzimáticos	75
7.1.- Ensayo de protección del DNA	75
7.2.- Actividad peroxidasa	76
7.3.- Actividad sulfirredoxina	76
7.3.1.- Medida colorimétrica de fosfato inorgánico	76
7.3.2.- Cuantificación espectrofotométrica del ADP	77
7.3.3.- Determinación cromatográfica del ADP	78
7.4.- Actividad chaperona	78
8.- Microcalorimetría	79
9.- Programas bioinformáticos y análisis estadístico de datos	79
<b>RESULTADOS</b>	<b>81</b>
1.- Aislamiento del cDNA que codifica la Srx	83
2.- Análisis de las secuencias de las Srxs de <i>A. thaliana</i> y guisante	85
3.- Obtención de mutantes de la AtSrx	87
4.- Clonación de la Srx y sus mutantes	89
5.- Sobreexpresión de la Srx y sus mutantes	91
6.- Desarrollo de un protocolo de purificación para la Srx recombinante	92
6.1.- Cromatografía de afinidad	92
6.2.- Cromatografía de intercambio iónico	94

	<b>Página</b>
<b>7.- Determinación de la masa molecular de la Srx mediante cromatografía de filtración en gel</b>	96
<b>8.- Determinación del potencial redox de la Srx y sus mutantes</b>	98
<b>9.- Determinación del los grupos sulfidrilo presentes en la Srx y sus mutantes</b>	99
<b>10.- Obtención y caracterización del anticuerpo policlonal frente a la Srx</b>	100
<b>11.- Localización subcelular del sistema Prx-Srx</b>	101
<b>11.1.- Localización mediante inmunocitoquímica con microscopía electrónica</b>	101
<b>11.1.1.- Localización cloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y Srx</b>	101
<b>11.1.2.- Coinmunolocalización Prx-Srx</b>	102
<b>11.1.3.- Localización mitocondrial de la Srx</b>	103
<b>11.2.- Localización mediante Western blot</b>	104
<b>11.2.1.- Cuantificación cloroplastídica de la Srx</b>	105
<b>11.2.2.- Localización intracloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y Srx</b>	105
<b>11.2.3.- Localización intramitocondrial de la Srx</b>	107
<b>11.3.- Importe dual <i>in vitro</i> de la nAtSrx a cloroplasto y mitocondrial</b>	107
<b>12.- Obtención de la forma sobreoxidada de las Prxs</b>	109
<b>13.- Actividad enzimática de la Srx</b>	112
<b>13.1.- Cinéticas con la 2-Cys Prx</b>	113
<b>13.1.1.- Sin reductor</b>	113
<b>13.1.2.- Con reductor</b>	115
<b>13.2.- Cinéticas con otras Prxs vegetales</b>	117
<b>13.2.1.- Cloroplastídicas</b>	117



	<b>Página</b>
13.2.2.- No cloroplastídicas	120
13.3.- Cinéticas con Prxs humanas	122
13.4.- Preferencia catalítica de la Srx sobre las Prxs	123
13.5.- Eficiencia catalítica a diferentes pH	125
14.- Actividad enzimática de los mutantes de la AtSrx	126
15.- Determinación de parámetros cinéticos de la Srx	127
16.- Valores de $pK_a$ de la Srx	129
17.- Actividad chaperona	131
18.- Actividad deglutationizadora de la Srx	133
19.- Interacción proteica del sistema Prx-Srx-Trx	133
19.1.- Heterocomplejo Prxs-Srxs	134
19.1.1.- 2-Cys Prx y Srx de <i>A. thaliana</i> y guisante	134
19.1.1.1.- Análisis proteómico	134
19.1.1.2.- Parámetros termodinámicos	135
19.1.2.- Prx Q y Srx de <i>A. thaliana</i>	136
19.1.2.1.- Análisis proteómico	136
19.1.2.2.- Parámetros termodinámicos	136
19.1.3.- Prx IIF y Srx de guisante	137
19.1.3.1.- Análisis proteómico	137
19.1.3.2.- Parámetros termodinámicos	138
19.2.- Heterocomplejo Srxs-Trxs	138
19.2.1.- Análisis proteómico	139
19.2.2.- Parámetros termodinámicos	139
19.3.- Heterocomplejo Prxs-Trxs	140

	<b>Página</b>
<b>20.- Agente reductor cloroplastídico preferencial del sistema Prx-Srx-Trx</b>	141
<b>21.- Estudio de plantas de <i>A. thaliana</i> “knock out” en Prx/Srx</b>	142
<b>21.1.- Identificación de <math>\Delta</math>PrxB, <math>\Delta</math>Prx IIF y <math>\Delta</math>Srx</b>	142
<b>21.2.- Caracterización del fenotipo</b>	143
<b>21.3.- Sensibilidad a estrés abiótico</b>	145
<b>21.4.- Sensibilidad a estrés biótico</b>	149
<b>22.- Estudio del estado redox de las Prxs en <math>\Delta</math>Srx mediante técnicas bidimensionales</b>	153
<b>23.- Estrés abiótico en guisante</b>	156
<b>23.1.- Estrés salino</b>	156
<b>23.1.1.- Daño oxidativo</b>	157
<b>23.1.2.- Niveles de expresión</b>	158
<b>23.2.- Otros tipos de estrés oxidativo</b>	160
<b>24.- Ensayo de interacción a DNA de la Srx</b>	161
<b>25.- Estudio del sistema Prx-Srx en levaduras</b>	162
<b>25.1.- Respuesta al estrés del sistema Prx / Srx</b>	162
<b>25.1.1.- Activación de Sty1</b>	164
<b>25.1.2.- Activación de Pap1</b>	165
<b>25.2.- Influencia del estrés oxidativo en <i>S.pombe</i> en el crecimiento y muerte celular</b>	167
<b>25.2.1.- Curvas de crecimiento</b>	168
<b>25.2.2.- Muerte celular</b>	169

---

	<b>Página</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	171
1.- Aislamiento del cDNA que codifica la PsSrx y análisis de la secuencia	174
2.- Obtención de PsSrx, AtSrx y sus mutantes recombinantes	175
3.- Análisis bioquímico de la Srx de plantas y sus mutantes	176
4.- Localización dual (cloroplástica y mitocondrial) de la Srx de plantas	181
5.- Proteínas diana de la Srx de plantas	183
6.- Regulación de la actividad peroxidasa/chaperona de la Prx por la Srx	186
7.- Importancia biológica del sistema Prx/Srx en la resistencia eucariota al estrés oxidativo	188
8.- Función señalizadora de la Prx-SO <sub>2</sub> H	190
<b>CONCLUSIONES - CONCLUSIONS</b>	193
<b>BIBLIOGRAFÍA - REFERENCES</b>	199
<b>ANEXOS</b>	217
I.- Abreviaturas	219
II.- Índice de tablas y figuras	225
III.- Publicaciones científicas – Scientific publications	237
- Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast	239
- Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin	251
- The dual targeted plant Sulfiredoxin retroreduces the sulfinic form of atypical mitochondrial Peroxiredoxin	266



## **RESUMEN - SUMMARY**



## **Resumen**

La función antioxidante de la 2-Cys peroxirredoxina (Prx) incluye la oxidación de su cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) conservada a ácido sulfénico, que es reducida por la tiorredoxina (Trx). En condiciones de estrés oxidativo, esta cisteína puede ser sobreoxidada a ácido sulfínico, inactivando su actividad peroxidasa con ganancia de actividad chaperona. Una enzima recientemente descubierta, llamada sulfirredoxina (Srx), reduce la forma sulfínica de la 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) en presencia de ATP, Mg<sup>2+</sup> y un tiol como agente reductor.

En plantas, la Srx así como la 2-Cys Prx, han sido consideradas exclusivamente enzimas cloroplastídicas. Teniendo en cuenta que las mitocondrias son también un lugar importante en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), decidimos investigar la presencia de Srx en este orgánulo de guisante y *A. thaliana*.

Para estudiar su función fisiológica en plantas, la Srx se ha clonado, expresado y purificado. Se han obtenido, además, cinco mutantes mediante mutagénesis dirigida en aminoácidos implicados en su actividad. La actividad sulfirredoxina, determinada por un método nuevo, depende de la concentración de Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP. Cuatro años después del descubrimiento de la Srx en plantas, este trabajo presenta la primera caracterización bioquímica sistemática del sistema Prx/Srx en vegetales y contribuye a un mejor conocimiento de su función fisiológica.

Se han estudiado, además, la interacción *in vitro* de la Srx con diferentes Prxs de plantas y humanas, así como el papel del sistema Prx-Trx en la defensa antioxidante en levadura, concretamente cepas de *S. pombe* sometidas a estrés oxidativo.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, han sido necesarias técnicas de bioquímica, biología molecular, proteómica y biofísica.

## **Summary**

The antioxidant function of 2-Cys peroxiredoxin (Prx) involves the oxidation of its conserved peroxidatic cysteine to sulfenic acid that is reduced by thioredoxin (Trx). In conditions of oxidative stress the peroxidatic cysteine can be overoxidized to sulfinic acid inactivating its peroxidase activity and gaining chaperone activity. A recently discovered enzyme, named sulfiredoxin (Srx), reduces the sulfinic form of 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) in the presence of ATP, Mg<sup>2+</sup> and a thiol as a reducing agent.

In plants, Srx as well as typical 2-Cys Prx have been considered exclusively chloroplast enzymes. As mitochondria are a significant site of ROS production in plants, we decided to investigate the presence of Srx in this organelle from pea and *A. thaliana*.

To explore its physiological function in plants, Srx has been cloned, expressed and purified to homogeneity, as well as five variants by site directed mutagenesis on amino acids involved in its activity. The activity of Srx, determined by a new method, is dependent on the concentration of Prx-SO<sub>2</sub>H and ATP. Four years after the discovery of Srx in plants, this work presents the first systematic biochemical characterization of Srx/Prx system from plant and contributes to a better understanding of its physiological function.

We have also studied the *in vitro* interaction of Srx with different Prxs from plant and human, as well as the role of Prx-Srx system in the antioxidant pathway in yeasts, specifically strains of *S. pombe* under oxidative stress.

In this Thesis a multidisciplinary approach has been employed using biochemical, molecular biology, proteomic and biophysics techniques.



# **INTRODUCCIÓN**

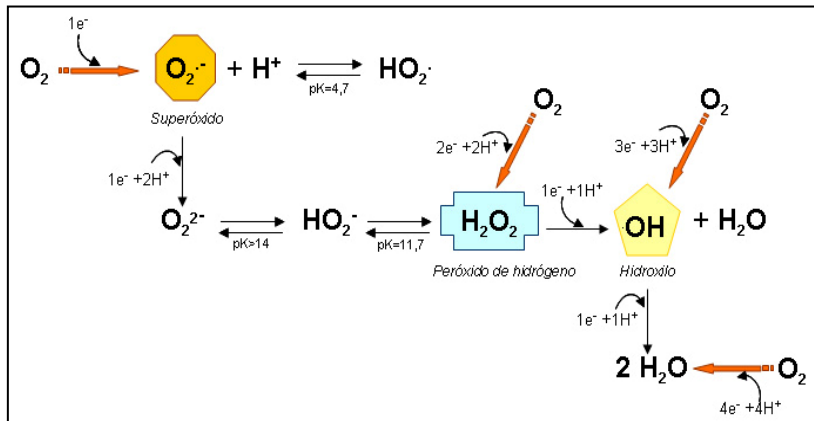


## 1.- Especies reactivas de oxígeno (ROS)

### 1.1.- Generalidades

El oxígeno representa gran parte de la composición global y es uno de los elementos más importantes en la química orgánica y en la biología, ya que es esencial para los organismos aeróbicos. Sin embargo, los productos de reducción incompleta del oxígeno generados pueden dañar moléculas biológicas (DNA, proteínas y lípidos) como consecuencia de la formación de ROS. Debido a esta paradoja, la producción y eliminación de ROS en la célula ha de estar estrictamente controlada (Ritcher y Schweizer, 1997).

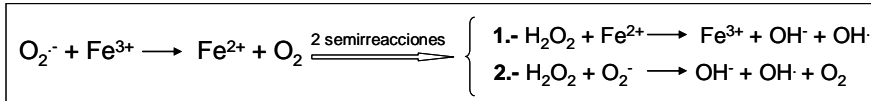
La complejidad de las características bioquímicas del oxígeno puede esquematizarse en la figura 1. El proceso de producción de ROS, que es iniciado mediante un primer paso que requiere la reducción del oxígeno, continúa con una cadena de reacciones parciales espontáneas que generan diversas especies de diferente reactividad y menos estables que el oxígeno y el agua (Foyer y Noctor, 2000).



**Figura 1.- Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la reducción del oxígeno a agua (modificado de Vranova et al., 2002).**

El radical superóxido presenta una vida media corta (2-4  $\mu$ s) (Smirnov, 1993) y se encuentra en solución en equilibrio con el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ). Son radicales que presentan una alta reactividad con determinados aminoácidos (histidina, metionina y triptófano) y con el óxido nítrico para dar lugar a peroxinitritos. Producen además daños por peroxidación lipídica en membranas celulares (Knox y Dodge, 1985).

El segundo estadio de reducción del oxígeno genera peróxido de hidrógeno, que presenta una vida media larga (1 ms) y tiene la capacidad de difusión desde su lugar de producción (Willekens *et al.*, 1997), para dar lugar a la oxidación de grupos –SH, reacción susceptible de ser inducida en presencia de metales a través de las reacciones de tipo Haber-Weiss o Fenton. En ella, el radical superóxido puede llevar a cabo la descomposición de peróxido de hidrógeno, formando el radical hidroxilo, en una reacción catalizada por trazas de  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 2).



*Figura 2. Esquema de la reacción de Fenton. Semirreacciones de generación de ROS catalizada por metales.*

La última especie generada es el radical hidroxilo, que presenta una vida media muy corta (menor de 1  $\mu\text{s}$ ) y una reactividad muy elevada en su lugar de producción. Este radical reacciona con proteínas, causando la oxidación de los grupos –SH y provocando modificaciones redox en el centro activo de enzimas, lo que lleva a su inactivación por daño oxidativo. Además, reacciona con lípidos causando su peroxidación y produce la hidroxilación de compuestos aromáticos presentes en el DNA, dando lugar a modificaciones y rupturas de las bases (Dat *et al.*, 2000).

## 1.2.- Producción de ROS en plantas

En plantas existen diversas fuentes de generación de ROS en distintos compartimentos celulares (Mittler, 2002; del Río *et al.*, 2009) (Tabla 1), algunas de las cuales están implicadas en el metabolismo normal celular como productos inevitables del metabolismo aerobio (Asada y Takahashi, 1987), como la fotosíntesis, fotorrespiración y respiración mitocondrial.

En cloroplastos, se ha descrito la generación de  $\text{O}_2^-$  a nivel de los fotosistemas I y II, de la ferredoxina-NADP<sup>+</sup>-reductasa y de la forma reducida de la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  se genera por dismutación espontánea del  $\text{O}_2^-$  y por acción de las superóxido dismutasas (SODs) que catalizan eficientemente su dismutación (Asada, 2006) y que se presentan en todos los compartimentos celulares.

Mecanismo productor	Localización	ROS mayoritaria
Transp. Electrónico fotosintético	Cloroplasto	$O_2^{\cdot-}$
Transp. Electrónico en fotorrespiración	Mitocondria	$O_2^{\cdot-}$
Glicolato oxidasa	Peroxisoma	$H_2O_2$
Clorofila excitada	Cloroplasto	$O_2^{\cdot-}$
NADPH oxidasa	Membrana plasmática	$O_2^{\cdot-}$
B-oxidación de ácidos grasos	Peroxisoma	$H_2O_2$
Oxalato oxidasa	Apoplasto	$H_2O_2$
Xantino oxidasa	Peroxisoma	$O_2^{\cdot-}$
Peroxidasas, $Mn^{2+}$ y NADH	Pared celular	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}$
Amino oxidasa	Apoplasto	$H_2O_2$

**Tabla 1.- Mecanismos y localización de ROS en plantas (adaptación de Mittler, 2002).**

En peroxisomas, los principales procesos responsables de la generación de  $H_2O_2$  son la glicolato oxidasa en la fotorrespiración, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, las flavín oxidasas y la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$ . La xantina oxidasa en la matriz y NADPH oxidasa, así como proteínas integrales y la cadena de transporte electrónico de membrana, son responsables de la generación de  $O_2^{\cdot-}$  en estos orgánulos (del Río *et al.*, 2006).

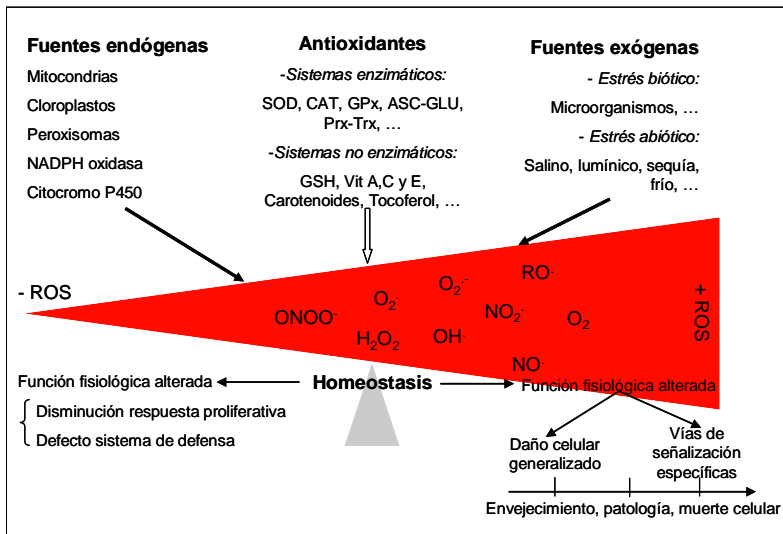
En mitocondrias, la producción de  $O_2^{\cdot-}$  ocurre por autooxidación de los componentes reducidos de la cadena respiratoria, concretamente a nivel de la NAD(P)H deshidrogenasa del complejo I, de la ubiquinona-citocromo b del complejo II, y en centros del complejo III (Dat *et al.*, 2000). La presencia en plantas de la oxidasa alternativa (AOX) en la cadena respiratoria es una de las razones de la reducida producción de ROS en mitocondrias vegetales.

Otras fuentes de producción de ROS se localizan en la pared celular con peroxidasas que producen  $O_2^{\cdot-}$  a expensas de NADH (Bolwell *et al.*, 1995) y en la membrana plasmática donde NAD(P)H oxidorreductasas generan  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Grant y Loake, 2000).

Las plantas pueden favorecer la formación de unas u otras especies por la eliminación preferencial del  $H_2O_2$  con antioxidantes o, por el contrario, acumular peróxido de hidrógeno mediante la activación de la superóxido dismutasa (SOD). Por otra parte, la acumulación de  $H_2O_2$  puede llevar a una producción mayor de ROS.

### 1.3.- Papel celular de ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen asociada una acción bivalente, ya que son producidas ante determinadas condiciones de estrés biótico y abiótico, originando daños perjudiciales en los sistemas biológicos. Pero por otro lado, es sabido que los ROS juegan un papel crucial en procesos de señalización celular actuando como mensajeros secundarios (Foyer y Noctor, 2000). Por ello, es importante el control homeostático en la célula entre la producción y la eliminación de ROS (Fig. 3), ya que su desequilibrio es responsable de la activación de procesos de estrés oxidativo y estados patológicos, como diabetes, cáncer y envejecimiento (Finkel y Holbrook, 2000).



**Figura 3.- Regulación y respuesta celular a ROS** (esquema modificado de Finkel y Holbrook, 2000).

Es escaso lo que se conoce sobre el papel señalizador del peróxido de hidrógeno y su mecanismo señalizador en plantas, aunque hay evidencias que muestran un papel señalizador del mismo en interacción planta-patógeno (Morita *et al.*, 1999) o por inducción génica en respuesta de la planta a tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Levine *et al.*, 1994).

Durante mucho tiempo, las propiedades señalizadoras de los ROS se consideraron propiedad particular del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, el conocimiento sobre la actuación como segundos mensajeros de los distintos ROS está en constante aumento. Así, células de tomate tratadas con digitonina o xantina oxidasa son capaces de disparar la acumulación de transcritos de una extensa familia multigénica (Wisniewski *et al.*, 1999). Uno de estos transcritos está

inducido específicamente por  $O_2^-$  y no por  $H_2O_2$  o compuestos generadores de  $H_2O_2$ , tales como la glucosa oxidasa. De igual manera, la acumulación de fitoalexina en cultivos celulares de perejil era inducida en mayor proporción por  $O_2^-$  que por  $H_2O_2$  (Jabs *et al.*, 1997). En callos celulares de guisante crecidos con NaCl, se produce un incremento en la tasa de producción mitocondrial de  $O_2^-$  que es acompañado de un aumento en la actividad Mn-SOD en mitocondrias de plantas tolerantes al NaCl, mientras que en mitocondrias de plantas sensibles al NaCl se producía un aumento en la actividad de CuZn-SOD I y una disminución de Mn-SOD (Hernández *et al.*, 1993). Sin embargo, en peroxisomas de guisante el NaCl no produjo ningún cambio en los niveles de superóxido ni tampoco en la actividad Mn-SOD (Corpas *et al.*, 1993). En callos celulares de guisante el NaCl induce la capacidad de eliminar  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  mediante la inducción de CuZn-SODs y peroxidasas (Olmos *et al.*, 1994).

## **2.- Sistemas antioxidantes**

En la célula existen repartidos multitud de sistemas encargados de la eliminación de los ROS producidos como consecuencia del metabolismo y de cualquier situación de estrés, a fin de mantener el equilibrio dentro de la célula. Mientras que los radicales libres oxígeno singlete y el radical  $OH^\cdot$  se cree que están fundamentalmente controlados por sistemas no enzimáticos, el radical  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  son fundamentalmente eliminados por vía enzimática. Los antioxidantes no enzimáticos son capaces de amortiguar a los ROS, mientras que los sistemas antioxidantes enzimáticos catalizan el proceso de eliminación de ROS.

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos o estequiométricos, pueden ser clasificados en reductores hidrosolubles (cisteína, glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico, glucosa, manitol o albúmina), liposolubles (vitamina E, flavonoides y  $\beta$ -carotenos) o quelantes de metales (transferrina, ferritina y fitoquelatinas) (Dietz, 2003).

El ascorbato, además de intervenir en diversos procesos y actuar como precursor y cofactor, es el antioxidante de bajo peso molecular más abundante en células vegetales (Foyer y Noctor, 2009). Está presente en todos los compartimientos y es capaz de eliminar radicales libres de manera más eficiente que el GSH (Sturgeon *et al.*, 1998), dando como producto monodeshidroascorbato (MDHA) que es reducido por la monodeshidroascorbato reductasa del ciclo ascorbato-glutatión.

Las células foliares contienen aproximadamente 1 mM de glutatión, cuya forma reducida (GSH) coexiste con su forma oxidada (GSSG). El glutatión es un tripéptido ( $\gamma$ -glu-cys-gly), responsable del intercambio tiol-disulfuro de las células, que actúa como sustrato de peroxidases, glutatión transferasas y glutarredoxinas, así como de otras enzimas implicadas en la síntesis de fitoquelatinas y asimilación de azufre (Foyer y Noctor, 2009). La síntesis de glutatión es común en todos los organismos, si bien en plantas sólo se ha demostrado la presencia de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa y glutatión sintetasa en fracciones cloroplastídica y extracloroplastídica (Rüeggsegger y Brunold, 1993), aunque se ha visto que existen altos niveles de GSH en la mitocondria (Fernández-García *et al.*, 2009).

Las enzimas que participan en el metabolismo antioxidante y las que están relacionadas con reacciones redox, se pueden clasificar según Foyer y Noctor (2009) atendiendo a los siguientes criterios:

- Enzimas que actúan como antioxidantes primarias, utilizando como sustratos,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  o peróxidos orgánicos. Las mejor estudiadas en plantas son el sistema metaloenzimático superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), así como diferentes peroxidases, entre ellas las peroxirredoxinas (Prxs).
- Enzimas que están implicadas en el mantenimiento del estado redox. En este grupo están incluidas la DHAR, la glutatión reductasa (GR) y las deshidrogenadas generadoras de NADPH, así como algunas glutarredoxinas (Grxs) y las tiorredoxinas (Trxs).
- Enzimas que controlan de forma secundaria la liberación de ciertos metabolitos que tienen función señalizadora, como son las glicosil transferasas y glioxilasas.

Las superóxido dismutasas (SOD, EC 1.15.1.1) son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$  a una velocidad una 10000 veces mayor que la dismutación espontánea del superóxido a pH fisiológico (Fridovich, 1998). Se han identificado tres tipos de SODs dependiendo de los cofactores metálicos presentes en su centro activo: Cu,Zn-SODs, Mn-SODs y Fe-SODs (Gómez *et al.*, 2004), y recientemente se han descrito las Ni-SODs (Choudhury *et al.*, 1999).

Las catalasas (CAT, EC 1.11.1.6) son hemoproteínas que suelen encontrarse en forma tetramérica cuya función principal es la protección celular frente a efectos deletéreos del  $H_2O_2$  evitando su acumulación y catalizando su reducción hasta  $O_2$  y  $H_2O$ . Se encuentra localizada en peroxisomas y glioxisomas. Aunque la catalasa en la matriz peroxisomal descompone la



mayoría del  $H_2O_2$  en estos orgánulos, su afinidad por  $H_2O_2$  es relativamente baja (Willekens *et al.*, 1995).

En vegetales, la eliminación de  $H_2O_2$  se lleva a cabo, junto con las actividades enzimáticas peroxidasas y catalasas, mediante la actividad del denominado ciclo ascorbato -glutación, que consiste en una serie de reacciones de óxido reducción acopladas en las que intervienen cuatro actividades enzimáticas: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutación reductasa (GR) (Asada, 1984). Esta ruta fue descrita en cloroplastos y denominada de Foyer-Halliwel-Asada, aunque también es activa en mitocondrias y peroxisomas (Jiménez *et al.*, 1997a). Este ciclo juega un papel muy importante en la protección de las plantas frente a los ROS producidos como consecuencia de la actividad fotosintética normal, así como ante situaciones de estrés ambiental.

La enzima APX (EC 1.11.1.11), considerada específica de tejidos vegetales, son hemoproteínas que catalizan la reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  empleando ascorbato como fuente de poder reductor, el cual se oxida a radical MDHA, que a su vez puede ser transformado a ascórbico y DHA por dismutación espontánea o reducido enzimáticamente a ascórbico por acción de la actividad MDHAR (Asada y Takahashi, 1987). Se han identificado dos isoformas cloroplastídicas y otras dos mitocondriales (Jiménez *et al.*, 1998; Chew *et al.*, 2003).

La MDHAR (EC 1.6.5.4) cataliza la reducción del radical MDHA a ascorbato jugando un papel importante en la regeneración a su forma biológicamente activa frente a ROS. La eliminación rápida de los radicales MDHA también es necesaria para la protección celular frente a sus posibles efectos dañinos (Asada, 2006). Esta actividad tiene una distribución más amplia que la APX ya que se encuentra en organismos eucarióticos incluyendo animales, plantas superiores, hongos, algas y protozoos. En plantas se encuentra con una amplia localización celular (Jiménez *et al.*, 1997b).

Cuando los radicales MDHA procedentes de la reducción del  $H_2O_2$ , no son reducidos ni a través del enzima MDHAR ni por la ferredoxina, pueden disociarse para formar ascorbato y DHA (Wells y Xu, 1994). La actividad DHAR (EC 1.8.5.1) cataliza la reducción divalente del DHA a ascorbato a expensas del GSH (Villalba *et al.*, 1995). Esta actividad se ha identificado en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas de plantas (Trumper *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 1997b).

Las guaiacol peroxidasas (EC 1.11.1.7) están involucradas en el catabolismo del peróxido de hidrógeno y, en plantas, están presentes en el citosol, vacuolas, pared celular y mitocondrias (Jiménez *et al.*, 1998)

La familia de las glutatión peroxidasas (GPX, EC 1.11.1.9) comprende una serie de enzimas que utilizan GSH para reducir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1999). En plantas pueden localizarse en citosol, cloroplasto, mitocondria y retículo endoplasmático (Rodríguez Milla *et al.*, 2003). Para su actividad catalítica usan electrones e hidrógeno de las formas reducidas del glutatión o tioredoxinas (Gelhaye *et al.*, 2004).

Las glutarredoxinas (Grx, EC 1.20.4.1) son reductasas de disulfuro que se reducen directamente por GSH (Holmgren, 1979). En la actualidad se han identificado al menos cincuenta genes en *Arabidopsis thaliana* que codifican Grxs y proteínas relacionadas (Meyer *et al.*, 2008). Estas proteínas junto con las Trxs, se agrupan en la superfamilia de Trxs, ya que a pesar de no poseer una secuencia muy similar a éstas, ambos tipos de proteínas presentan un plegamiento parecido. El conocimiento sobre su función es escaso, pero constituyen una familia en creciente evolución. Se sabe que estas proteínas junto con Trxs están implicadas en la defensa frente al estrés oxidativo ya que son capaces de reducir a las Prxs y a las sulfóxido reductasas de metionina (Delaunay *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2006); además Herrero y de la Torre-Ruiz (2007), han propuesto que estas proteínas pueden estar implicadas en el montaje FeS, ya que la inactivación de la Grx mitocondrial de *S. cerevisiae* conduce a una reducción de las proteínas que contienen un grupo FeS.

Las peroxirredoxinas (Prx, EC 1.11.1.15), que forman parte del sistema Prx-Srx, y que son objeto principal de esta Tesis, son estudiadas junto a las Trxs con más detalle en los apartados siguientes.

### **3.- Peroxirredoxinas**

#### **3.1.- Generalidades**

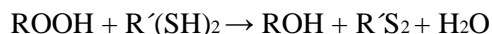
Las peroxirredoxinas (Prxs) son enzimas de entre 17 y 22 kDa presentes en todos los organismos (excepto en alguna especie del género *Borrelia*) cuya actividad peroxidasa es debida a que catalizan la transferencia de electrones de grupos sulfidrilos a peróxidos (Baier y Dietz, 1996a, 1999; Barranco-Medina *et al.*, 2009). Además, existen evidencias de que las Prxs, en

eucariotas, están implicadas en procesos de señalización redox y afectan a la fosforilación de proteínas, regulación transcripcional y apoptosis en animales (Bryk *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2005).

La amplia distribución y los elevados niveles de expresión en las células sugieren su importancia como proteínas antioxidantes y señalizadoras (Wood *et al.*, 2003). Los lugares donde el nivel de expresión de estas proteínas es alto, coinciden con aquéllos donde el metabolismo de oxígeno es alto. Así, por ejemplo, en eritrocitos, cuya función es el transporte de oxígeno, la Prx de 2-Cys representa la tercera fracción proteica predominante (Schröder *et al.*, 2000). Las Prxs son unas enzimas abundantes que constituyen entre el 0.1 – 0.8% de las proteínas solubles totales, aunque su eficiencia catalítica,  $10^6$ - $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$  (Poole, 2007), es del rango de una o tres veces menor que la GPx o catalasa (Rhee *et al.*, 2005).

La Prx se descubrió en levadura como una proteína que proporcionaba protección a los componentes celulares frente al daño oxidativo producido por sistemas de oxidación (Rhee, 2005), debido a que era capaz de reducir el  $H_2O_2$  usando como reductor un compuesto tiólico. Por ello, se le denominó inicialmente "enzima antioxidante específica de tioles" (Kim *et al.*, 1988), recibiendo otros nombres como alquil hidroperóxido reductasa (Ahp) y tiorredoxín peroxidasa (Tpx).

Las Prxs son enzimas que presentan una amplia especificidad de sustrato, reduciendo tanto el  $H_2O_2$ , como alquilhidroperóxidos y peroxinitritos. Durante el ciclo catalítico, el residuo de cisteína localizado en el sitio activo es oxidado a ácido sulfénico, mientras que el  $H_2O_2$ , peroxinitrito o el alquilhidroperóxido es reducido a agua, nitrito o el correspondiente alcohol (Hillas *et al.*, 2000; Nogoceke *et al.*, 1997; Rhee *et al.*, 2005; Dietz *et al.*, 2006):



Todas las Prxs se presentan como homodímeros y contienen un residuo de cisteína conservado en la región  $NH_2$ -terminal localizado en un ambiente estructural conservado y que es esencial para la actividad catalítica (Chae *et al.*, 1993; Baier and Dietz., 1996c; Rhee *et al.*, 2005). Ensayos de mutagénesis dirigida sobre la cisteína peroxidática ("peroxidatic cysteine") abolieron la actividad peroxidasa (König *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2004; Lamkemeyer *et al.*, 2006; Barranco-Medina *et al.*, 2007). Estas enzimas se caracterizan además porque no contienen ningún grupo hemo, por lo que para compensar la ausencia del grupo prostético necesitan un donador externo de electrones, que

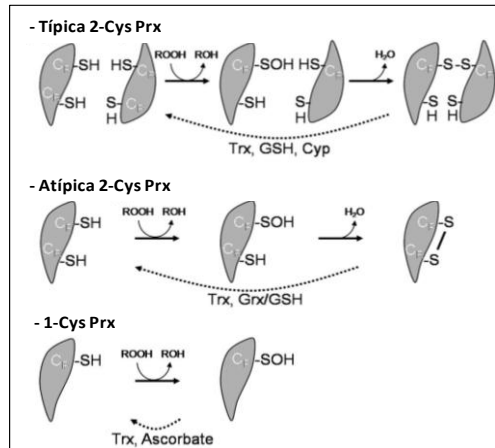
en condiciones fisiológicas generalmente es la tiorredoxina (Trx) (Chae *et al.*, 1994a; Kang *et al.*, 1998; Rhee *et al.*, 2005; Barranco-Medina *et al.*, 2009), aunque también pueden utilizar a la glutarredoxina (Grx) (Rouhier *et al.*, 2001, 2002), glutatión (Hofmann *et al.*, 2002; Dietz, 2003) y ciclofilina (Lee *et al.*, 2001, Bernier-Villamor *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006).

### 3.2.- Clasificación y mecanismo

Las seis isoformas de Prx de mamíferos han sido clasificadas en tres subgrupos, designados como Prx de 2-Cys típicas, Prx de 2-Cys atípicas y Prx de 1-Cys. Las Prx de 2-Cys típicas, que incluyen las Prx I, II, III y IV contienen la Cys N-terminal y C-terminal características necesarias ambas para el mecanismo catalítico y separadas por 121 residuos aminoácidos. Las Prxs de 2-Cys atípicas (Prx V) poseen únicamente la Cys N-terminal pero requieren de otra Cys adicional, no conservada y situada distalmente en la zona carboxílica. Las Prxs de 1-Cys (Prx VI) contienen una única cisteína y ésta se sitúa en la región N-terminal (Rhee *et al.*, 2005).

Dentro de las Prxs de 2-Cys, la Prx I y II tienen una localización citosólica, mientras que la Prx III sólo se halla en la mitocondria; la Prx IV está presente en el retículo endoplásmico y el espacio extracelular. La unidad básica de las 2-Cys Prxs activas es un dímero, que puede encontrarse en forma decamérica formada por 5 unidades diméricas, aunque se han observado otras estructuras cuaternarias (Karplus y Hall, 2007). La Prx V, perteneciente al grupo de las Prx de 2-Cys atípicas, se localiza en el citosol, mitocondria y peroxisomas, mientras que la Prx de 1-Cys es únicamente citosólica (Knoops *et al.*, 1999; Rhee *et al.*, 2005). Las Prxs atípicas se diferencian de las típicas 2-Cys Prxs en que el puente disulfuro suele ser intramolecular, aunque estructuras cristalinas recientes indican que el estado de oxidación inicial de estas Prxs contiene dos puentes disulfuro intermoleculares que posteriormente se reagrupan para formar disulfuros intramoleculares (Evrard *et al.*, 2004) (Fig. 4).

La cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) de la 2-Cys Prxs se encuentra rodeada por aminoácidos cargados positivamente que estabilizan el tiolato (Cys-S<sup>-</sup>), y se encuentra localizada en un pequeño bolsillo formado por los extremos amino y carboxilo terminales de dos subunidades (Rhee *et al.*, 2007).



**Figura 4.- Clasificación y mecanismo de las peroxirredoxinas** (modificado de Barranco-Medina *et al.*, 2009).

En el ciclo catalítico de las 2-Cys Prx, el residuo de cisteína sensible al  $H_2O_2$  (Cys51 en la Prx I de mamíferos) es selectivamente oxidado hasta Cys-SOH, que reacciona con el residuo COOH-terminal conservado (Cys172), de la otra subunidad en el homodímero, para formar un puente disulfuro intermolecular. El puente disulfuro es específicamente reducido por la Trx (Chae *et al.*, 1994c). La oxidación de la cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) produce un cambio conformacional en las regiones cercanas al centro activo de la proteína. El ciclo catalítico de todas las 2-Cys peroxirredoxinas para su actividad peroxidasa comprende tres etapas (Hall *et al.*, 2009):

1.- Peroxidación del centro activo plegado de la proteína que contiene un dominio catalítico formado por la cisteína peroxidática de menor  $pK_a$ , una arginina y una treonina responsables de la estabilización del tiolato, y una prolina que actúa como sitio de unión para el agua.

2.- Resolución por el ataque de la cisteína resolvente a la cisteína peroxidática, en su estado oxidado en forma sulfénica (Cys-S<sub>p</sub>OH), para liberar agua y formar un puente disulfuro intermolecular.

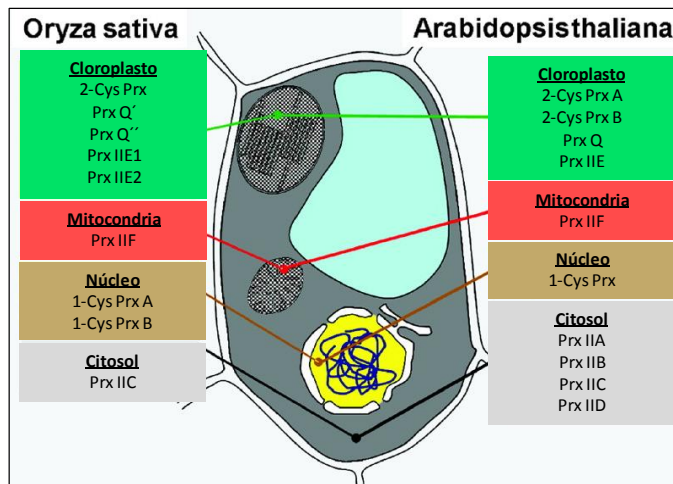
3.- Reciclado de la forma reducida de la peroxirredoxina por la acción de una molécula reductora.

### 3.3.- Peroxirredoxinas vegetales

En vegetales, las Prx pueden diferenciarse en cuatro subclases en función de su secuencia aminoacídica y mecanismo catalítico: las

peroxirredoxinas de 1-Cys (1-Cys Prx), peroxirredoxinas de 2-Cys (2-Cys Prx), peroxirredoxinas relacionadas con la proteína YLR109 (Prx tipo II) y peroxirredoxinas asociadas a la bacterioferritina (Prx Q).

Los datos disponibles sugieren que todos los tipos de Prxs (1-Cys Prx, 2-Cys Prx, Prx tipo II y Prx Q) están presentes en todas las plantas (Horling *et al.*, 2002; Dietz *et al.*, 2006) (Fig. 5). En plantas C4, la 2-Cys Prx y la Prx IIE son menos abundantes en cloroplastos de células en empalizada que en células del mesófilo (Majeran *et al.*, 2005). Existen cuatro grupos filogenéticos bien diferenciados de acuerdo a la secuencia aminoacídica de las Prxs de plantas (Rouhier y Jacquot, 2002).



**Figura 5.- Comparativa de localización subcelular de Prxs en arroz y *A. thaliana* (Modificado de Dietz *et al.*, 2006).**

La primera secuencia de cDNA de una Prx de plantas, fue la de la 1-Cys Prx, identificada como una “dormancy-related protein” expresada en embrión y capa embrionaria de cebada (Aalen *et al.*, 1994). Mediante inmunocitoquímica se desveló su localización preferencial y presencia en núcleo (Stacy *et al.*, 1999) (Fig. 5). Secuencias homólogas han sido posteriormente aisladas de otras especies vegetales, como *A. thaliana*, arroz o trigo (Lewis *et al.*, 2000). Esta clase de Prx está formada por un total de 216-220 aminoácidos, careciendo de una extensión N-terminal pero conteniendo una C-terminal responsable de la señal de exporte nuclear de la proteína.

El segundo tipo de Prx, denominada 2-Cys Prx, fue primero clonada en cebada y espinaca (Baier y Dietz, 1996a), y posteriormente en *A. thaliana*, col y otras especies vegetales (Baier y Dietz, 1996b; Horling *et al.*, 2002; Bernier-

Villamor *et al.*, 2004). La 2-Cys Prx de plantas es una enzima cloroplastídica (Fig. 5) que contiene en su extremo N-terminal el péptido señal responsable del importe de la proteína madura al cloroplasto (Baier y Dietz, 1996b). Sus secuencias contienen entre 260 y 275 aminoácidos, incluyendo los péptidos de tránsito, estando situadas sus dos cisternas conservadas a aproximadamente unos 120 aminoácidos de distancia. Son enzimas bioquímicamente dependientes de Trx (König *et al.*, 2002; Collin *et al.*, 2003), ciclofilina (Bernier-Villamor *et al.*, 2004), NADPH Tiorredoxin reductasa C (NTRC) (Serrato y Cejudo, 2004; Pérez-Ruiz *et al.*, 2006) y de la Trx cloroplastídica inducida por estrés (CDSP32) (Rey *et al.*, 2005) como sistemas reductores.

La tercera clase de peroxirredoxinas de plantas, las Prxs tipo II, fueron identificadas en un “screening” proteómico en *A. thaliana* de proteínas unidas a la Trxh mutada (Choi *et al.*, 1999). La clase de Prxs tipo II contiene unos 162 aminoácidos, pudiendo presentar extensiones en aquellos subtipos importados a orgánulos. Los genomas de *A. thaliana*, arroz y álamo, contienen un subtipo de Prx II citosólica (Prx IIC), plastídica (Prx IIE) y mitocondrial (Prx IIF) (Gama *et al.*, 2008; Finkemeier *et al.*, 2005; Barranco-Medina *et al.*, 2007, 2008) (Fig. 5). Un sexto gen codificante para una nueva Prx tipo II citosólica, la Prx IIA, ha sido identificado del genoma de *A. thaliana* (Dietz *et al.*, 2006).

Un homólogo de la proteína bacteriferritin co-migratory de *E. coli*, fue identificada en *Sedum lineare* (Kong *et al.*, 2000) y designada Prx Q, la cual se encuentra en bacterias, hongos y plantas (Kong *et al.*, 2000; Lamkemeyer *et al.*, 2006), pero no en animales. En plantas se encuentran localizada en los cloroplastos (Lamkemeyer *et al.*, 2006). Su mecanismo de acción es a través de la formación un puente disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína 44 y 49 y son aceptoras de electrones de la Trx (Collin *et al.*, 2004).

### 3.4.- Sobreoxidación

Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia de proteínas bifuncionales, debido a que poseen una actividad peroxidasa que al ser inhibida por sobreoxidación, obtienen una actividad chaperona. La función dual de las Prxs de plantas se ha visto regulada de manera alternativa por medio de estrés oxidativo acompañado de cambios estructurales. La actividad peroxidasa predomina en formas de bajo peso molecular, mientras que la actividad chaperona la presentan los complejos de alto peso molecular (Kim *et al.*, 2009).

La sobreoxidación proteica es un proceso que no está restringido únicamente a las Prxs, ya que otras proteínas pueden ser sobreoxidadas hasta su

forma sulfínica, como pueden ser la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), anhidrasa carbónica III, metaloproteinasas, protein tirosina fosfatasa (PTB) 1B, o la proteína asociada a Parkinson (DJ1). Se ha calculado que entre el 1 y el 2% de las proteínas solubles de hígado de rata se encuentran en forma sulfínica (Hamann *et al.*, 2002). La reducción no enzimática de esta forma proteica sobreoxidada requiere condiciones extremadamente reductoras, como puede ser, *in vitro*, en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol a pH 4 (Claiborne *et al.*, 1999).

El estado redox de las Prxs es un marcador de oxido-reducción altamente sensible (Cesaratto *et al.*, 2005). Estudios del estado redox en algunos tipos de Prxs, mediante geles bidimensionales, han revelado que la reacción de hiperoxidación es reversible en las células hablándose de una retrorreducción (Woo *et al.*, 2003b; Chevallet *et al.*, 2003). La sulfinilación de las Prxs ha sido propuesta como un mecanismo para la regulación del  $H_2O_2$  (Woo *et al.*, 2003a).

Chae *et al.* (1994c) describieron una posible inactivación por sustrato de las peroxirredoxinas al observar que la eliminación de peróxido de hidrógeno disminuye en células tratadas con 5 mM de  $H_2O_2$ . Posteriormente, mediante análisis proteico bidimensional, Mitsumoto *et al.* (2001) observaron especies de Prxs de menor pI en líneas celulares humanas expuestas a hidroperóxidos, concretamente de las hPrx I-IV y hPrx VI. Además, fue descrita una modificación de la cisteína 51 por sobreoxidación en la peroxirredoxina II de glóbulos rojos (Schröder *et al.*, 2000). Posteriormente, mediante espectrometría de masas y mutagénesis se confirmó la inactivación de la Prx I-SO<sub>2</sub>H por sobreoxidación en su cisteína 51 (Yang *et al.*, 2002), de manera similar que la forma truncada de la Tpx resultó resistente a la inactivación por  $H_2O_2$  (Chae *et al.*, 1994b).

Debido a que las cisteínas que forman el puente disulfuro se encuentran considerablemente separadas (unos 13 Å aproximadamente), la formación dicho puente es un proceso lento y el intermediario sulfénico (Cys51-SOH) es ocasionalmente sobreoxidado hasta ácido sulfínico (Cys51-SO<sub>2</sub>H) (Yang *et al.*, 2002). Mediante análisis comparativo estructural de la Prx II humana y la AhpC, Wood *et al.* (2003) observaron la presencia del motivo YF, C-terminal, y el motivo peptídico GGLG, cercano a la cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”), los cuales no están presentes en AhpC, resultando cruciales para que se produzca una “pausa cinética” en la que pueda atacar otra molécula de peróxido y de lugar a la forma inactiva sulfínica de la proteína. Por tanto, su homólogo bacteriano AhpC no es inactivado por sobreoxidación (Poole, 1996). Este hecho hace que las Prxs procariotas sean totalmente insensibles a la



inactivación por oxidación (Chang *et al.*, 2004), lo cual fue confirmado mediante la obtención de formas truncadas de Tpx de *S. pombe* resistentes a la sobreoxidación.

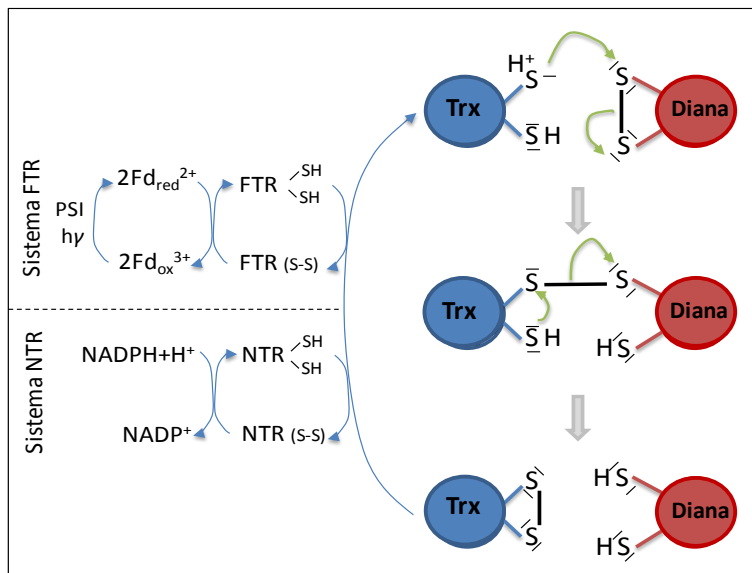
Dado que los reductores fisiológicos como el glutatión o la Trx no son capaces de reducir la forma de ácido sulfínico de las Prxs, la reacción de hiperoxidación era considerada como la inactivación permanente de la actividad peroxidasa (Chae *et al.*, 1994a; Georgiou y Masip, 2003). Sin embargo esta hiperoxidación supone una ganancia de actividad chaperona (Lim *et al.*, 2008), lo cual hizo desarrollar la hipótesis “floodgate” que atribuye a los ROS un papel regulador, que produce en la célula una serie de modificaciones y señalizaciones que pueden desencadenar a su vez diferentes cascadas de señalización celular.

La inactivación de las Prxs no sólo tiene lugar por oxidación de sus grupos tiólicos, sino también por la fosforilación de residuos de treonina, tal y como se ha demostrado para las Prx I y II de mamífero (Chang *et al.*, 2002; Rhee *et al.*, 2005).

#### **4.- Tiorredoxinas**

Las tiorredoxinas (Trx, EC 1.8.4.10) son proteínas globulares con una masa molecular alrededor de 12-14 kDa cuya función principal es reducir puentes disulfuro de otras proteínas (Jacquot *et al.*, 1997). Tienen un motivo estructural característico formado por 4 hélices  $\alpha$  rodeadas por una lámina  $\beta$  que se compone de cinco cadenas (Buchanan y Balmer, 2005). Están presentes en casi todos los seres vivos estudiados hasta la fecha, siendo en la mayoría de los casos de codificación nuclear, mostrando todas ellas sorprendentes analogías. Todas las Trxs presentan la misma conformación espacial (Eklund *et al.*, 1991), a pesar de que en algunos casos comparten homologías aminoacídicas menores al 25%. Poseen un centro activo altamente conservado (WCGPC), cuyas cisteínas pueden presentar dos estados: oxidadas formando un puente disulfuro, o reducidas en forma de ditiol. En estado reducido, son extremadamente reactivas, pudiendo romper puentes disulfuro en multitud de proteínas diana con una eficiencia hasta 10000 veces mayor que el DTT a igualdad de pH (Holmgren, 1985). Entre sus proteínas diana, se encuentran las peroxirredoxinas y las sulfirredoxinas, cuyas formas oxidadas son reducidas por la Trx para regenerar dichas enzimas y completar su ciclo catalítico (Buchanan y Balmer, 2005).

Una vez que la Trx y su proteína diana se reconocen e interaccionan, tiene lugar el mecanismo de acción de las Trxs (Fig. 6). El hecho fundamental de este mecanismo, es que las dos cisteínas del centro activo actúan de forma diferente debido a que se encuentran en diferentes ambientes (Holmgren, 1985). El bajo valor de pK de la cisteína 32 (próxima al extremo N-terminal), la convierte en muy reactiva a pH fisiológico. Además, el par de electrones desapareados del azufre de esta cisteína hace que se comporte como un buen nucleófilo a estos valores de pH. Este grupo tiol realiza un ataque nucleofílico sobre el puente disulfuro de la proteína diana, reduciéndolo y formándose un enlace disulfuro con una de las cisteínas recién liberada. Este puente disulfuro mixto es rápidamente atacado por la segunda cisteína de la Trx, dando lugar a la proteína diana reducida y a la Trx en estado oxidado. Este mecanismo de acción no es exclusivo de las Trxs, ya que las Grxs y otros reductores de puentes disulfuro reaccionan de forma similar. El modelo del mecanismo de acción supuso, no solo el conocimiento de éste, sino también la posibilidad de producir Trxs recombinantes mutadas en su segunda cisteína del centro activo, lo cual ha permitido la obtención de complejos estables entre Trxs y posibles proteínas dianas que ha conducido a la obtención de nuevos datos en la búsqueda de nuevas funciones de las Trxs (Verdoucq *et al.*, 1999).



**Figura 6.- Esquema del mecanismo de acción de las Trxs y sus sistemas FTR y NTR de regeneración.**

Cuando la Trx ha ejercido su función reductora, queda en estado oxidado, necesitando de la presencia de algún agente externo que sea capaz de

regenerar su estado reducido (Fig. 6). Algunas Trxs son reducidas por moléculas de NADPH, a través de la enzima NADPH-dependiente tiorredoxín reductasa (NTR), conformando un sistema de reducción presente en el citosol denominado como Sistema NADPH/tiorredoxina o NTS, ampliamente distribuido en los organismos vivos (Johnson *et al.*, 1987). Otras Trxs, exclusivas de organismos fotosintéticos, son reducidas por moléculas de ferredoxina procedentes de la cadena de transporte fotosintética, a través de la enzima ferredoxín-dependiente tiorredoxín reductasa, conformando un sistema cloroplastídico, paralelo al existente en el citoplasma, y denominado como Sistema ferredoxina/tiorredoxina o FTS (Buchanan, 1991). Un último sistema ha sido descrito en las mitocondrias de levadura, mamíferos y plantas (Laloi *et al.*, 2001) en el que la Trx es reducida por una enzima homóloga a la existente en el citosol, la NADPH-dependiente tiorredoxín reductasa mitocondrial.

En los seres vivos las Trxs forman una gran familia multigénica que codifican una enorme variedad de isoformas agrupadas en distintos subgrupos, en función de su estructura secundaria. Esta complejidad genómica y bioquímica alcanza su máxima expresión en las plantas superiores, donde han sido descritas, tras la finalización del proyecto de secuenciación de *A. thaliana*, más de 25 Trxs englobadas en 8 familias diferentes (Meyer *et al.*, 2002). El análisis de la estructura primaria de estas proteínas permite la clasificación de las distintas isoformas en: Trxf, Trxh, Trxm, Trxo, Trxx y Trxy. La Trx podría estar implicada en simbiosis y ser particular de cierto tipo de plantas (Alkhalfioui *et al.*, 2008). Cuando se comparan las secuencias de las Trxs de plantas con las Trxs de procariotas o de eucariotas de otros organismos, las Trxsm, x e y muestran un origen procariótico, al contrario que las Trxsf, h y o cuyo análisis filogenético apunta a un origen eucariótico (Sahrawy *et al.*, 1996; Laloi *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2003). Además de este análisis de la secuencia, la localización subcelular de las distintas Trxs es un factor muy importante para entender el sistema Trx en plantas. Los cloroplastos contienen las Trxsf, m, x, y y la atípica CDSP32 (proteína cloroplastídica susceptible de inducción por sequía), que se caracterizan por poseer un péptido señal que las dirige a este orgánulo, mientras que en mitocondrias se localizan las Trxso que poseen una extensión N-terminal que las conduce a la mitocondria. El grupo de las Trxsh constituye un grupo dispar que incluye algunas isoformas que presentan una extensión N-terminal. A pesar de que los programas bioinformáticos de predicción de la localización subcelular sugieren que se trata de proteínas citosólicas, experimentalmente existen pruebas que apuntan además a otras localizaciones. La localización nuclear de la Trx h en células de aleurona de trigo ya ha sido demostrada (Serrato y Cejudo, 2003). También se ha encontrado una localización nuclear y mitocondrial de la Trx o en hojas de guisante (Martí *et al.*, 2009). Por otra parte se han descrito recientemente

nuevas localizaciones para las Trxs *f* y *m*, exclusivamente localizadas en cloroplastos, en tejidos no fotosintéticos de plantas de guisante (de Dios Barajas-López *et al.*, 2007; Traverso *et al.*, 2008).

## **5.- Sulfirredoxinas**

### **5.1.- Descubrimiento y evolución**

La oxidación de la cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) de Prxs de dos cisteínas desde ácido sulfénico (Cys-S<sub>p</sub>OH) o su forma dimérica (Cys-S<sub>p</sub>-S<sub>r</sub>-Cys) hasta la forma sulfínica (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H) se pensaba que era una etapa irreversible. En el año 2003, Woo *et al.* mediante análisis bidimensional con S<sup>35</sup> observaron el incremento de formas sulfínicas en células expuestas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, describiendo por primera vez su reducción *in vivo*, después de la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de cicloheximida, inhibidor de la síntesis de proteínas. Este hecho sugería que la sobreoxidación de algunas proteínas no era un proceso irreversible.

Biteau *et al.* (2003) descubren en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) la sulfirredoxina (Srx) al apreciar un incremento de su expresión por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una disminución de la tolerancia a estrés en cepas delecionadas ( $\Delta$ Srx1). Es entonces cuando se describe la Srx como la enzima responsable de la reducción de ácido sulfénico (Cys-SO<sub>2</sub>H), pero no de la forma sulfónica (Cys-SO<sub>3</sub>H) que si es considerada como una forma proteica sobreoxidada irreversible para su posible degradación. La relación de la Srx con las Prxs se produce tras estudiar la formación de complejos *in vivo* Srx1/Tsa1, que no se observaron en la cepa delecionada de levadura ( $\Delta$ Tsa1) carente de la Prx. Además se observó, mediante análisis bidimensional, que en la cepa “wild type” se produce la restauración de la forma sulfínica de Tsa1, que no tiene lugar en  $\Delta$ Srx1 o se ve retardada mediante la inhibición de la síntesis *de novo* por cicloheximida, indicando que esta síntesis es necesaria para una reducción eficiente (Biteau *et al.*, 2003).

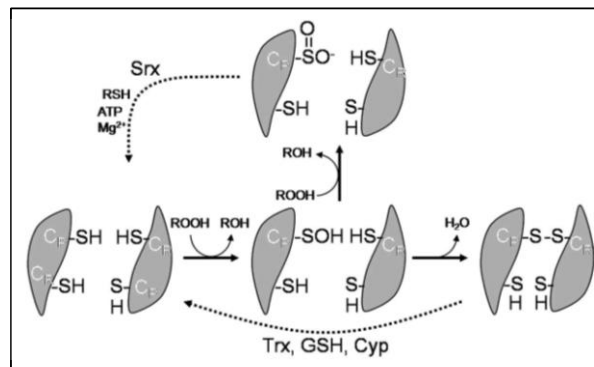
Las sulfirredoxinas (Srx, EC 1.8.98.2) están muy conservadas en todos los organismos, teniendo un 30% de identidad entre ellas, con un motivo conservado (GCHR), dentro del sitio activo de la proteína, que contiene la cisteína catalítica (Rey *et al.*, 2007). Su mayor variabilidad aminoacídica reside en su extremo N-terminal, donde pueden existir péptidos señal que dirijan a la proteína a orgánulos concretos. La sulfirredoxina vegetal contiene un péptido señal de importe a cloroplastos (Liu *et al.*, 2006). La Srx presente en el género

nostoc, posee tan sólo 87 aminoácidos, y representa la mínima estructura proteica con actividad reductora de la forma sulfínica.

Evolutivamente, se piensa que la sulfirredoxina pueda haber derivado desde una “DNA-binding” protein involucrada en partición cromosómica bacteriana (Basu *et al.*, 2005), denominada ParB, con la que presenta secuencia y estructura similar. Dicha hipótesis implica la sustitución evolutiva de un glutámico por la cisteína catalítica conservada, responsable de la actividad de la Srx.

## 5.2.- Mecanismo de acción

Las Srxs son proteínas conservadas presentes en grandes y pequeños eucariotas responsables de la catálisis enzimática de la reducción de la forma sobreoxidada de la Prx mediante un residuo conservado de cisteína. La retroreducción de la forma sulfínica por las Srxs supone un proceso lento ( $k_{cat} = 0.18 \text{ min}^{-1}$ ) (Chang *et al.*, 2004) que requiere ATP (eficientemente reemplazado por GTP, dATP o dGTP) como fuente de energía, magnesio (u otro metal bivalente) como cofactor y un donador electrónico como el glutatión (GSH) o la tiorredoxina (Trx) como reductor (Biteau *et al.*, 2003) (Fig. 7). La Srx humana presenta una  $k_M = 1.8 \text{ mM}$  para el GSH, mientras que para la Trx la  $k_M = 1.2 \text{ }\mu\text{M}$ , ambos en el rango de concentraciones intracelulares. El  $pK_a$  de la hSrx es bajo (7.9), indicando su estado reducido normal de la cisteína catalítica (Chang *et al.*, 2004).



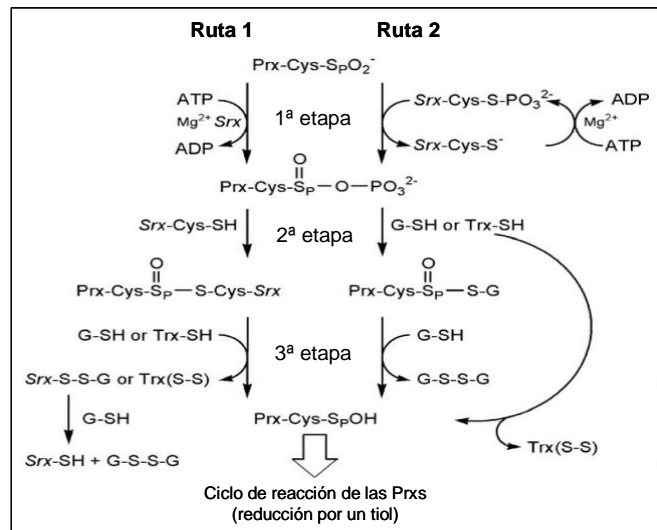
**Figura 7.- Ciclo de sobreoxidación de las peroxirredoxinas** (modificado de Barranco-Medina *et al.*, 2009).

La retroreducción de la cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) sobreoxidada hasta su forma sulfínica, se produce por una unión específica de la Srx, que reconoce residuos críticos superficiales de la 2-Cys Prx. La Srx

transfiere el  $\gamma$ -fosfato del ATP, siendo crucial su cisteína conservada y la presencia de reductor (Rhee *et al.*, 2007).

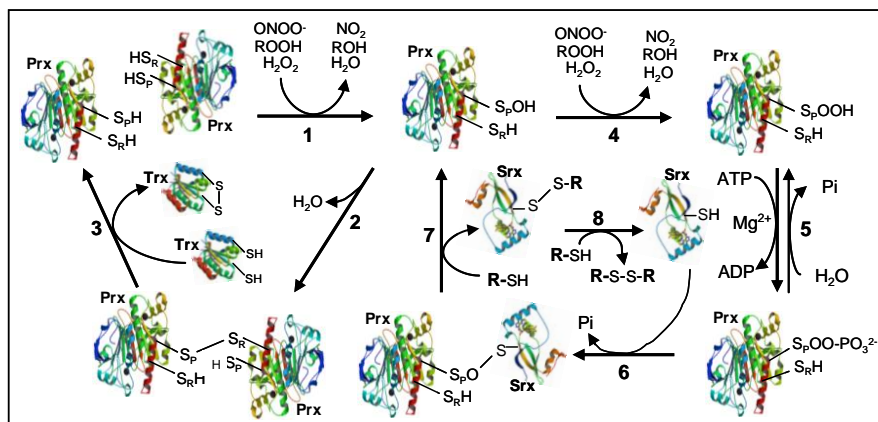
Desde el punto de vista mecanístico, dos modelos diferentes han sido propuestos para explicar el mecanismo de acción de la Srx (Fig. 8):

- Un átomo de oxígeno del ácido sulfínico de la Prx sobreoxidada actúa como nucleófilo y produce un ataque al  $\gamma$ -fosfato del ATP, dando lugar al fosforil-ester como intermediario, que es resuelto por ataque nucleofílico de la cisteína de la Srx (Biteau *et al.*, 2003; Jönsson *et al.*, 2008a). Por tanto, la Srx actúa como una fosfotransferasa y tioltransferasa (Fig. 8, ruta 1).
- La cisteína catalítica de la Srx produce un ataque al  $\gamma$ -fosfato del ATP, resultando la formación de un tio-fosfato como intermediario que reacciona con el motivo del ácido sulfínico de la Prx, dando lugar a un sulfínico-fosforil ester que es resuelto por medio de un reductor (Jeong *et al.*, 2006). En esta hipótesis, la Srx actúa como una fosfotranferasa e implica la formación del complejo Srx-ATP (Fig. 8, ruta 2).



**Figura 8.- Comparación entre los mecanismos de reacción propuestos de la Srx** (esquema basado en Jönsson y Lowther, 2007). La ruta 1 representa el mecanismo original propuesto para la Srx1 de levaduras, y la ruta 2 representa el esquema propuesto a partir de la hSrx. La 1ª etapa da lugar a la formación de un sulfínico fosforil ester intermediario. En la 2ª etapa de la reacción, un grupo tiol es responsable de la formación de un tiosulfinato intermedio alternativo. La hidrólisis de dicho intermediario se da en la 3ª etapa de la reacción finalizando con la forma sulfénica de la Prx que entra en el ciclo de las peroxirredoxinas.

Ambas hipótesis sobre el posible mecanismo de la Srx son posibles, aunque en los últimos años, y debido a los trabajos del grupo de Jönsson, cobra más fuerza la primera de ellas. La figura 9 representa un esquema detallado del mecanismo de acción aceptado de la Srx. En dicho esquema, se representa el ciclo catalítico de las Prxs de 2 cisteínas, cuya cisteína peroxidática (“peroxidatic cysteine”) es oxidada hasta su forma sulfénica (Prx-Cys<sub>p</sub>-SOH) en presencia de ROS (Fig. 9, etapa 1), para formar un homodímero (Prx-Cys<sub>p</sub>-S-S-Cys<sub>r</sub>-Prx) (Fig. 9, etapa 2) que es reducido por un reductor como la tiorredoxina (Trx) (Fig. 9, etapa 3). A altos niveles de ROS, la Prx puede ser sobreoxidada hasta su forma sulfínica (Prx-Cys<sub>p</sub>-SO<sub>2</sub>H) (Fig. 9, etapa 4) que puede ser retrorreducida mediante una etapa reversible en la que el ácido sulfínico es fosforilado por un ataque directo del  $\gamma$ -fosfato del ATP en presencia de Srx (Fig. 9, etapa 5). El fosforil-éster (Prx-SO<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) es espontáneamente convertido en tiosulfinato (Prx-SO-S-Srx) con la liberación de fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>). Un agente reductor (R-SH), que puede ser Trx, GSH o DTT, reduce a continuación el complejo formado, dando lugar a Prx-Cys<sub>p</sub>-SOH y Srx-S-S-R (Fig. 9, etapa 7), que son a continuación reducidos (Fig. 9, etapa 8).



**Figura 9- Ciclo catalítico de la Srx** (modificado de Iglesias-Baena et al., 2010).

En ausencia de agente reductor en condiciones *in vitro*, tiene lugar un *ciclo fútil* debido a la reversibilidad de la etapa 5 de la figura 9, produciéndose una liberación superior de P<sub>i</sub> delimitada por la concentración de ATP en la mezcla de reacción. En cambio, en presencia de reductor, la reacción progresa

y da lugar a una generación de  $P_i$  delimitada por la cantidad de Prx-SO<sub>2</sub>H (Roussel *et al.*, 2008; Jönsson *et al.*, 2008b; Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

La retroreducción por parte de la Srx está restringida actualmente a las 2-Cys Prxs o Prxs típicas. Concretamente reduce la forma sulfínica de las Prxs I-IV de mamíferos y la 2-Cys Prx de plantas. Se ha comprobado mediante Western blot de 2D-PAGE y usando anticuerpos específicos de la forma sobreoxidada de las Prxs, que la Srx de rata no reduce a la Prx atípica humana (hPrx V) ni la Prx de 1 cisteína (hPrx VI) (Woo *et al.*, 2005).

### 5.3.- Sestrinas

Las sestrinas (Sesns) han sido descritas en mamíferos como una familia de proteínas de 48-60 kDa con capacidad regeneradora de las Prxs y cuya expresión se encuentra regulada por la proteína P53 en respuesta a estrés (Budanov *et al.*, 2004). Fueron descubiertas como dianas de la proteína p53 (Velasco-Miguel *et al.*, 1999).

Las sestrinas humanas son clasificadas en tres tipos diferentes: Sesn1, una PA26 (p53-activated protein); Sesn2, una Hi95 protein; y Sesn3. Las Sesn2 y 3 incrementan su expresión en respuesta a hipoxia (Kopnin *et al.*, 2007).

El grupo del Dr. Chumakov ha descrito que las sestrinas 2 son capaces de reparar las hPrxs I y II mediante un mecanismo catalítico que requiere ATP, Mg<sup>2+</sup> y DTT. El silenciamiento transcripcional del gen que codifica la Sesn2 produce elevados niveles intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que la sobreexpresión de esta enzima produce una disminución de los niveles de ROS (Budanov *et al.*, 2004).

Además, se ha descrito su regulación neuronal por una vía de acetilación de histonas, de manera similar a la Srx (Soriano *et al.*, 2009). Sin embargo, recientemente se ha visto que la Sesn2 no posee actividad reductora de la forma sulfínica de las Prxs (Woo *et al.*, 2009).

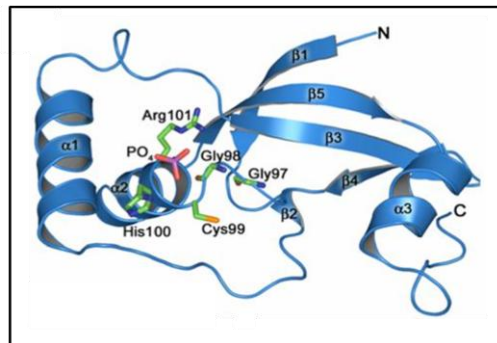
### 5.4.- Estructura

La estructura de la Srx humana ha sido estudiada mediante cristalografía de rayos X y por RMN (PDB code 1XW3). También se han estudiado los complejos formados por Srx-ATP y Srx-ADP (PDB codes



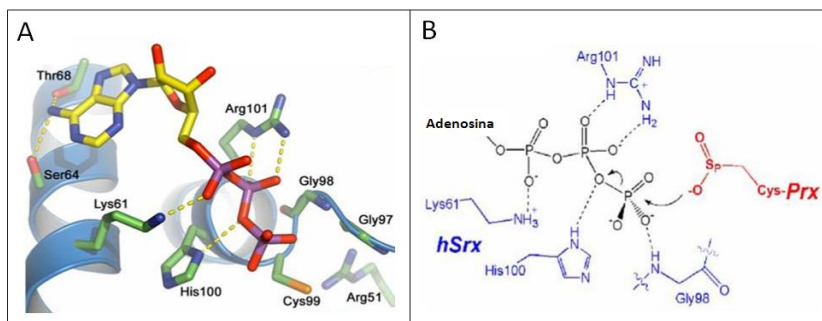
1XW4, 1YZS), lo cual ayuda a un estudio más profundo del mecanismo de acción enzimática (Jönsson *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2006).

La hSrx posee 3  $\alpha$ -hélices y 5 láminas  $\beta$  (Fig. 10). La  $\alpha 2$  es rica en enlaces por puentes de hidrógeno y contiene el motivo funcional que se encuentra unido a moléculas de agua y fosfato proveniente del tampón (Jönsson y Lowther, 2007) que estabiliza la molécula. Dicho fosfato, de la estructura nativa, es reemplazado por el  $\beta$ -fosfato del ADP.



**Figura 10.- Estructura cristalina de la hSrx-ATP** (Jönsson y Lowther, 2008).

La unión con el ATP de la Srx no se produce por puentes de hidrógeno al anillo de ribosa, pero sí intervienen restos  $-\text{NH}_2$  de la lisina 61, histidina 100, glicocola 98 y arginina 101 que forman enlaces débiles con los oxígenos de los  $\alpha, \beta, \gamma$ -fosfatos (Fig. 11).



**Figura 11.- Modelo estructural propuesto del mecanismo de acción de la hSrx.** (Modificado de Jönsson y Lowther, 2007) **A.** Complejo Srx-ATP basado en la estructura cristalina de la unión al ADP. **B.** Residuos implicados en la unión al ATP mediante puentes de hidrógeno en la primera etapa de la reacción de la Srx de hidrólisis del  $\gamma$ -fosfato del ATP.

La Srx no hidroliza el ATP por sí sola, ya que carece de residuos típicos de las ATPasas o kinasas (Rhee *et al.*, 2007). En cambio, se ha descrito que aspártico 187 en Prx I y asparragina 186 en Prx II se encuentran en contacto con el  $\beta,\gamma$ -fosfato del ATP y podrían ser responsables de su hidrólisis.

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la Srx unida a la Prx, se han descrito aminoácidos de superficie expuestos (arginina 51, aspártico 56 y aspártico 80) posiblemente involucrados en la interacción de ambas enzimas (Jönsson y Lowther, 2007).

## **6.- Papel biológico del sistema peroxirredoxina / sulfirredoxina**

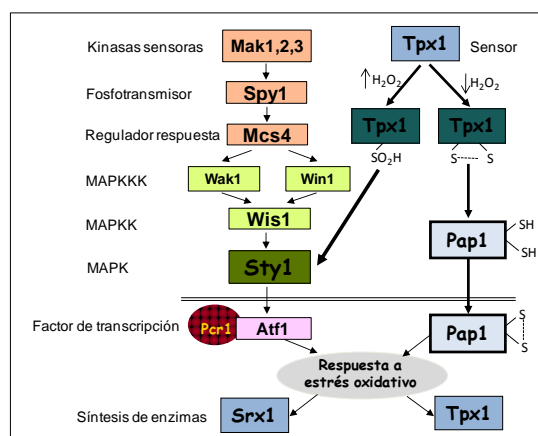
Los ROS han sido descritos como moléculas que actúan como segundos mensajeros celulares, por lo que la actividad peroxidasa puede estar relacionada con la eliminación de estas moléculas señalizadoras. En cambio, bajo condiciones de estrés, se dan procesos de sobreoxidación de proteínas, que en el caso de las Prxs producen la inactivación de su actividad peroxidasa y la ganancia de actividad chaperona (Lowther y Haynes, 2010). Este cambio de actividad, regulado por Srx, puede tener una importancia crucial en los procesos de señalización celular. La actividad de la Srx para reducir la forma sulfínica de la Prx y su actividad como deglutationiladora (Findlay *et al.*, 2005), pueden estar involucradas en la prevención de la degradación proteica y en otros procesos aun por estudiar.

La importancia biológica que tiene la reducción de la forma sulfínica de las 2-Cys Prxs por medio de la Srx, se debe a las funciones que posee dicha forma sobreoxidada, regulada por esta enzima. Pero además tiene otras implicaciones, directas debido a otros papeles de la Srx, e indirectas debido al papel de ROS en la célula.

La Srx se relaciona con la 2-Cys Prx, que está programada para su inactivación durante la catálisis, en presencia de elevados niveles de  $H_2O_2$ . Este hecho no ocurre en otras peroxidases como la catalasa o glutatión peroxidasa, y sí en las 2-Cys Prxs de eucariotas debido a que contienen el motivo C-terminal GGLG. En Prxs de levaduras, con dicho motivo truncado, se pierde la inactivación por sobreoxidación (Koo *et al.*, 2002). Las Prxs-SO<sub>2</sub>H de levadura y humana cPrx y Prx II, respectivamente, se encuentran en estado oligomerizado (decámeros), formando estructura toroidal de alto peso molecular (HMW) que posee actividad chaperona, la cual está regulada por la Srx, implicada en la recuperación de la actividad peroxidasa (Jang *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2005).

Recientemente se ha descrito que la Prx I humana es inactivada por fosforilación en la membrana de la célula, donde como consecuencia se produce una elevación de los niveles de  $H_2O_2$  alrededor para activar los procesos de señalización celular (Woo *et al.*, 2010). El sistema Prx/Srx se ha involucrado en procesos de señalización de factores de crecimiento mediados por receptores tirosin kinasas tanto en mamíferos (Lei *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008) y en levaduras (Vivancos *et al.*, 2005). Choi *et al.* (2005) demostraron que la Prx II es un regulador negativo del PDGF (“platelet-derived growth factor”) y su deficiencia da lugar a un incremento de la proliferación celular. Las Prxs pueden ser inducidas por radiaciones y su expresión podría determinar la sensibilidad a los procesos de radioterapia de las células cancerígenas, pudiendo ser las Prxs posibles dianas para la radioterapia en procesos cancerígenos (Zhang *et al.*, 2009).

En levadura (*Schizosaccharomyces pombe*) se ha descrito el papel de la Prx (Tpx1) en el control redox de la célula. El grupo de la Dra. Hidalgo describió que en condiciones de bajos niveles de  $H_2O_2$ , se produce la activación por oxidación (Cys 501 - Cys 523) del factor de transcripción Pap1 (cJun en humanos), que es importado al núcleo para activar la transcripción de Tpx1 (Fig. 12). En cambio, con altos niveles de  $H_2O_2$ , se produce la activación de la MAPK Sty1, que activa al factor de transcripción Atf1 para la expresión de la Srx1 (Vivancos *et al.*, 2005). En cepas de levaduras con la delección del exportador nuclear de Pap1, Crm1, da lugar a la acumulación de Pap1 oxidado en el núcleo y la sobreexpresión de Tpx1. Por tanto, la forma sulfénica de la Prx activa la expresión de Tpx1, mientras que la forma sulfínica de la Prx activa la expresión de la Srx1, actuando la Prx como sensor.



**Figura 12.- Modelo de activación de la cascada de señalización de Sty1 y Pap1 en respuesta a estrés oxidativo en *S. pombe* (modificado de Vivancos *et al.*, 2005).**

La Srx humana se ha localizado en abundancia en tejidos como sangre, donde en glóbulos rojos alcanza concentraciones de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , en cerebro, colon, hígado, pulmón y médula espinal (Chang *et al.*, 2004). Además de la actividad reductora de la Srx, ésta posee una actividad deglutationiladora de la 2-Cys Prx (Findlay *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009), lo cual puede tener gran importancia biológica al participar en procesos de modificación postraduccional de proteínas. La prevención de la oxidación irreversible hasta la forma sulfónica y la función deglutationiladora de las Srx, han hecho relacionar a esta enzima con la prevención de la degradación proteica que tiene lugar en aquellas proteínas sobreoxidadas o glutationiladas. De hecho, estas proteínas modificadas se encuentran en mayor cantidad en diferentes situaciones patológicas, como la enfermedad de Parkinson, llegándose a proponer la Srx como potencial agente terapéutico (Findlay *et al.*, 2005).

A la Srx de plantas se le atribuye una localización cloroplastídica (Liu *et al.*, 2006), donde la producción de ROS es elevada. En cambio, en otros orgánulos de elevada producción de ROS, como las mitocondrias, no sería de descartar la posibilidad de su presencia para regenerar la forma sobreoxidada de las Prxs mitocondriales. De hecho, Noh *et al.* (2009) han observado el transporte de la hSrx a la mitocondria en células embrionarias bajo condiciones de estrés para la reducción de la forma sulfínica de la típica hPrx III.

El genoma de *A. thaliana* codifica a genes receptor-like kinasas (RLK) que han sido identificados como reguladores de la proliferación de las células vegetales (Chae *et al.*, 2009; Smet *et al.*, 2009). En este sentido, líneas mutantes de plantas “knock out” en el gen que codifica a la Srx (*AtSrx*) fueron más susceptibles a estrés oxidativo, concretamente a estrés por paraquat, que las plantas “wild type” (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, Rey *et al.* (2007) observaron que esta línea mutante presentaba menor daño oxidativo que la “wild type” bajo tratamiento foto-oxidativo.

## **OBJETIVOS - OBJECTIVES**



## **Objetivos**

El sistema antioxidante Prx / Srx tiene gran importancia en células eucariotas, debido a que estas enzimas, además de estar involucradas en procesos de defensa antioxidante, están implicadas en procesos de señalización como posibles reguladoras de rutas metabólicas. Debido a estas consideraciones, y teniendo en cuenta los escasos estudios realizados hasta la fecha, los objetivos propuestos en este trabajo son:

- 1.- Clonación y caracterización del gen que codifica la Srx de *Pisum sativum* (PsSrx) y *Arabidopsis thaliana* (AtSrx).
- 2.- Obtención de cinco proteínas mutantes de la AtSrx en diferentes residuos implicados en su mecanismo de acción: R28Q, K40Q, C72S, E76A y R28Q/E76A.
- 3.- Sobreexpresión de las enzimas como proteínas recombinantes en *E. coli* y desarrollo de un protocolo de purificación de las mismas.
- 4.- Obtención de anticuerpos policlonales específicos frente a la Srx.
- 5.- Caracterización bioquímica de la Srx, así como de sus proteínas mutantes, para el estudio de su funcionalidad y de los residuos implicados en la actividad catalítica.
- 6.- Estudio de la localización subcelular, cloroplastídica y mitocondrial, de la Srx mediante técnicas inmunocitoquímicas y de importe a orgánulos.
- 7.- Caracterización de la interacción *in vitro* de la Srx con la Trxo y diferentes Prxs.
- 8.- Estudio del papel del sistema Prx / Srx en la ruta de defensa antioxidante en *S. pombe* empleando cepas sometidas a estrés oxidativo.
- 9.- Análisis de la regulación de la expresión de la Srx en plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo.
- 10.- Estudio del papel fisiológico de la Srx y Prxs-SO<sub>2</sub>H, en el desarrollo de *A. thaliana* y en el estado redox de las Prxs, empleando líneas mutantes.

## **Objectives**

The Prx / Srx antioxidant system has a great biological importance in eukaryotic cells, due to these enzymes not only are involved in processes of antioxidant defense, also for their implication in signaling processes as possible regulators of metabolic routes. Bearing these considerations in mind and the few studies currently available, the objectives of the present work are:

- 1.- Cloning and characterization of the gen encoding the Srx from *Pisum sativum* (PsSrx) and *Arabidopsis thaliana* (AtSrx).
- 2.- Generation of five mutant proteins of AtSrx in several residues involved in its mechanism: R28Q, K40Q, C72S, E76A and R28Q/E76A.
- 3.- Over-expression of the enzymes as recombinant proteins in *E. coli* and development of protocols for their purification.
- 4.- Generation of polyclonal antibodies against Srx.
- 5.- Biochemical characterization of wild type Srx and its variants in order to clarify its functionality and the residues involved in its catalytic activity.
- 6.- Study of the subcellular localization (chloroplastidic and mitochondrial) of Srx by means of immunocitochemistry and import techniques.
- 7.- Characterization of the interaction of Srx *in vitro* with Trxo and different Prxs.
- 8.- Study of the role of Prx / Srx system in the antioxidant pathway of *S. pombe* using stains under oxidative stress.
- 9.- Analysis of the expression of Srx in plants under oxidative stress conditions.
- 10.- Study of the physiological role of Srx and Prxs-SO<sub>2</sub>H in the development of *A. thaliana* and the redox state of Prxs, using mutant lines.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- Material vegetal**

### **1.1.- Cultivo**

#### **1.1.1.- Guisantes**

Las semillas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. *Lincoln*) fueron suministradas por la casa comercial Fito. Las semillas se dejaron en agua durante la noche y se dispusieron sobre vermiculita adecuadamente humedecida en bandejas de plástico. La germinación y crecimiento se realizó en cámara botánica bajo las siguientes condiciones: 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PAR) de irradiación; fotoperíodo: 16 h luz, 8 h oscuridad; Hr: 65% día, 80% noche; Temperatura: 24°C día, 18°C noche. Se aplicó un riego diario con *Solución Nutritiva de Hoaglands* al 10%, cuyo stock al 100% contiene fosfato potásico monobásico 1 M, nitrato cálcico 1 M, nitrato potásico 1 M, cloruro sódico 3 M, sulfato magnésico 1 M, sulfato potásico 0.5 M, micronutrientes y hierro.

#### **1.1.2.- *Arabidopsis thaliana***

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia), empleadas en este trabajo, fueron suministradas por SALK y pertenecen a las líneas transgénicas (T-DNA insertion) (Alonso *et al.*, 2003) indicadas en la Tabla 2.

Nombre	Mutante	Inserción	Gen	Línea
AtWT	Cepa salvaje	-	-	-
Prx B	2-Cys Peroxirredoxina	<i>At 2-Cys Prx B</i>	AT5G06290	SALK 149311
Prx IIF	Peroxirredoxina IIF	<i>At Prx IIF</i>	AT3G06050	SALK 027291
Srx	Sulfirredoxina	<i>At Srx</i>	AT1G31170	SALK 015324

**Tabla 2.- Cepas de *Arabidopsis thaliana*.**

Para el cultivo en tierra, las plántulas, dispuestas en macetas, se hicieron crecer en cámara de cultivo a 22°C/18°C (día/noche), con intensidad de luz de 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (PAR), con fotoperíodo de ciclo corto (8 h de luz) o ciclo largo (12 h de luz), realizando un riego regular cada 2 días. La germinación en tierra se realizó distribuyendo las semillas sobre la superficie de macetas de una mezcla de tierra hortícola/vermiculita (3:1) estéril.

Para el cultivo en placa, las semillas esterilizadas fueron germinadas sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962). 100 mL de medio contiene 0.215

g MS (Duchefa, Haarlem, Netherlands) y 0.44 g de *Phytigel* (Sigma, Germany). El pH se ajustó a 5.7 con KOH y se autoclavó para su esterilización. Para la esterilización superficial de las semillas, estas se trataron 5 min. con etanol 70% (v/v) y SDS 0.1% (p/v) en campana de flujo y se lavaron con agua destilada estéril 3-5 veces.

La selección de las líneas mutantes de *A. thaliana* se realizó siguiendo los métodos recomendados por [www.signal.salk.edu](http://www.signal.salk.edu). Se crecieron en placa Petri conteniendo MS y kanamicina a una concentración final de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tras 48 h a 4°C en oscuridad, para la sincronización de su germinación, se cultivaron en cámara. Se realizó el trasplante de las resistentes y se obtuvo la segunda generación para selección de las líneas homocigotas por PCR y confirmadas por Western blot. La obtención de las semillas de mutantes confirmados se realizó tras 6-8 semanas de crecimiento y después de dejar secar las silicuas.

### **1.2.- Transformación de *A. thaliana* por *Agrobacterium tumefaciens***

La transformación por infiltración se realizó cuando el tallo floral de la planta alcanzó aproximadamente unos 10 cm de longitud. Las células para la transformación se resuspendieron y crecieron a 28°C en solución de infiltración, compuesta por medio YEBS (ver Tabla 4) con 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  de Silwett L75. La parte aérea de la planta se sumergió en este medio durante 30 s y se cubrió con bolsa plástica durante 18 h en oscuridad y humedad, para seguir creciendo posteriormente en cámara de cultivo hasta la obtención de sus semillas.

La selección de los transformantes se realizó por crecimiento de las semillas en placa de MS, conteniendo los antibióticos de selección (gentamicina 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y kanamicina 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Las plántulas resistentes se trasplantaron a tierra con un herbicida de contacto (40 mg/L de BACTA, Glufosinato amónico, Finale de Bayer).

### **1.3.- Tratamientos de plantas**

Las plantas de guisante y *A. thaliana* se sometieron a diferentes tratamientos de estrés oxidativo, que se engloban dentro de estrés abiótico y biótico.

### 1.3.1.- Estrés abiótico

Las plantas de guisante de 15 ó 21 días fueron sometidas a distintos tratamientos para su estudio. El estrés oxidativo se llevó a cabo mediante aplicación en spray a las 24-48 h de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM, terc butil-hidroperóxido (TBHP) 20 mM o glutatión reducido/oxidado 20 mM, conteniendo Tween 20 al 0.05% (v/v). Como control se trataron paralelamente plantas de guisante con una solución constituida únicamente por Tween 20 al 0.05% (v/v).

Para realizar el estrés salino, se regaron las plantas de guisante con solución nutritiva de Hoaglands con la concentración de NaCl deseada según se indica en la tabla 3. El material foliar (hoja media) y raíz se recogió a los 15-21 días de desarrollo.

Día:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
	Siembra	Germinación														Muestra	Muestra				
Control	Riego con Solución Nutritiva de Hoaglands																				
200 mM	Riego con Soluc. Nut.	50 mM NaCl					Riego con 200 mM de NaCl en Solución Nutritiva														
250 mM	Riego con Soluc. Nut.	50 mM NaCl					Riego con 250 mM de NaCl en Solución Nutritiva														

**Tabla 3.- Tratamiento de estrés salino en guisantes.**

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron sometidas a diferentes tratamientos de estrés oxidativo por aplicación con spray de soluciones de Tween 20 al 0.05% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 y 50 mM. Estos tratamientos se realizaron en maceta antes de la floración de la planta. También se realizaron tratamientos de *A. thaliana* en placa conteniendo medio MS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o Paraquat a diferentes concentraciones, añadidos al medio después de ser esterilizado y una vez enfriado sin llegar a solidificar. Las semillas se depositaron ordenadamente sobre el medio en cámara de flujo. Se consideró como un estrés abiótico por luz las plantas de *A. thaliana* cultivadas en cámara de cultivo de ciclo largo (12 h de luz).

### 1.3.2.- Estrés biótico

Las hojas de *A. thaliana* se inocularon con una suspensión de *Pseudomonas syringae* en solución de inoculación (MgCl<sub>2</sub> 10 mM) a alta densidad (10<sup>6</sup> ufc): solución bacteriana a O.D. de 0.1 a 600 nm. Se realizó con jeringa sobre el envés de varias hojas basales de la planta antes de desarrollar el

tallo floral. Las plantas habían sido previamente expuestas a alta intensidad lumínica y humedad para favorecer la apertura estomática e inoculación foliar.

#### **1.4.- Extractos vegetales**

Para la obtención de extractos proteicos de material vegetal (hoja y raíz) se realizó un homogenado en mortero de 1 g. de tejido con 2 mL de tampón de extracción (fosfato potásico 100 mM pH 7.0, conteniendo inhibidores de proteasas) y se filtró con doble capa de nylon. Seguidamente se centrifugó 15 min. a 16000 xg, recogiendo el sobrenadante para su estudio.

#### **1.5.- Parámetros oxidativos**

A las plantas sometidas a estrés oxidativo mediante alguno de los tratamientos indicados se le midieron en hoja y/o raíz, diferentes parámetros basados en la determinación de niveles de radicales libres y del daño oxidativo producido a lípidos y proteínas.

##### **1.5.1.- Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

La cuantificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en homogenados vegetales frescos de hoja y raíz se realizó según el método de Frew *et al.* (1983), basado en la medida espectrofotométrica a 505 nm de la formación de una quinona como resultado de la oxidación, catalizada por la peroxidasa, del fenol y de la 4-aminoantipirina. Para ello, se preparó una solución, en tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7.0), de fenol 2.5 mM, 4-Aminoantipirina 5 mM y  $2 \times 10^{-9}$  UE de Peroxidasa (Sigma). A 4 mL de esta solución, se le añadieron 50-200  $\mu$ L de muestra, se llevó a un volumen de 10 mL con agua y se midió su absorbancia a 505 nm. Se preparó, como referencia, una curva patrón de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 a 20  $\mu$ M).

##### **1.5.2.- Determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hoja**

La detección histoquímica del peróxido de hidrógeno y radicales superóxido en hoja, se llevó a cabo mediante la tinción *in situ* dependiente de POX endógeno, como describe Hernández *et al.* (2001). Para ello, las hojas cortadas se infiltraron en vacío con 0.1 mg mL<sup>-1</sup> de 3,3'-diaminobenzidina

(DAB) en tampón Tris-acetato 50 mM (pH 5.0) y se incubaron a 25°C durante 24 h en oscuridad. Las hojas se lavaron con etanol al 80% (v/v) durante 10 min. a 70°C y con la mezcla hidroalcohólica de ácido láctico:fenol:agua (1:1:1, v/v/v) y se fotografiaron.

### 1.5.3.- Peroxidación lipídica

Para la medida del daño oxidativo a lípidos se determinó el índice de *Peroxidación lipídica*, utilizando el método de Buege y Aust (1972), basado en la medida a 535 nm del contenido de malondialdehído (MDA).

El reactivo para la determinación de peroxidación lipídica se preparó mezclando, con agitación, TCA al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375% (p/v), hidroxibutiltolueno (BHT) al 0.01% (p/v) y ácido clorhídrico al 2% (v/v). A 200 µL de extracto vegetal se le añadió 1 mL de reactivo caliente y protegido de la luz. Se calentó 15 min. con agitación a 95°C y se centrifugó a 2000 xg durante 5 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 535 nm. La curva patrón se elaboró simultáneamente con un rango de 0-5 µM de MDA.

### 1.5.4.- Carbonilación de proteínas

Para la medida del daño oxidativo a proteínas, se determinó el índice de proteínas carboniladas o carbonil-proteínas en extractos vegetales.

Para la cuantificación directa de los niveles de carbonil-proteínas se siguió el método descrito por Prasad (1997), basado en la reacción de la dinitrofenilhidrazina (DNPH) en medio ácido y medida espectrofotométrica a 360 nm. Los extractos vegetales se trataron previamente con sulfato de estreptomina al 10% en tampón fosfato potásico 100 mM (pH 7.4), y se incubaron 15 min. a temperatura ambiente con objeto de precipitar el DNA. Tras 10 min de centrifugación a 13000 xg, se tomaron 400 µL de sobrenadante y se le añadieron 100 µL de una solución ácida de DNPH 20 mM en HCl 2 mM, previamente filtrada tras ser preparada con agitación durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se le añadieron 500 µL de TCA al 20% (p/v) para precipitar proteínas y se centrifugó en frío a 16000 xg durante 3 min. El sedimento obtenido se lavó tres veces con 1 mL de etanol:acetato de etilo (1:1 v/v) y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, resuspendiendo el sedimento final con 600 µL de guanidina 6 M. Después de incubar durante 15 min. a 37°C se centrifugó a 16000 xg 3 min. y se midió la absorbancia a 360

nm para la cuantificación de las proteínas carboniladas según su coeficiente de extinción molar ( $22000 \text{ M}^{-1}$ ).

Los niveles de proteínas carboniladas se determinaron también mediante Western blot de extractos vegetales incubados con DNPH, mediante el uso del anticuerpo frente a DNP, revelado por quimioluminiscencia y análisis cuantitativo de la imagen.

### **1.6.- Medidas de fluorescencia**

La medida de emisión de fluorescencia de la clorofila en superficie de tejido foliar se ha determinado mediante el uso del Fluorímetro (PAM-2000) y el Fluorímetro de imagen (Fluor Cam). Las imágenes son adquiridas por medio de una cámara CCD sincronizada con una lámpara pulsátil y procesadas por medio de un software específico (Camille 1.05). Para ello, las plantas son adaptadas previamente a la oscuridad durante 1 h.

Los niveles basales de fluorescencia ( $F_0$ ) se excitan por una luz roja-azul modulada a 800 Hz durante 2 s de iluminación, mientras que los niveles máximos de fluorescencia ( $F_m$ ) se inducen por un pulso de luz blanca intensa de 800 ms. La medida de fluorescencia de clorofila se realizó sobre varias hojas de cada planta y sobre diferentes plantas, para obtener valores medios de  $F_0$  y  $F_m$ . La eficiencia de energía de excitación capturada por el PSII correspondiente a la probabilidad de absorción fotónica de los centros de reacción, fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

El FluorCam permite la adquisición de imágenes de plantas estresadas, junto a sus controles, en escala falsa de colores para el análisis en hoja de la eficiencia fotosintética y la determinación de la disipación de energía fotoquímica (“quenching”) mediante pulsos saturantes con luz (reversible) y pulso saturantes sin luz (irreversible).

### **1.7.- Aislamiento de orgánulos**

El aislamiento de cloroplastos y mitocondrias de hojas de plantas controles o tratadas de guisante y *A. thaliana* se llevó a cabo en cámara fría,



con todos los materiales y reactivos usados enfriados previamente a la temperatura de 4°C.

### **1.7.1.- Cloroplastos intactos y fraccionamiento cloroplastídico**

El aislamiento de cloroplastos se llevó a cabo según el método propuesto por König *et al.* (2002). Unos 10 g de hojas jóvenes se homogeneizaron en tampón Tricina 20 mM (pH 8.4) que contiene sorbitol 0.3 mM, ascorbato 2 mM, EGTA 5 mM, EDTA 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y 0.1% (p/v) de BSA. El homogenizado se filtró y centrifugó a 3000 xg a 4°C durante 1 min. El sedimento se resuspendió cuidadosamente con 1 mL de tampón HEPES 20 mM (pH 7.9) que contiene sorbitol 0.3 mM, ascorbato 2 mM, EDTA 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10 mM, 0.1% (p/v) de BSA y MgCl<sub>2</sub> 5 mM. Los cloroplastos fueron aislados en gradiente de Percoll entre el 100% (fondo del tubo de 25 mL) y el 35% (v/v). El extracto se depositó en la superficie del gradiente y se centrifugó a 3000 xg durante 30 min. a 4°C. Se recogió cuidadosamente la interfase de cloroplastos intactos y se lavaron con el tampón anterior y la suspensión se centrifugó a 3000 xg durante 10 min. Finalmente se resuspendieron en 1 mL del tampón en baño de hielo, ayudándonos de una brocha. Para comprobar la integridad de los cloroplastos, se observaron al microscopio electrónico mediante visualización de la autofluorescencia de la clorofila.

Para la separación de las fracciones estromática y tilacoidal, los cloroplastos intactos se rompieron, mediante choque osmótico, en tampón fosfato potásico 5 mM (pH 7.5) durante 15 min y posterior centrifugación a 50000 xg a 4°C durante 30 min. Se recogió el sobrenadante (fracción estromática), mientras que el sedimento (fracción tilacoidal), tras sucesivos lavados con la solución anterior y centrifugaciones en condiciones similares, se resuspendió en el mismo volumen final que la fracción estromática.

Para el estudio de la localización intratilacoidal se procedió a la separación del lumen tilacoidal de las membranas tilacoidales según el método descrito por König *et al.* (2003). La fracción tilacoidal se resuspendió en tampón de mantenimiento (HEPES 30 mM pH 7.8, sacarosa 100 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 2 mM) en baño de hielo y se trató con digitonina 2 µM durante 2 min. La digestión de las proteínas tilacoidales expuestas se detuvo mediante la adición de EDTA 50 mM. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón de lavado tilacoidal A (HEPES 50 mM pH 7.8, sacarosa 100 mM, NaCl 30 mM y EDTA 50 mM), centrifugando a 7500 xg. Seguidamente se realizaron otros dos lavados con tampón de lavado tilacoidal

B (HEPES 30 mM pH 7.8, Sacarosa 100 mM, NaCl 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM) centrifugando a 7500 xg. A continuación, se procedió a la ruptura tilacoidal con prensa French a 10 MPa (1500 Psi) y posterior ultracentrifugación a 200000 xg durante 1 h para la separación de las fracciones soluble (lumen) y membranosa (membranas tilacoidales). Esta fracción (sedimento) se lavó con tampón de lavado tilacoidal B y se untracentrifugó en las condiciones anteriores.

### 1.7.2.- Mitocondrias intactas y fraccionamiento mitocondrial

El aislamiento de mitocondrias se realizó según Barranco-Medina *et al.* (2007). Se homogeneizaron 100 g de hojas en 100 mL de tampón de extracción: TES-NaOH 50 mM (pH 7.5), manitol 0.3 M, BSA 0.5% (p/v), PVP-40 0.5%, EGTA 2 mM y cisteína 20 mM (añadida extemporáneamente). El homogenado se filtró primero a través de tela de nylon y después a través de una membrana de miracloth. Dicho filtrado se centrifugó en tubos de 250 mL a 1500 xg durante 15 min. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 18000 xg otros 15 min. El sedimento obtenido se resuspendió muy suavemente en 1 mL de tampón de lavado (TES-NaOH 10 mM pH 7.5, manitol 0.3 M) con la ayuda de un pincel. Esta resuspensión fue depositada en la parte superior de un tubo de 40 mL que contenía un gradiente discontinuo de percoll que constaba de tres capas: 5 mL de una solución de Percoll al 50%, 10 mL de Percoll al 28% en la fase intermedia y 15 mL de Percoll al 20% en la capa la más superficial. La mezcla se centrifugó a 40000 xg durante 30 min. Se eliminó el volumen hasta el fondo del gradiente de Percoll al 28%, mediante succión, y las mitocondrias se tomaron cuidadosamente evitando su ruptura. Posteriormente se realizaron varios lavados con 25 mL de tampón de lavado y la mezcla se centrifugó a 18000 xg durante 10 min. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y finalmente las mitocondrias se resuspendieron en Tris-HCl 25 mM (pH 7.0).

El fraccionamiento mitocondrial se realizó mediante ruptura completa por sonicación en frío. Las mitocondrias rotas se centrifugaron a 18000 xg durante 30 min. para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción de membranas mitocondriales (sedimento). Estas últimas se lavaron varias veces mediante resuspensión en tampón de lavado y centrifugación.

### 1.8.- Importe a orgánulos

El ensayo *in vitro* de importación de la Srx de *A. thaliana*, de codificación nuclear y con un extremo amino responsable de su importe organular, se realizó con cloroplastos y mitocondrias intactas aisladas de *A. thaliana* WT y  $\Delta$ Srx. Para ello se utilizó la AtSrx nativa (nAtSrx), que contiene el péptido señal N-terminal, clonada con una cola de histidinas en el extremo carboxilo para facilitar su purificación y su detección diferencial mediante Western blot.

El método está basado en el sistema *in vitro* de importe dual descrito por Rudhe *et al.* (2002), que permite el ensayo de importe a ambos orgánulos por separado o simultáneamente, con el objeto de estudiar el importe preferencial tras la separación por fraccionamiento. La solución para el importe contenía tampón HEPES-KOH 15 mM (pH 7.4), sacarosa 0.3 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, BSA 0.2%,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, metionina 4 mM, ATP 4 mM, GTP 1 mM, ADP 0.2 mM, succinato 5 mM, DTT 4.5 mM, acetato potásico 10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM y proteína pura de interés 30  $\mu\text{M}$ .

### 1.9.- Determinación de clorofila

La determinación de clorofilas en extractos vegetales se realizó mediante la cuantificación espectrofotométrica de las clorofilas a y b. Para ello, a 10-30  $\mu\text{L}$  de extracto ( $V_m$ ) se le adicionó hasta 1 mL de acetona fría al 80% (v/v), y se incubó durante 10 min. en hielo. A continuación, se centrifugó a 16000 xg durante 5 min. a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se determinó la absorbancia a 663, 645 y 730 nm, máximos de absorción de la clorofila a, clorofila b y otros pigmentos, respectivamente. Se restó, para cada longitud de onda, la absorbancia de la acetona al 80% con tampón, como blanco. Para la cuantificación de clorofilas, se siguieron las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \mu\text{g Clor. a / mL} &= [(\text{D.O.}_{663 \text{ nm}} / \text{D.O.}_{730 \text{ nm}}) \times 8.02] / V_m \\ \mu\text{g Clor. b / mL} &= [(\text{D.O.}_{645 \text{ nm}} / \text{D.O.}_{730 \text{ nm}}) \times 20.2] / V_m \\ \mu\text{g Clorofila / mL} &= (\mu\text{g Clor. a / mL}) + (\mu\text{g Clor. b / mL}) \end{aligned}$$

## **2.- Bacterias**

### **2.1.- Cepas y medios de cultivo**

Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta para la transformación de *A. thaliana*, mientras que la cepa bacteriana empleada para la infección de plantas (estrés biótico) fue *Pseudomonas syringae*. Además, diferentes cepas de *Escherichia coli* fueron utilizadas para técnicas de clonación.

Los medios de cultivo empleados fueron LB (Luria Bertani) líquido, LB agar (LB Broth Lennox) y YEBS, cuya composición y utilización se detalla en la tabla 4. Todos los medios de cultivo se autoclavaron para su esterilización. La manipulación de los cultivos bacterianos se realizó en una cabina de flujo laminar horizontal (Telstar modelo TV-100), para evitar la contaminación de los mismos.

Medio de cultivo	Composición	Utilidad
LB	Bacto-triptona 1% (p/v) NaCl 1% (p/v) Extracto de levadura 0.5% (p/v) Ajustar pH 7.0 con NaOH	Cultivo de <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> y <i>Pseudomonas syringae</i>
LB agar	LB Agar bacteriológico 1.5% (p/v)	Crecimiento y selección en placa de <i>E.coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> y <i>P. syringae</i>
YEBS	Extracto de levadura 1 g L <sup>-1</sup> Extracto de ternera 5 g L <sup>-1</sup> Sacarosa 5 g L <sup>-1</sup> Bacto peptona 5 g L <sup>-1</sup> Sulfato de Magnesio 0.5 g L <sup>-1</sup> Ajustar pH 7.0 con NaOH	Cultivo y transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

**Tabla 4.- Medios de cultivo bacteriano.**

Para la selección de transformantes, los medios de cultivo se suplementaron con distintos antibióticos: ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>), kanamicina (50 µg mL<sup>-1</sup>), rifampicina (50 µg mL<sup>-1</sup>), tetraciclina (50 µg mL<sup>-1</sup>) y estreptomycin (50 µg mL<sup>-1</sup>). Todas las soluciones de antibióticos se prepararon en solución concentrada para su stock y esterilizaron por filtración a través de filtros de 0.45 µm para ser adicionada a los medios previamente autoclavados.

## 2.2.- Bacterias competentes

Las cepas *Escherichia coli* empleadas para su transformación con ADN plasmídico fueron DH5 $\alpha$ , para transformación de productos de clonación y BL21, para expresión. A continuación, se relaciona cada cepa y el genotipo descrito para ella:

- DH5 $\alpha$ : *E. coli* endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 D (lacZYA-argF) U169 (m80lacZDM15).
- BL21 (DE3): *E. coli* B F- dcm ompT hsdS (rB- mB-) gal I (DE3).

Estas cepas están modificadas genéticamente, de manera que es posible inducir en laboratorio la competencia de las células así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

### 2.2.1.- Preparación

Se sembraron en placa de LB agar y se incubaron durante 12 h en estufa a 37°C. Una vez crecidas las colonias, se tomó una de ellas y se inoculó en 3 mL de medio LB. El inóculo se creció a 37°C con agitación durante 12 horas. Posteriormente, 1 mL de este cultivo líquido se utilizó para inocular 100 mL de medio LB, con incubación a 37°C y agitación hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, que se determinó midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm. Una vez hubo alcanzado la fase logarítmica, el cultivo se incubó en hielo durante 10 min. para detener el crecimiento bacteriano y se centrifugó a 4°C y 3000 xg durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 30 mL de una solución fría de MgCl<sub>2</sub> 100 mM. Se centrifugó a 4°C y 2100 xg durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 50 mL de una solución de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se dejó en hielo durante 20 min. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 4°C y 2100 xg durante 10 min. y el precipitado se resuspendió en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 10 mM y 15% de glicerol (v/v). Finalmente, se recogieron alícuotas de 100  $\mu$ L que se guardaron a -80°C hasta su uso. Todo el proceso se llevó a cabo en cabina de flujo con esterilidad.

### 2.2.2.- Transformación

El proceso de introducción del DNA plasmídico en bacterias competentes se denomina transformación. Para que la transformación sea efectiva es necesario tratar previamente a las bacterias para hacerlas

competentes, es decir, más susceptibles a la entrada del DNA plasmídico. La transformación de bacterias competentes (DH5 $\alpha$  y BL21), se realizó mediante la técnica de *choque térmico*, como se describa a continuación:

- Se incubó, durante una durante 1 h en hielo, una alícuota de 100  $\mu$ L de las bacterias competentes con el DNA recombinante que se desea transformar. Posteriormente, se incubó la mezcla a 42°C durante 1.5-2 min., para inducir a las bacterias a aceptar moléculas de DNA, y se mantuvo en hielo 5 min.
- Se añadió 1 mL de medio LB a la muestra y se incubó a 37°C durante 1 h.
- Por último, se sembraron las bacterias ya transformadas en medio LB-agar conteniendo antibióticos y marcadores de selección adecuados. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h.

Las transformaciones en cepas de *Escherichia coli* se conservaron a -80°C con glicerol al 50%.

### **2.3.- Transformación con *Agrobacterium***

Se cultivó un inóculo de 50  $\mu$ L de *Agrobacterium tumefaciens* en 5 mL de YEBS (Tabla 4) suplementado con el antibiótico adecuado, en incubador a 250 rpm y 28°C durante dos días. El cultivo se sometió a fuerte agitación para romper los grumos formados por agregación de células y se tomó una alícuota de 0.5 mL que se inoculó en 60 mL de YEBS y se cultivó a 28°C y 250 rpm durante toda la noche. El cultivo se incubó en hielo durante 10 min. y se centrifugó a 3500 xg y 4°C durante 5 min. El sedimento resultante se resuspendió en 20 mL de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 20 mM y se centrifugó a 3500 xg 5 min. para eliminar los restos de antibiótico. Se resuspendió nuevamente el sedimento en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 20 mM frío, y se tomaron 150  $\mu$ L de esta suspensión celular a los que se añadieron al menos 10  $\mu$ g de plásmido. Se agitó la mezcla y se congeló en nitrógeno líquido durante 5 min. Después de descongelar a temperatura ambiente, se adicionó 1 mL de LB y se transfirió el cultivo a tubos estériles de 2 mL, que se incubaron durante 5-8 h en agitación a 28°C. A continuación, se sembró el cultivo en medio LB-Agar suplementado con el/los antibióticos de selección y se incubó a 28°C hasta la visualización de colonias en unos tres días.

## 2.4.- Aislamiento de DNA plasmídico

Para el aislamiento de DNA plasmídico se partió de cultivos bacterianos crecidos durante la noche en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados a cada caso. Se utilizaron los kits comerciales “Kit Miniprep” (Dominion MBL) y *Gen Elute 5-Minute Plasmid Miniprep Kit* (Sigma). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante, obteniéndose DNA libre de RNA.

## 3.- Levaduras

### 3.1.- Cepas y condiciones de crecimiento

Se han empleado las siguientes cepas de *Schizosaccharomyces pombe* (Tabla 5) construidas en el laboratorio de la Dra. Hidalgo y otras obtenidas de una colección de mutantes korena de *S. pombe* que poseen deleciones por inclusión de “casets” dentro del genoma de la célula para el gen concreto. Estas cepas se conservan en glicerizados de medio rico a -80°C, son crecidas en placas de medio rico sólido (YE5S) a 30°C y fueron chequeadas para confirmar su deleción.

Nombre	Cepa	Descripción
WT	972	<i>h</i>
$\Delta sty1$	AV18	<i>h<sup>-</sup> sty1::kanMX6</i>
$\Delta pap1$	AV25	<i>h<sup>-</sup> pap1::kanMX6</i>
GFP-Pap1	EHH14	<i>h<sup>+</sup> his2 ura4-D18 pap1::ura4-D18 leu1-32 nmt::GFP-pap1::leu1<sup>+</sup></i>
C2D-Pap1	C2D	<i>h<sup>-</sup> ura4-C2D pap1::ura4<sup>+</sup></i>
$\Delta atf1$	AV15	<i>h<sup>-</sup> atf1::kanMX6</i>
$\Delta srx1$	EA38	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 srx1::kanMX6</i>
GFP-Sty1	EHH5	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 sty1::GFP::kanMX6</i>
WisDD	KS2088	<i>h<sup>-</sup> ura4-D18 wis1DD::12myc::ura4<sup>+</sup> leu1-32 sty1::HA6H::ura4<sup>+</sup></i>
$\Delta pyp1$	29E11	<i>h<sup>-</sup> pyp1::kanMX6</i>
$\Delta tpx1$	AV25	<i>h<sup>-</sup> tpx1::kanMX6</i>
$\Delta trx1$	MJ2	<i>h<sup>-</sup> trx1::kanMX6 ura4-D18 leu1-32</i>
$\Delta trx2$	29D1	<i>h<sup>-</sup> trr1::kanMX6</i>
$\Delta trr1$	Caf4	<i>h<sup>-</sup> trx2::kanMX6</i>

Tabla 5.- Cepas de *S. pombe* utilizadas.

El medio rico de levaduras YE5S, está compuesto por 5 g de extracto de levaduras Difco, 30 g de glucosa, 0.25 g de uracilo, 0.25 g de leucina, 0.25 g de lisina, 0.25 g adenina y 0.25 g de histidina, para completar con agua hasta 1 L y proceder a su autoclavado

### **3.2.- Extractos y tratamientos**

Los extractos de levaduras se obtuvieron mediante la ruptura de las células en cultivos en medio rico líquido una vez alcanzada una D.O. de 0.5 a 600 nm, En los tratamientos de estrés oxidativo se le adicionaron al medio diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o cafeína. Ambos tratamientos se realizaron en medio rico líquido o sólido. Para el tratamiento en placa, la cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína se adicionó al medio fundido atemperado.

Para obtener extractos de proteínas solubles, se recogieron 5 mL de cultivo en medio líquido y se adicionó 5 mL de TCA al 100% (p/v). Se centrifugó a 4°C y se lavó con TCA al 20%. Las células son lisadas mediante su resuspensión en TCA al 12.5% con “glass beads” (perlas de vidrio) y agitación fuerte a 4°C durante 10 min. El sedimento es recogido por centrifugación y es lavado con acetona fría. Finalmente se deja secar el extracto proteico por evaporación en estufa.

Para el análisis por inmunoblot, dichos extractos podían requerir la alquilación de los tioles libres presentes en la proteína a detectar, para lo cual el sedimento obtenido se incubó durante 15 min. a 25°C con Tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), SDS 1% (p/v) y EDTA 1 mM.

### **3.3.- Estudios de viabilidad**

Los *estudios de viabilidad* se realizaron mediante el crecimiento, de diluciones seriadas de células, en placas de medio rico (YE5S agar), conteniendo o no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o cafeína, depositadas con replicador estéril en forma de “spots”. Las placas sembradas de forma secuencial se incubaron durante 3-4 días a 30°C.



### **3.4.- Curvas de crecimiento**

Las curvas de crecimiento de las levaduras se realizaron mediante cultivos en placas de 96 pocillos a 30°C y agitación, para su lectura automatizada de la D.O. a 600 nm cada 10 min. Las células se crecieron en medio rico YE, conteniendo o no algún tratamiento de estrés oxidativo. Para ello, 20-50 mL de extracto de levaduras se creció, previamente, a 30°C con agitación, hasta una D.O. de 0.3 a 600 nm, momento en que se diluyó a 100 µL en medio rico hasta una D.O. final de 0.025 a 600 nm. Posteriormente se continuó creciendo en placa, bajo las mismas condiciones, en el espectrofotómetro Power Wave microplate scanning (Bio-Tek). Los datos se registraron mediante el software Gen5 para obtener la curva de crecimiento.

### **3.5.- Estudio de muerte celular**

La cuantificación porcentual de muerte celular se midió en FACS (“Fluorescence Activated Cell Sorting”) por cultivo de levaduras crecido en medio rico, con o sin tratamiento, al que se adicionó ioduro de propidio. La medida de producción de ROS en las cepas crecidas se realizó por fluorescencia en FACS, por adición de DFCDA (“5-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester”), que se incubó durante una hora a temperatura ambiente para reaccionar con los ROS. Esta medida se determinó en unidades arbitrarias.

### **3.6.- Fluorescencia mediante GFP**

Las cepas de levadura, construidas con proteínas fusionadas a GFP (“Green Fluorescence Protein”), se visualizaron, con o sin tratamiento, mediante microscopía de fluorescencia en microscopio Nikon Eclipse E600 con objetivo 100x. Para ello se colocó un volumen de 25 µL de levaduras en fase exponencial de crecimiento que se fijó en portaobjetos con poli-L-lisina 1:5, se aspiró por vacío y se cubrió con 5 µL de glicerol 50%. Una vez puesto el cubre se observó con objetivo de inmersión a diferentes tiempos de exposición. La distinción nuclear se realizó con la adición de 2.5 µL de DAPI (“4',6-diamidino-2-phenylindole”) a la preparación en lugar de glicerol. La imagen obtenida mediante Orca II Dual Scan Cooled CCD Camera (Hamamatsu) fue analizada mediante el software Hamamatsu Aqua-Cosmos 2.0.

## **4.- Biología molecular**

### **4.1.- Extracción de DNA genómico**

Para la extracción del gDNA se partió de 1 g de tejidos foliares y se utilizó el Kit “*Wizard SV Genomic DNA Purification System*” suministrado por la casa comercial Promega, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. La cuantificación y calidad del DNA purificado se realizó mediante el sistema micro-espectrofotométrico Nanodrop.

### **4.2.- Extracción de RNA mensajero**

Para la extracción de RNA mensajero a partir de hoja y raíz de material vegetal joven, el tejido se homogeneizó en mortero esterilizado en autoclave y enfriado con nitrógeno líquido. Se utilizó el “*mRNA Isolation kit*” de Roche, con el que se aísla mRNA poliadenilado utilizando oligo-dT, biotina y partículas magnéticas de estreptavidina, siguiendo las especificaciones del fabricante. Su cuantificación se realizó en el Nanodrop y la muestra se guardó a -80°C.

### **4.3.- Obtención de cDNA**

Se realizó mediante la retrotranscripción del mRNA, obtenido puro de material vegetal, usando la Superscript II retrotranscriptasa suministrada por la casa comercial Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de cDNA/mRNA obtenida, se trató con 1 U de RNasaH y se incubó durante 30 min. a 37°C. El cDNA de cadena sencilla se purificó con el kit “*Concert Rapid Purification System*”.

### **4.4.- Tratamiento enzimático del DNA**

#### **4.4.1.- Poliadenilación**

El tratamiento del cDNA para su poliadenilación en el extremo 3' se realizó incubándolo con dATP 2.5 mM durante 3 min. a 94°C. A continuación, se enfrió en hielo y se añadió 15 U de la enzima transferasa de desoxinucleótidos terminal (TdT), incubando la mezcla 30 min. a 37°C.

Finalmente, la enzima se inactivó incubando 10 min. a 70°C y el cDNA obtenido, conteniendo una cola de poliA en el extremo 3', se guardó a -20°C hasta su uso.

#### 4.4.2.- Digestión

Las reacciones de digestión se realizaron tratando el volumen adecuado de DNA, vector plasmídico o vector recombinante con 10-15 U de enzima de restricción, 2 µL de tampón 10x específico para cada enzima, según las indicaciones del fabricante, y agua destilada estéril hasta un volumen final de 20 µL. La solución se incubó, generalmente, 2 h a 37°C. En el caso de las digestiones realizadas con dos enzimas de restricción, el tiempo de incubación se incrementó hasta 3 h. Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo han sido *Bam*HI, *Hind*III y *Nco*I, suministradas por la casa comercial Roche.

#### 4.4.3.- Ligación

Para las reacciones de ligación, se utilizó una relación inserto:vector 3:1. Se mezclaron el inserto con el vector, además de 1 µL del tampón de ligación y 1 µL de T<sub>4</sub> DNA ligasa. A continuación, se añadió agua autoclavada hasta completar un volumen de 10 µL y por último, se incubó la reacción en un baño a 10°C durante 18 h.

#### 4.5.- Vectores y oligonucleótidos

Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo, así como el tamaño, resistencia para su selección, casa comercial y utilidad de cada uno de ellos, se resumen en la tabla 6.

Vector	Tamaño	Resistencia	Casa comercial	Utilidad
pGEM-T	3000 pb	Ampicilina	Promega	Clonación de productos de PCR
pMBL-T	2946 pb	Ampicilina	MBL	Clonación de productos de PCR
pETM-11	6029 pb	Kanamicina	Novagen	Sobre-expresión con cola de His
pET-3d	4640 pb	Ampicilina	Novagen	Sobre-expresión sin cola de His
pG0229.35	4632 pb	Kanamicina	pGreen	Transformación de <i>A. thaliana</i>
pJIC.SaRep	3000 pb	Tetraciclina		Replicasa A en <i>Agrobacterium</i>

**Tabla 6.- Vectores plasmídicos utilizados.**

Los oligonucleótidos diseñados (Tabla 7) fueron sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC, Granada).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Utilidad
Srx-F	CACCATGGACGGTTCGCCGCCGGTGAT	Clonación AtSrx y PsSrx Confirmación $\Delta$ Srx y 5'-RACE
Srx-R	TAAGGCATCATCTTCTCTGAGGTACCAA	
PsSrxA-F	GGTCTTCAAGTACCTATTGATGTG	Secuenciación PsSrx y 5'-RACE
PsSrxB-F	CCAACTATACGTTGCAAAAATCCG	
PsSrxC-R	CGGATTTTGCAACGTATAGTTGG	
OligodT	pd-T18	Secuenciación
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Confirmación clonación Secuenciación
R28Q-F	TTGGAGAAGATACGACAACCGTTGAT	R28Q AtSrx
R28Q-R	ATCAACGGTTGTCGTATCTTCTCAA	
K40Q-F	TCTTTCACTTGGTTCTGATCGTTGGA	K40Q AtSrx
K40Q-R	TCCAACGATCAGAACCAAGTGAAAGA	
C72S-F	TATCTGTGACTTCCCGAGAACCCATA	C72S AtSrx
C72S-R	TATGGGTTCTCGGGAAGTCAAGATA	
E76A-F	TGTCACTAGAACGCGGCGCATCAG	E76A AtSrx
E76A-R	CTGATGCGCCGCGTATCTGTGACT	
RACE	GTCCTAGTCGACGCGTGGCC	5'-RACE
RACE-T	GGCCACGCGTCGACTAGGAC -T18	
Act-F	TGGTGTTAGTCACACGGTTC	qRT-PCR Actina
Act-R	CTGCAGAAGTGGTGAAAGTG	
PrxII-F	CCTGAGAACAAGCACGTCAAGT	qRT-PCR PrxII C
PrxII-R	CGAATGCCGAGGCCTTTA	
PrxF-F	ACCGACTTCGTTCTTCTCA	qRT-PCR PrxII F
PrxF-R	TCTGCTGCATCCAATGTTTC	
Srx-F	CCGTCAAATCGGTCTTCAAGT	qRT-PCR Srx
Ps-SrxC	CCAACTATACGTTGCAAAAATCCG	
LbaI	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG	Inserción <i>A. thaliana</i>
2-Cys Prx A-F	CAAAGCCCAGGCCGATGATC	Confirmación $\Delta$ PrxA
2-Cys Prx A-R	TCATTGTCTCATCAACGCTTCG	
2-Cys-Prx B-F	CATCCTCTTCTCTGTTCGG	Confirmación $\Delta$ PrxB
2-Cys Prx B-R	TCTCATTGTCTCATCAACTTC	
AtSrx-F	GGATCCATGGCGAATTGATGATG	Complementación Srx en <i>A. thaliana</i>
AtSrx-R	TCCGTAGTAGAAGCGACTTTCGAA	

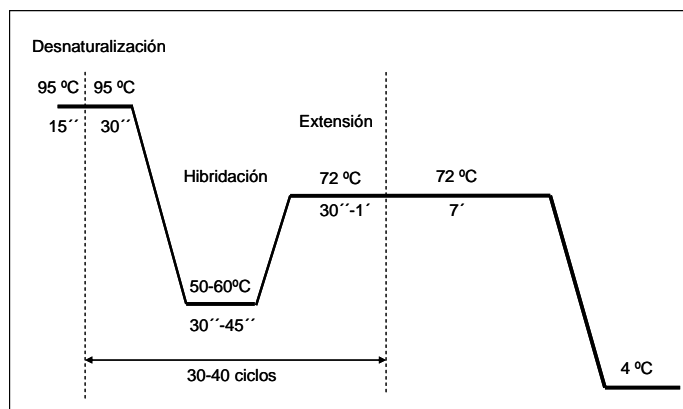
**Tabla 7.- Oligonucleótidos diseñados.**

#### 4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, o indirecta, a partir de RNA, se realiza mediante esta técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el diseño de oligonucleótidos específicos.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando tampón 1X de PCR, 0.4 mM de mezcla de dNTPs (dCTP, dTTP, dATP y dGTP), 0.4  $\mu$ M de oligonucleótidos (“Forward” y “Reverse”),  $MgCl_2$  2 mM, 1 U de Taq polimerasa (Eco Taq Plus de Ecogen) y como molde DNA, gDNA o cDNA obtenido por retrotranscripción, en un volumen final de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de PCR programadas en el termociclador (Genamp PCR System 2400, Perkin-Elmer) dependen de cada experimento (Fig. 13). La temperatura de hibridación se fijó entre 5 y 10°C por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores utilizados para cada experimento. El tiempo de hibridación utilizado fue entre medio y un minuto y la extensión en la reacción de PCR se fijó en función del tamaño del fragmento de DNA a amplificar. El número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento, soliendo ser entre 30 y 40 ciclos.



*Figura 13.- Esquema general de PCR.*

#### 4.7.- PCR sobre colonia

Tras la transformación con una mezcla de ligación y obtención de las colonias en placa, se puede determinar cuáles son clones positivos conteniendo el inserto dentro del vector, realizando directamente una PCR. El realizar amplificación por PCR sobre colonias potencialmente positivas nos permite

ahorrar tiempo al no tener que recurrir a una minipreparación de cada una de las colonias a estudiar.

La amplificación sobre colonias de *E. coli* se realizó directamente añadiendo la colonia sobre el tubo de PCR con todos los componentes, tras haber realizado una réplica en placa nueva para poder conservar e identificar la colonia. Para eliminar los restos celulares y la agarosa que pueden interferir en la función de la Taq polimerasa, una suspensión bacteriana de 5  $\mu$ L se hirvió a 100°C durante 5 min. y se centrifugó 3 min. en centrífuga de mesa refrigerada. Se utilizó 1  $\mu$ L del sobrenadante resultante como molde de la reacción de PCR.

#### **4.8.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Las moléculas de DNA con tamaño comprendido entre 200 pb y 50 Kb se separaron en geles de agarosa de diversa concentración, sometidos a electroforesis horizontal en un campo eléctrico de dirección constante.

Los geles se prepararon en tampón TAE al que se le disolvió la cantidad adecuada de agarosa en función de la concentración deseada (del 1 al 2% de agarosa), dependiendo del fragmento o fragmentos a separar. Posteriormente, se calentó la mezcla hasta ebullición y se vertió en el molde, dejándose solidificar con el peine adecuado para la formación de los pocillos de carga.

Las muestras de DNA, así como el marcador de peso molecular, se mezclaron con tampón de carga (glicerol 30% v/v y azul bromofenol-xileno cianol 0.25% p/v) y se adicionaron a los pocillos del gel. La electroforesis se realizó en cubeta horizontal con TAE a 80-100 V durante 30 min. El DNA se tiñó bañando el gel en solución de Bromuro de etidio durante 5 min. o conteniendo el gel fundido GoldView Nucleic Acid Stain al 0.005% (v/v) y, finalmente, las bandas se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta. El marcador de peso molecular empleado en electroforesis de DNA en geles de agarosa fue el “DNA Molecular Weight Marker X” suministrado por Roche.

#### **4.9.- Purificación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de gel de agarosa que contenían el DNA de interés se cortaron sobre transiluminador, procediendo a la extracción del DNA de estos fragmentos mediante la utilización de kits comerciales siguiendo las

instrucciones del fabricante: “Concert Rapid Gel Extraction System” suministrado por la casa comercial Gibco BRL, y “Real Clean Spin Kit” suministrado por la casa comercial Real, Durviz.

#### 4.10.- Mutagénesis dirigida

Las mutaciones puntuales se realizaron mediante técnicas de PCR solapante con oligonucleótidos específicos que portan la mutación que posteriormente produce el cambio aminoacídico deseado. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización del cDNA, de 3 min. a 94°C, seguida de 35 ciclos que contienen una fase de desnaturalización a 94°C durante 30 s, seguida de una fase de hibridación de 30 s a 60°C y una fase final de extensión de 30 s a 72°C. Primeramente, para cada mutante se hicieron dos PCR de forma independiente tomando cDNA como molde que amplifica el gen desde cada extremo hasta el triplete de bases que codifican al aminoácido a cambiar (Fig. 14) y, seguidamente, se realizó una tercera PCR usando como molde la mezcla de ambos productos obtenidos. El producto final se clonó para su secuenciación.

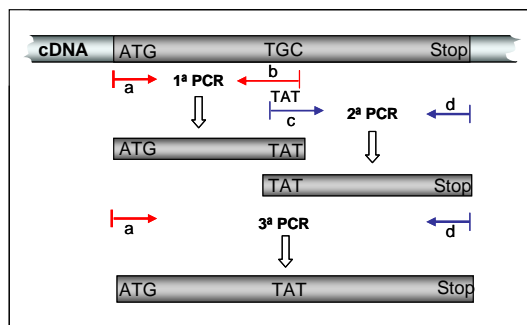


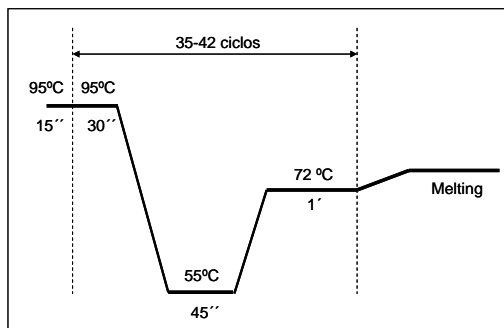
Figura 14.- Esquema general de mutagénesis dirigida.

#### 4.11.- Secuenciación de DNA

La secuenciación se ha realizado en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC, Granada) con la utilización de un secuenciador automático ABI 373, que permite un rápido análisis de las moléculas de DNA de hebra simple generadas en una reacción de polimerización en las que se añaden terminadores de cadena marcados con fluorescencia (“ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit”, Perkin Elmer), según el método de Sanger modificado. Las reacciones se realizaron utilizando Amplitaq FS. Para el estudio de las secuencias nucleotídicas, se utilizó el programa Chromas 1.45.

#### 4.12.- RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) fue puesta a punto mediante reacciones convencionales de PCR para comprobar los productos amplificados específicos a partir del cDNA obtenido de material vegetal con los oligonucleótidos diseñados, utilizando como control el gen constitutivo de la actina de *Pisum sativum*. En el Servicio de Instrumentación la Universidad de Murcia se realizaron las qRT-PCR de placas por triplicado, mediante el equipo de Applied Biosystems y software “Fast Real-Time PCR System”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se obtuvieron las curvas de disociación para corroborar la especificidad de los productos amplificados, así como los datos de la curva de amplificación a estudiar por la señal de fluorescencia de la sonda SYBR Green a lo largo de los ciclos (Fig. 15).



**Figura 15.- Esquema general de qRT-PCR.**

La expresión relativa del gen se calcula mediante el uso de la fórmula  $2^{[\Delta Ct(\text{Control}) - \Delta Ct(\text{Muestra})]}$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{muestra}}$  y Ct (Ciclo umbral) es el ciclo en el que la fluorescencia de la muestra excede el valor elegido sobre un umbral, es decir, el ciclo en el cual el sistema comienza a detectar el incremento de la señal asociada con un aumento exponencial del producto de PCR durante la fase lineal logarítmica. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y para cada ensayo de PCR se obtuvieron las curvas de Melting de los productos de amplificación con el fin de identificar las posibles amplificaciones inespecíficas.

Para los estudios de RT-PCR semicuantitativa, el RNA fue sometido a un pretratamiento para eliminar las impurezas de DNA con DNAasa I (Qiagen). A 5  $\mu\text{g}$  de RNA se le adicionó 1  $\mu\text{L}$  de DNAasa I y la solución se incubó 25 min. a temperatura ambiente. A continuación se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de



EDTA 25 mM y se incubó 20 min. a 70°C. Finalmente la solución se enfrió durante 5 min. en nitrógeno líquido. Una vez eliminadas las impurezas del RNA se procedió a la síntesis de cDNA con el uso de una transcriptasa inversa convencional durante 30 min a 37°C.

El número de ciclos mínimo de PCR al que se detectaban concomitantemente tanto la actina (gen constitutivo) como los genes de estudio fue de 30. Para poder comparar las muestras entre sí, se hicieron distintas diluciones de las mismas a fin de tener en todas la misma cantidad de cDNA de partida. Dicha estandarización se verificó por detección en todas las muestras de los mismos niveles de transcrito de actina tras realizar la reacción de PCR con 30 ciclos. Una vez estandarizada la actina y conocidas las diluciones pertinentes del cDNA a tomar se realizaron las PCR de forma paralela.

#### **4.13.- Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5'-RACE)**

El procedimiento conocido como RACE es una técnica, basada en el método descrito por Frohman (1993), que permite la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de mRNA entre un sitio definido interno y secuencias desconocidas en el extremo 3' o 5'.

El 5'-RACE se puede dividir en dos fases: la obtención previa de un cDNA que contenga una cola de un polinucleótido en el extremo 3' (cola de poliA) y un segundo paso en el que se llevan a cabo dos reacciones de PCR. Para la obtención del cDNA, se retrotranscribió mRNA de hojas jóvenes de guisante usando Superscript II retrotranscriptasa (Invitrogen). Con 20 µL de la mezcla de cDNA/mRNA obtenida, se llevó el volumen hasta 100 µL con agua estéril, se trató con 1 UE de RNasa H (Amersham Biosciences) para degradar el mRNA y dejar sólo el cDNA y se incubó durante 30 min. a 37°C. El cDNA de cadena sencilla se purificó con el kit “*Concert Rapid Purification System*” y se resuspendió eluyendo en 43 µL de agua. Para añadirle al cDNA la cola de poliA en el extremo 3', se tomaron 34 µL del cDNA purificado y se le añadió 10 µL de tampón 5X, 4 µL de dATP 2.5 mM y 1 µL de agua. La mezcla se incubó 3 min. a 94°C, se enfrió en hielo y se le añadió 15 U de la enzima transferasa de desoxinucleótidos terminal (TdT) (*Amersham Biosciences*). Se incubó 30 min. a 37°C y se inactivó la enzima incubando 10 min. a 70°C. El cDNA así tratado, que contiene una cola de poliA en el extremo 3', se guardó a -20°C hasta su uso.

El cDNA anteriormente obtenido se utilizó como molde para una primera reacción de PCR en la que los oligonucleótidos empleados fueron Srx-

R y el RACE-T. Este último contiene una secuencia de poli-T más una secuencia adaptadora en el extremo 5'. El producto de esta PCR se utilizó como molde para una segunda reacción de PCR en la que como oligonucleótidos se utilizaron PsSrxC-R y el RACE que es un cebador de secuencia reversa y complementaria a la secuencia adaptadora. Las dos reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización del cDNA, de 3 min. a 94°C, seguida de 30 ciclos que contenían una fase de desnaturalización a 94°C 30 s, seguida de una fase de hibridación a 55°C otros 30 s y una fase final de extensión de 30 s a 72°C.

El producto final obtenido se introdujo en un vector de clonación para la secuenciación del extremo 5' del gen que codifica la Srx en *Pisum sativum*.

## **5.- Proteómica**

### **5.1.- Determinación del contenido proteico**

La concentración proteica de las diferentes muestras se determinó siguiendo el método colorimétrico de Bradford (1976), el cual se basa en la observación del cambio en el máximo de absorbancia, a 595 nm, de una solución ácida del azul Coomassie R-250, al unirse a proteínas. Se cuantifica la unión del azul Coomassie a la proteína problema, y se compara esta unión con la de cantidades diferentes de una proteína de referencia. La solución de Azul Coomassie R-250 en ácido fosfórico y metanol es suministrado por BioRad, y la proteína de referencia utilizada fue la albúmina sérica bovina (BSA) preparada en stock a una concentración de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La técnica utilizada en ocasiones fue su variante micro-Bradford, que permite un menor volumen de muestra y reactivo, y una lectura de la absorbancia automatizada en multiplaca de 96 pocillos. La medida espectrofotométrica se realizó a 595 nm tras incubar la muestra con la solución de Bradford diluida en agua MilliQ. Los resultados obtenidos se interpolaron en una curva patrón utilizando como estándar concentraciones de BSA de 0 a 5  $\text{mg mL}^{-1}$ .

La determinación de la concentración de proteínas recombinantes purificadas se realizó mediante la medida en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, que efectúa las determinaciones a una  $\lambda$  de 280 nm y permite la corrección de la concentración, en relación con una proteína estándar, introduciendo el coeficiente de extinción teórico calculado para la proteína en cuestión.

## 5.2.- Expresión de proteínas en *E. coli*

Para la sobre-expresión de proteínas recombinantes, la secuencia codificante de las proteínas maduras se clonaron en un vector de expresión, a continuación de la secuencia promotora de la enzima T7-RNA, para su inducción por medio del gen regulador *lac* en la cepa de expresión de *E. coli* que contiene copias del gen que codifica a este enzima. Para ello, la transformación de BL21 por choque térmico se sembró en placas de LB agar con el antibiótico de selección adecuado, dejándose en estufa a 37°C durante 18 h. Obtenidas las colonias, se preparó un preinóculo con 5 mL de LB estéril y antibiótico de selección, creciendo en “shaker” (agitador orbitario) a 37°C durante 24 h.

Unos mililitros del preinóculo crecido se inocularon en 1 L de LB líquido autoclavado en Erlenmeyer de 2 L. El cultivo se incubó en Shaker a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0.6, momento en el que se indujo la expresión con IPTG (“isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside”) 0.5-1 mM. Una vez inducido, el cultivo se dejó crecer a 37°C en agitación durante 6 horas, sacando alícuotas de 1 mL para seguir el crecimiento. Finalmente, para detener el crecimiento, el cultivo se incubó durante 10 min. a 4°C.

Una vez realizada la sobreexpresión proteica, el medio de cultivo se repartió en tubos de centrifuga de 250 mL, se centrifugó a 8000 xg durante 10 min. a 4°C y el sedimento bacteriano se resuspendió en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) con 0.4 mM de DTT con posterior centrifugación durante 10 min. a 8000 xg a 4°C. El sedimento se almacenó a -20°C hasta su utilización. La resuspensión del sedimento se realizó en el mismo tampón y se procedió a la lisis bacteriana mediante la prensa French, proceso de presión inducida uniforme que rompe las bacterias a 1000 Psi, realizándose 2-3 pases de cada muestra. Seguidamente, se centrifugó en centrífuga de sobremesa refrigerada a 4°C, para separar las proteínas solubles (sobrenadante) de la fracción membranosa y cuerpos de inclusión (sedimento). Se recogió una alícuota del sobrenadante y sedimento solubilizado con tampón, para su análisis electroforético en gel de acrilamida (SDS-PAGE).

En nuestro laboratorio se han clonado, expresado y purificado, además de la Srx de guisante y *A. thaliana*, otras proteínas de interés que forman parte del sistema antioxidante Srx-Prx-Trx. Entre ellas, se han obtenido la Prx cloroplastídica de 2 cisteínas de guisante (Ps-2-Cys Prx) y de *A. thaliana* (At-2-Cys Prx) tal y como describen Bernier-Villamor *et al.* (2004) y Barranco-Medina *et al.* (2008) respectivamente.

### 5.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida

#### 5.3.1.- Monodimensional

La separación de las proteínas solubilizadas se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) utilizando un equipo de electroforesis (Mini Protean System II y Mini Protean Tetra system de Bio-Rad) para geles de 8 x 7 cm y 0.75 ó 1 mm de espesor. Los geles utilizados se prepararon a una concentración de 12.5% ó 15% de acrilamida en la parte separadora, y del 6% de acrilamida en la zona de gel concentrador. Para la preparación de dichos geles, se utilizaron los reactivos en las proporciones indicadas en la tabla 8.

	Gel separador		Gel concentrador
	12.5%	15%	6%
<b>Acrilamida 30%</b>			
<b>Bisacrilamida 0.8%</b>			
<b>Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)</b>	4 mL	5 mL	0.6 mL
<b>Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)</b>	2.5 mL	2.5 mL	-
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	-	-	0.75 mL
<b>SDS 10%</b>	3.35 mL	2.35 mL	1.62 mL
<b>Persulfato amónico 10%</b>	100 µL	100 µL	30 µL
<b>TEMED</b>	50 µL	50 µL	15 µL
	5 µL	5 µL	3.6 µL

**Tabla 8.- Concentraciones y proporciones para mini-geles de poliacrilamida.**

Para la preparación de las muestras se tomó la cantidad adecuada de proteína y se mezcló con un volumen de tampón de carga de electroforesis 5X, compuesto por Tris-HCl 0.25 mM (pH 6.8), glicerol 20% (v/v), SDS 5% (p/v), azul de bromofenol 0.4% (p/v) y, en condiciones reductoras, DTT 20 mM. Las muestras preparadas se calentaron durante 10 min. a 100°C en un termobloque y se cargaron en los geles colocados en la cubeta conteniendo tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, Glicina 192 mM y SDS 0.1% p/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 150-180 V durante el tiempo necesario (aproximadamente entre 60-100 min.).

Los marcadores de peso molecular de proteínas utilizados como estándar en la electroforesis en geles de acrilamida, fueron “LMW Calibration Kit for SDS electrophoresis” (14-94 kDa), suministrado por Amersham

Bioscience, “Prestained SDS-PAGE Standars Broad Range” (7-200 kDa) y “Kaleidoscope Prestained Standards” (7-190 kDa), suministrados por Bio-Rad.

### 5.3.2.- Bidimensional

La electroforesis bidimensional consiste en una separación secuencial de los polipéptidos, primero según su punto isoeléctrico (pI) mediante un isoelectroenfoque (IEF) y posteriormente por su masa molecular mediante una electroforesis en gel (SDS-PAGE). Después de una fase previa de preparación de la muestra se desarrolla una primera dimensión (IEF) en gel con gradiente de pH inmovilizado seguida de una segunda dimensión en gel (SDS-PAGE).

Las muestras se concentraron mediante vacío en centrífuga termostatazada (“Speed Vac”). Se resuspendieron en el volumen adecuado para cada gel de IEF con tampón de solubilización “ReadyPrep Sequential Extraction 3” de Bio-Rad compuesto por Tris-HCl 40 mM (pH 6.8), urea 5 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), SB 3-10 2% (p/v) y Bio-Lyte 0.2%. Las proteínas se solubilizaron con ligera agitación a temperatura ambiente durante 2-8 h y se añadió tributil-fosfina (TBP) al 1% (v/v) en caso de ser en condiciones reductoras y una pequeña cantidad de azul de bromofenol, y las muestras se centrifugaron a 16000 xg durante 10 min. a 25°C.

Para realizar la primera dimensión (IEF), se emplearon geles IPG de Bio-Rad de 7 u 11 cm de longitud con diferente gradiente de pH, que se rehidrataron de forma activa en la bandeja de IEF a 5 V y 20°C durante 8-14 h. A fin de proteger la muestra y evitar su evaporación, la tira se cubrió con un aceite mineral que no interfiere en el proceso. Previo al enfoque, se colocaron pequeños trozos de papel Whatman con agua entre el electrodo y la tira, en ambos extremos de la misma. El IEF se llevó a cabo en un aparato Potean IEF Cell (Bio-Rad) con un programa de varias etapas a 20°C:

- 15 min. a 500 V (rampa rápida) a voltaje constante.
- 1-2 h a 2000 V (rampa rápida) a voltaje constante.
- 1 h a 4000 V (rampa rápida) a voltaje constante.
- 8000-10000 V/h a 4000 V (rampa rápida).
- Mantenimiento a 500 V (rampa ascendente) a voltaje constante.

Una vez finalizado el IEF, el gel se incubó 10 min. en tampón de equilibración: Tris-HCl 50 mM (pH 8.8), urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT 2% (p/v) y azul de bromofenol 0.02% (p/v).

Para la segunda dimensión, se prepararon geles SDS-PAGE con una concentración de poliacrilamida del 12.5%, con unas dimensiones de 14x21 cm y 1 mm de grosor. El gel de tira IPG se depositó en la parte superior del gel SDS-PAGE correspondiente, cubriéndose con una fina capa de agarosa al 0.8% en tampón de desarrollo de electroforesis, para facilitar su adhesión e inmovilizarlo. Se creó un pocillo entre el gel de agarosa y el de poliacrilamida a fin de poder cargar un marcador de peso molecular. Para el desarrollo electroforético se utilizó el equipo Protean de Bio-Rad a un voltaje de 200 V durante 8 horas a 4°C.

#### **5.4.- Tinción y secado de geles de poliacrilamida**

Después de la electroforesis las proteínas se visualizan por tinción con Azul Coomassie o por tinción de plata, según la cantidad de proteína que hubiera o la calidad de pureza que se quisiera observar.

##### **5.4.1.- Tinción de plata**

Es un método de tinción de proteínas sensible, realizado según una modificación del procedimiento descrito por Blum *et al.* (1987), que permite detectar concentraciones de proteína entre 10-100 ng. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Fijación: El gel se sumerge durante 30 min. con agitación en una solución de metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) y formaldehído 0.05% (v/v). Es conveniente, en esta etapa, proteger el gel de la luz.
- Lavados: Dos lavados, cada uno de ellos de 10 min., con etanol 50% (v/v).
- Pretratamiento: Durante 1 min., con una solución de tiosulfato sódico 0.8 mM.
- Lavados: Tres lavados de 20 s con agua destilada.
- Impregnación con plata: Se mantiene el gel durante 10 min. en una solución de nitrato de plata 0.2% (p/v) y formaldehído 0.075% (v/v).
- Lavados: Dos nuevos lavados de 20 s con agua destilada.
- Revelado: Se añade una solución de revelado, constituida por carbonato sódico 6% (p/v), formaldehído 0.05% (v/v) y tiosulfato sódico 16 µM. En el momento en que aparecen las bandas de proteínas, se lava el gel con agua destilada.
- Parada: Adición inmediata de una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 12% (v/v), durante un tiempo mínimo de 5 min.

Este protocolo puede variar para modificar su sensibilidad y dependiendo de si las bandas van a ser destinadas para secuenciación de proteínas.

#### **5.4.2.- Tinción con Azul Coomassie**

Es un método más sencillo y específico, que consta de los siguientes pasos:

- Tinción: sumergir el gel en una solución filtrada de Azul Coomassie G-250 0.1%, metanol 50% y ácido acético 10% (en agua milli-Q) durante 1 h.
- Destinción: retirar el tinte y proceder a la destinción del gel en una solución de metanol al 45% y ácido acético 15%, que debe ser cambiada con frecuencia.

#### **5.4.3.- Secado de geles de poliacrilamida**

Tras la tinción de los geles, éstos se secaron entre dos papeles de celofán para su conservación. Se lavaron con agua y se sumergieron en una solución de glicerol al 3% (v/v) y metanol al 30% (v/v), durante 30 min., con agitación constante. Al cabo de ese tiempo, se colocaron sobre un papel de celofán, empapado en ácido acético al 3% (v/v), que a su vez va sobre una bastidor y un marco de metacrilato. Encima de los geles se colocó un segundo celofán, empapado de igual modo, con la precaución de no dejar ninguna burbuja de aire. Por último, se colocó el segundo marco de metacrilato, y ambos marcos se sujetaron con unas pinzas. El sistema se dejó secar al aire durante 2-3 días.

Una variedad rápida (45 min.-1 h) para el secado de los geles de poliacrilamida, consistió en la utilización de la “Gel Dryer Solution” 1X y el sistema “GelAir Dryer” de Bio-Rad.

#### **5.5.- Purificación de proteínas recombinantes**

El proceso de purificación de las proteínas recombinantes expresadas se llevó a cabo utilizando un sistema FPLC de Amersham Biosciences en el que se integraron distintas columnas cromatográficas. El equipo se encuentra provisto de un detector óptico a 280 nm que permite un registro cromatográfico. Además, el proceso de purificación se controló mediante

análisis electroforético y cuantificación de proteínas de las fracciones obtenidas.

### 5.5.1.- Cromatografía de afinidad

Para la purificación de proteínas recombinantes diseñadas con una cola de Histidinas (His-tag) en su extremo amino, se utilizó el sistema de purificación en columna de “Ni-Sepharose”. El vector de expresión se diseñó con una secuencia que codifica 6xHis en el extremo amino de la proteína madura, con objeto de facilitar su purificación mediante un primer paso cromatográfico de afinidad con una columna de “Ni-Sepharose”. La cola de His de la proteína recombinante puede ser eliminada haciendo pasar por la columna una Proteasa AcTEV (Invitrogen) en el momento en el que la proteína está fijada a la columna, produciendo su elución por corte, o incubándola en solución una vez purificada. Se utilizaron las columnas “HisTrap FF crude” de 1 mL o columnas de mayor volumen realizadas con la “Ni-Sepharose High Performance”, suministradas por la casa comercial GE Healthcare.

El protocolo seguido consiste en una primera etapa de preparación de la columna, a la que se le hace pasar los siguientes volúmenes de reactivos:

- 10 vol. de agua destilada.
- 2 vol. de AcNH<sub>4</sub> 100 mM (pH 4.0).
- 2 vol. de NiCl<sub>2</sub> 10 mM + AcNH<sub>4</sub> 100 mM (pH 4.0), manteniendo 5 min. en oscuridad.
- 2 vol. de AcNH<sub>4</sub> 100 mM (pH 4.0).
- 5 vol. de tampón A: Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), imidazol 20 mM, NaCl 200-500 mM, EDTA 1 mM.

A continuación la muestra, en tampón Tris-HCl 20-50 mM (pH 7.5), conteniendo DNAasa (1 mg en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 mM) e imidazol 20-40 mM, se inyectó en la columna. Después se realizó un lavado con 5 volúmenes de tampón A y otros 5 volúmenes de tampón A con glicerol al 50% (opcional). La elución se realizó con 5 volúmenes de tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, imidazol 500 mM, NaCl 200-500 mM y opcionalmente glicerol al 50%), recogiendo en fracciones el eluido. Finalmente, se lavó la columna haciendo pasar 2 volúmenes de EDTA 100 mM, seguidos de 6 volúmenes de agua destilada y 2 volúmenes de Etanol al 20% en el que la columna se mantiene a 4°C.



Las fracciones que contenían la proteína de interés se reunieron y dializaron frente a tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7.5) en tripa de diálisis Spectra/Por de la casa comercial Spectrum.

### **5.5.2.- Cromatografía de intercambio iónico**

Se utilizó la columna MonoQ 5/50 (GE Healthcare) en el sistema FPLC, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este pase cromatográfico se realizó como segunda fase en el proceso de purificación de proteínas recombinantes con objeto de mejorar su grado de pureza.

La columna se equilibró con tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7.5). La muestra, dializada en el mismo tampón, se inyectó en la columna a un flujo de 0.5 mL min.<sup>-1</sup>. Una vez lavada con el mismo tampón se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. La proteína eluida se recogió en fracciones de 0.2-0.5 mL. Todas las soluciones fueron previamente filtradas a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm (Millipore).

### **5.5.3.- Cromatografía de filtración en gel**

La columna de filtración en gel utilizada para separación cromatográfica por tamaño y forma molecular, fue la Sephacryl S-200 (GE Healthcare), que se equilibró con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, a un flujo de 1 mL min.<sup>-1</sup>.

Para la calibración de la columna se utilizaron patrones de proteínas de masa molecular y radio de Stokes conocidos suministrados por Amersham Bioscience (HMW y LMW Gel Filtration Calibration Kit).

## **5.6.- Secuenciación y análisis por espectrometría de masas**

La identificación de proteínas de interés desconocidas, así como el análisis del estado de oxidación de las proteínas tratadas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas en el laboratorio del Servicio de Proteómica de la Universidad de Córdoba. Las muestras se prepararon recortando la banda o spot a analizar tras su separación electroforética y tinción con plata mediante un protocolo modificado.

### 5.7.- Sobreoxidación de Prxs y tratamiento con AMS

El tratamiento de sobreoxidación de las Prxs consiste en incubar estas enzimas, previamente reducidas, con elevados niveles de peróxido de hidrógeno para la obtención de la forma inactiva sulfinica (Prx-SO<sub>2</sub>H).

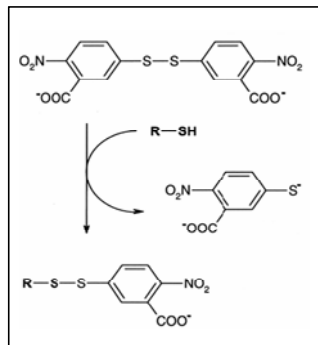
Las formas sulfinicas de las Prxs se generaron en Tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) con una primera incubación con DTT 10 mM durante 30 min. a 37°C, seguida de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta 2 mM e incubación de la mezcla durante otros 30 min. a 37°C. El exceso de DTT y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se eliminó mediante diálisis en columna PD-10 (GE Healthcare, Upssala, Suecia) equilibrada con Tris-HCl 25 mM (pH 7.5).

La sobreoxidación de las Prxs se confirmó determinando la pérdida de la actividad peroxidasa o mediante el tratamiento con ácido 4-acetamido-4'-maleimidilstilbeno-2,2'-disulfónico (AMS) (Biteau *et al.*, 2003) que proporciona un incremento de 500 Da en el tamaño de la proteína al unirse a los grupos -SH y que es apreciable mediante su estudio electroforético y análisis por Western blot con anticuerpos frente a las diferentes Prxs. La obtención de la forma sulfinica de la 2-Cys Prx se confirmó, además, mediante análisis por Western blot con anticuerpo específico (Woo *et al.*, 2003b).

El tratamiento con AMS se llevó a cabo con 10 µg de Prx sobreoxidada o reducida, que se precipitó con ácido tricloroacético al 10% y se centrifugó durante 15 min. a 16000 xg a 4°C. El sedimento se resuspendió con 20 µL de acetona fría y se volvió a centrifugar 5 min. a 16000 xg a 4°C. Finalmente el sedimento se secó por evaporación y se resuspendió con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), AMS 10 mM, EDTA 10 mM, SDS 1% (p/v), incubándose en oscuridad de 2 a 18 h.

### 5.8.- Determinación de grupos tiol

La determinación de los grupos sulfidrilo (-SH) de proteínas se realizó a fin de saber si los grupos tiol se encontraban expuestos al medio. Para ello se utilizó la reacción de Ellman (1959). El DTNB reacciona con los grupos -SH y se libera el TNB, que absorbe a 412 nm a una concentración molar igual a la de los grupos -SH que reaccionan (Fig. 12).



**Figura 12.- Reacción del DTNB con los grupos SH libres.**

Se incubó la proteína recombinante purificada (Srx y mutantes) a una concentración de 60  $\mu\text{M}$  con DTNB 2 mM en tampón fosfato 100 mM (pH 7.0). Para la determinación de los grupos -SH totales (expuestos y no expuestos), se adicionó SDS al 2% (p/v) para desnaturalizar la proteína. Seguidamente, se midió la absorbancia de la mezcla a 412 nm y el contenido total de grupos tiol libres se calculó asumiendo un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) del TNB de  $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $13.750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para la mezcla con SDS al 2%.

### 5.9.- Determinación del potencial redox

Para la determinación del potencial redox de las proteínas se usó el método fluorimétrico descrito por Hirasawa *et al.* (1999).

Para ello, se prepararon 18 tubos a los que se agregaron cantidades crecientes de DTT reducido (0 a 100 mM) sobre concentraciones decrecientes de DTT oxidado disuelto en etanol (100 a 0 mM). Se añadió a cada vial 100  $\mu\text{g}$  de proteína (200  $\mu\text{L}$ ) y 100  $\mu\text{L}$  de MOPS 500 mM y se incubó la mezcla 3 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se adicionó 22  $\mu\text{L}$  de monobromobimane (MBB) 250 mM en acetonitrilo y se incubó 30 min. en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v), se incubó 30 min. en baño de hielo y se centrifugó a 15000  $\times g$  15 min. a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de TCA al 1%. Se incubó 10 min. en baño de hielo y se centrifugó durante 15 min. para eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 500  $\mu\text{L}$  de TCA al 1%. Se incubó 10 min. en baño hielo y se volvió a centrifugar 15 min. El sedimento se secó durante 5 min. manteniendo los viales invertidos y se resuspendió en 1 mL de Tris-HCl 100 mM (pH 8.0), SDS 1%, incubándose durante 30 min. Finalmente, se midió en espectrofluorímetro la excitación y absorción a 380 y 450 nm respectivamente.

## 6.- Técnicas inmunológicas

### 6.1.- Obtención de anticuerpos policlonales

Se han empleado anticuerpos policlonales frente a la Srx, diferentes Prxs y Trx, de guisante y/o *A. thaliana* (Tabla 9). Han sido producidos en conejo mediante 2 inyecciones intramusculares de una región peptídica antigénica diseñada para el caso del anticuerpo de la Srx, o mediante inyección de la proteína recombinante purificada y homogeneizada con adyuvante. Antes de inmunizar al conejo se obtuvo el suero preinmune control. El sangrado se realizó por punción cardíaca y una vez obtenido el suero se determinó la titulación del anticuerpo mediante ELISA. Todos los anticuerpos se guardaron a -20°C para su uso a la dilución adecuada.

Anticuerpo	Diseñado frente	Producido en	Referencia	Dilución WB
Srx	Péptido de Srx de <i>A. thaliana</i> /guisante (CHRYEAHQKGLPTI)	Abyntek (Vizcaya, España)	Iglesias-Baena <i>et al.</i> , 2010	1:1500 en PBSA
His <sub>6</sub> -Peroxidase	6xHis-tag (Monoclonal conjugado)	Sigma (USA)		1:2000 en PBSTA
2-Cys Prx	Proteína madura de guisante	Granada (España)	Bernier-Villamor <i>et al.</i> , 2004	1:5000 en PBST
Prx-SO <sub>2</sub> H	Péptido sobreoxidado de Prxs (DFTFVCPTEI)	LabFrontier (Seoul, Korea)	Woo <i>et al.</i> , 2003b	1:2000 en PBST con leche 5%
PsPrxII F	Proteína madura de guisante	Granada (España)	Barranco-Medina <i>et al.</i> , 2007	1:3000 en PBSTA
Trxo	Péptido de Trxo de guisante (ARLNHITEKLFKKD)	Sigma-Genosys	Martí <i>et al.</i> , 2009	1:5000 en PBSTA
FBPasa	Proteína madura de <i>A. thaliana</i>	Sigma-Aldrich		1:3000 en PBST
Prx IIC	Proteína madura de guisante	Granada (España)		1:3000 en PBSTA
AtPrx IIF	Proteína madura de <i>A. thaliana</i>	Bielefeld (Alemania)		1:3000 en PBSTA
Prx Q	Proteína madura de <i>A. thaliana</i>	Bielefeld (Alemania)		1:3000 en PBSTA
Prx IIE	Proteína madura de <i>A. thaliana</i>	Bielefeld (Alemania)		1:3000 en PBSTA
Glutation	GSH/GSSG (Monoclonal de ratón)	Virogen (USA)	Findlay <i>et al.</i> , 2006	1:1000 en PBSTA
Sty1-P	Anti-phospho p38	Cell Signaling Technology (USA)	Vivancos <i>et al.</i> , 2005	1:1000 en PBSTA

Tabla 9.- Anticuerpos primarios.

## 6.2.- Western blot

El ensayo de Western blot se empleó para detectar y cuantificar la cantidad de una proteína presente en una muestra. Para ello, las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience, Germany) utilizando el sistema de transferencia húmedo Miniprotean System II (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM y Metanol al 20% v/v) durante 1 h, utilizando una corriente constante de 350 mA. La detección de las proteínas en la membrana se realizó mediante el reconocimiento específico de un anticuerpo primario (Tabla 9) frente a la proteína a estudiar. Este es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva acoplado un sistema enzimático para su detección.

Las soluciones utilizadas fueron:

- PBS:  $\text{H}_2\text{KPO}_4$ - $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM.
- PBST: PBS con Tween 20 al 0.05% (v/v).
- PBSA: PBS con Albúmina sérica bovina 0.1% (p/v).
- PBSTA: PBS con Tween 20 al 0.05% (v/v) y Albúmina sérica bovina 0.1% (p/v).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se procedió al bloqueo de la misma durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBST) en agitación. Tras este período de incubación, se añadió el anticuerpo primario (Tabla 8) y se incubó durante la noche a 4°C en agitación suave.

A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min. de la membrana con PBST y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG frente a conejo conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido 1:2000 en PBSTA, o conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:2500 en PBSA, incubándose durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo la membrana 3 veces en PBST durante 10 min. Por último, se llevó a cabo la detección utilizando el kit de detección “Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus” (Perkin-Elmer, Boston, USA) basado en una reacción de quimioluminiscencia y su toma de imagen mediante revelado por fotografía digital con el programa QuantityOne de Bio-Rad, para el secundario conjugado con peroxidasa, o mediante la detección en membrana con la solución NBT/BCIP (Roche, Mannheim, Germany), para el secundario conjugado con fosfatasa alcalina

(AssaysDesings, StressGen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial en cada caso.

### **6.3.- ELISA**

Se llevó a cabo según Hermoso *et al.* (1987) en placas microtiter de 96 pocillos de fondo plano (Dinatech Laboratories). Se utilizó la técnica no competitiva para la determinación del título de anticuerpos del suero y para la identificación de proteínas en fracciones de FPLC.

El protocolo seguido para la realización de ELISA consiste en una primera etapa de fijación del antígeno (proteína) sobre los pocillos, depositando en cada uno de ellos una solución de 1-2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de antígeno en Tampón de fijación ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  50 mM pH 9.6, azida sódica 0.02% (p/v)) y se incubaba a 37°C durante 3 h o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se realizan 3 lavados de 3 min. con 360  $\mu\text{L}$  de tampón PBST. A continuación, los posibles enlaces inespecíficos se bloquearon agregando a cada pocillo 360  $\mu\text{L}$  de PBSA, dejando la placa a temperatura ambiente durante 30 min. Se elimina el PBSA y se añaden 200  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario a la dilución adecuada o se realizan diluciones seriadas 1:5 para su titulación, en tampón PBSTA. Se incubaba a 37°C durante 1 h. A continuación, se realiza una nueva serie de lavados como los descritos anteriormente y se le añade a cada pocillo 200  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa frente a IgG de conejo (Sigma) diluido 1:10000 con tampón PBSTA, incubando a 37°C durante 1 h. A continuación, se realizan nuevamente lavados de los pocillos y se añaden 200  $\mu\text{L}$  de la solución sustrato (ortofenilén-diamina 0.04% (p/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.04% (v/v) en tampón citrato-fosfato 0.1 M pH 5.0), preparada extemporáneamente, y se incubaba a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente se detiene la reacción por adición de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 N a cada pocillo y se realiza la lectura de D.O. a 492 nm en un lector de placas Titertek Multiscan II Plus.

### **6.4.- Inmunocitoquímica para microscopía electrónica**

Para la localización celular de proteínas vegetales mediante inmunocitoquímica, se realizó la preparación del tejido mediante cortes de secciones de 1 mm de la parte central de hojas jóvenes de guisante crecidas durante 14 días tras 3 h de iluminación. Los cortes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón cacodilato sódico 50 mM (pH 7.4) durante 2 h en vacío, y posteriormente se realizaron tres lavados de 30 min. con tampón

cacodilato sódico 50 mM (pH 7.4) a 4°C. Las muestras se deshidrataron por pasos sucesivos en soluciones crecientes de etanol, entre el 30% y el 100% (v/v), y se realizaron las inclusiones en resina Unicryl. Los cortes ultrafinos se obtuvieron con un ultramicrotomo y se recogieron en rejillas de níquel.

Los ensayos se realizaron por flotación de las rejillas sobre gotas de volumen adecuado de los reactivos sobre papel Parafilm. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Primero se procedió al bloqueo de los posibles sitios de unión inespecíficos con la solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 5% (p/v) en PBS) durante 1 h. Posteriormente, las rejillas se transfirieron a una solución de anticuerpo frente a la Srx, Prx sobreoxidada y PrxII F de guisante a diluidos 1:50, 1:200 y 1:150, respectivamente, en solución de bloqueo, y se incubaron durante 2 h. A continuación, se hicieron 5 lavados de 5 min. de las rejillas con PBS y se incubaron durante 2 h con anti-IgG de conejo marcado con partículas de oro coloidal de 30 nm, diluido 1:200 en solución de bloqueo. A continuación, se realizaron 6 lavados de 3 min. con PBS y 2 lavados con agua bidestilada, durante 3 min. Las rejillas se secaron y las secciones se tiñeron con acetato de uranilo al 0.1% (p/v) durante 20 min. Se lavaron con agua bidestilada, se secaron y, por último, se post-tiñeron con citrato de plomo al 2% (p/v) durante 1 min., lavándose de nuevo con agua bidestilada. Paralelamente, se prepararon controles sustituyendo el anticuerpo primario por IgG preinmune a la misma concentración o sin el anticuerpo primario.

La visualización de los cortes teñidos se realizó en el Microscopio electrónico de barrido de los Servicios Instrumentales de la Universidad de Granada.

## **7.- Ensayos enzimáticos**

### **7.1.- Ensayo de protección del DNA**

La actividad antioxidante de las Prxs y Srx recombinantes de guisante y de sus mutantes se determinaron en un ensayo de protección de DNA frente al daño producido por las especies de oxígeno reactivo generadas como consecuencia de la reducción de Fe (III) por DTT.

Para ello, se incubó una mezcla de preparación extemporánea compuesta por FeCl<sub>3</sub> 3.3 μM, DTT 10 mM, Prxs o Srx o albúmina (20 μM), en Tris-HCl 25 mM (pH 8.0) en un volumen final de 20 μL. La mezcla de

reacción se incubó durante 1 h y tras la adición de 1  $\mu\text{g}$  del vector plasmídico PEYFP (Clontech), se incubó 9 h a 37°C. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción.

## 7.2.- Actividad peroxidasa

El ensayo de actividad peroxidasa dependiente de DTT está basado en la capacidad que tienen las Prxs de utilizar al DTT como donador de electrones y así poder reducir hidroperóxidos (Thurman *et al.*, 1972).

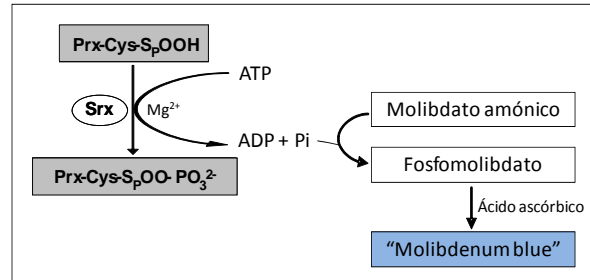
Con el fin de reducir los puentes disulfuros formados entre los residuos de cisteína catalíticos se incubó un volumen de 300  $\mu\text{L}$  que contenía diferentes concentraciones de las Prxs recombinantes en Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), DTT 4 mM. Después de 10 min. de preincubación a 37°C, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$  (de preparación extemporánea) y se incubó nuevamente 10 min. a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 150  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloroacético al 10% (p/v). El precipitado de proteína se eliminó mediante una breve centrifugación a 4°C y se añadió a la mezcla de reacción 200  $\mu\text{L}$  de sulfato ferroso amónico 10 mM (de preparación extemporánea) y 100  $\mu\text{L}$  de tiocianato potásico 2.5 M; éstos reaccionan con el hidroperóxido remanente formando un complejo púrpura. La concentración de peróxido se determinó espectrofotométricamente a 480 nm usando cantidades conocidas de peróxido como estándar.

## 7.3.- Actividad sulfirredoxina

### 7.3.1.- Medida colorimétrica de fosfato inorgánico

La determinación espectrofotométrica de la actividad de la Srx se realizó mediante la cuantificación de fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ) liberado a partir de su actividad ATPasa. Este método, descrito por Chen *et al.* (1956), se basa en la reacción del ortofosfato liberado con el reactivo sulfomolibdico, dando lugar a un fosfomolibdato que es reducido por el ácido ascórbico, desarrollando un color medible espectrofotométricamente con un máximo de absorción a 820 nm (Fig. 17).





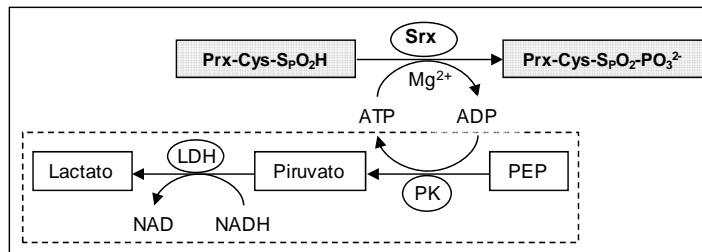
**Figura 17.- Esquema del método colorimétrico de cuantificación de  $P_i$ .**

La mezcla de reacción contenía Prx (sobreoxidada o reducida) y Srx en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5),  $\text{MgCl}_2$  1 mM y diferentes concentraciones de ATP (0.25 ó 1 mM). La reacción se llevó a cabo en ausencia o presencia de agente reductor (DTT, GSH, Trx o Grx), y se incubó a 30°C. A diferentes tiempos de reacción (entre 0 y 120 min.), se sacaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y se le se añadieron 350  $\mu\text{L}$  del reactivo de color (4 volúmenes de molibdato amónico 0.4% (p/v) en ácido sulfúrico 3% (v/v), 2 volúmenes de ácido tricloroacético 10% (p/v) y 1 volumen de ácido L-ascórbico (66.7  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Tras 3 min. exactos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de citrato trisódico 1.3 M (Merck, Alemania) (preparado con no más de 2 meses), para impedir la hidrólisis del ATP en medio ácido (Gawronski y Benson, 2004). Seguidamente, la mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 45 min. y finalmente se midió la absorbancia a 820 nm. Para cada determinación, se realizó una curva estándar de  $P_i$  utilizando dihidrógeno fosfato de potasio de 0 a 100  $\mu\text{M}$ .

### 7.3.2.- Cuantificación espectrofotométrica del ADP

La actividad Srx ha sido también determinada mediante la cuantificación del ADP, generado en la reacción tras la hidrólisis del ATP, acoplado la oxidación del NADH en presencia de fosfoenol piruvato (PEP), piruvato kinasa (PK) y láctico deshidrogenasa (LDH) (Kornberg y Pricer, 1951) (Fig. 18).

De la mezcla de reacción, incubada a 30°C, que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5),  $\text{MgCl}_2$  1 mM, diferentes concentraciones de ATP (0.25 ó 1 mM), Prx (sobreoxidada o reducida) y Srx, se tomaron alícuotas a un determinado tiempo para adicionar a la mezcla de reacción enzimática acoplada, compuesta por Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), KCl 10 mM, NADH 0.4 mM, 10 U de PK y 10 U de LDH, en presencia o ausencia (como cubeta control para blanco) de PEP 2.5 mM y se midió la absorbancia a 340 nm.



**Figura 18.- Esquema del método espectrofotométrico de determinación de ADP.**

### 7.3.3.- Determinación cromatográfica del ADP

La generación de ADP a partir de la hidrólisis enzimática del ATP por parte de la Srx, es analizada por medio de cromatografía en columna Mono Q 5/50 tal y como describe Jönsson *et al.* (2005).

A una columna Mono Q 5/50, equilibrada con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, se le inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción enzimática con Srx y Prx-SO<sub>2</sub>H, a diferentes concentraciones,  $\text{MgCl}_2$  1mM, NaCl 100 mM y ATP 100  $\mu\text{M}$ , previamente incubada durante diferentes tiempos a 37°C. El ADP generado en la reacción y ATP residual se fijan a la columna por interacción iónica. Ambos fueron eluidos con un gradiente lineal de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10-500 mM y un flujo de 1 mL/min., con registro cromatográfico a 254 nm en sistema FPLC, observándose a lo largo del tiempo de reacción, la formación de ADP y el descenso del ATP.

### 7.4.- Actividad chaperona

La actividad chaperona de las proteínas recombinantes purificadas se ha determinado mediante el ensayo de agregación térmica de la Luciferasa American firefly (Roche).

Se preparó una mezcla de reacción con las proteínas recombinantes purificadas a la concentración adecuada (1-2  $\mu\text{M}$ ) en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) con luciferasa 0.30  $\mu\text{M}$ . La agregación térmica se realizó en termobloque a 42°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0-30 min.) para seguir el proceso de agregación en espectrofotómetro con célula

calefactora. Se midió el incremento de absorbancia a 350 nm debido a la agregación de la luciferasa. Se utilizó BSA como control.

## 8.- Microcalorimetría

Los análisis de ITC (“Isothermal titration Calorimetry”) se llevaron a cabo en un microcalorímetro VP-Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) a la temperatura de 25°C. Las proteínas (Srx, Prxs, Trx) fueron dializadas frente a Tris-HCl 25-50 mM (pH 7.5), en presencia o ausencia de DTT 0.1 mM. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante Nanodrop. Todas las soluciones fueron filtradas a través de filtros estériles de 0.22  $\mu\text{m}$  y desgasadas en vacío. Cada titulación consistió en un serie de inyecciones de 1.6  $\mu\text{L}$  de una de las proteínas a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , en una disolución de 1  $\mu\text{M}$  de proteína a interaccionar, que se encontraba en la célula adiabática. Tras un retraso de 60 s, se comenzó con una inyección incompleta de 1  $\mu\text{L}$  (valores ignorados en el análisis), para seguir con series de 1.6  $\mu\text{L}$  cada 3 min. La energía de referencia fue de 10  $\mu\text{cal s}^{-1}$  con giro del inyector a 286 rpm.

Las medias de cambios de calor observado en la inyección de proteína al tampón fueron restadas de las titulaciones. El ajuste de los datos resultantes se hizo utilizando el modelo de “One binding site” de ORIGIN. De este ajuste se obtuvieron directamente los parámetros  $\Delta H$  (cambio de entalpía) y  $K_A$  (constante de asociación,  $K_A=1/K_D$ ). A partir de estos parámetros se calcula los cambios de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y los cambios de entropía ( $\Delta S$ ) utilizando la ecuación:  $\Delta G=-RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S$ , donde R es el constante de gas y T la temperatura absoluta.

## 9.- Programas bioinformáticos y análisis estadístico de datos

Los programas utilizados en ordenadores PC Pentium III y IV fueron Windows 98 y XP, Microsoft, paquete Microsoft Office 2007 (Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft PowerPoint). Para el análisis de imagen se utilizó Quantity One (Bio-Rad). El programa para el estudio las secuencias nucleotídicas fue Chromas Pro 7.0. Los alineamientos entre secuencias se realizaron utilizando el programa ClustalW suministrado por el servidor European Bioinformatics Institute ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)). La predicción de las características físicas se hizo utilizando ProtParam, mientras que para predicción de los dominios transmembrana se utilizó TMpred. Para la predicción del péptido señal y localización subcelular, se utilizaron ChloroP,

MitoProt y PSORT, proporcionados por el servidor ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), y MultiLoc/TargetLoc para estudios de predicción en localización dual. Los programas para la modelización de proteínas fueron Rasmol versión 2.7.1 (Ras Win Molecular Graphics) y Swiss pdb-Viewer versión 3.7 (GlaxoSmithKline R&D y Swiss Institute of Bioinformatics).

Para el análisis de predicción de antigenicidad, se utilizó el modelo de Welling *et al.* (1985) proporcionado por el servidor CLC bio.

Las bases de datos consultadas fueron PubMed, BLAST, dentro de la dirección de Internet [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA 33 dentro de la dirección de Internet [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  SEM. Las diferencias entre las medias se establecieron por un t-test de Student. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SigmaStat 2.

## **RESULTADOS**





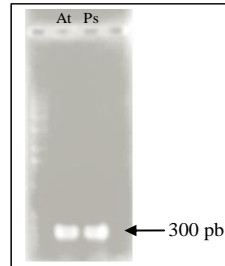
motivos peptídicos de las regiones amino (-NH<sub>2</sub>) y carboxilo (-COOH) altamente conservadas en estas enzimas.

Medicago	-----	
Arabidopsis	-----	
Tomate	-----	
Arroz	ATGGCGCGAGCTCGAGCTTGGATTGGTGAAGACCATGGCGCGCTCCGGTTCCCTCCTC	60
Medicago	-----ATGGCAAATTTGTTTTGCAGGTTCCAAATA-----C	36
Arabidopsis	-----ATGGCGAATTTGATGATGAGATTACCAATTA-----G	36
Tomate	-----ATGGCGAATTTGTTCTGCAACTTCCAAATAACCTGGGTTTA	42
Arroz	CGCTGCCTGGCGGCCACGCGCTCTCCCACTCTGGGAAGGACGGGGGCGGGCGG	120
	* * * * *	
Medicago	AGGAGTTTCACTGTATTGCT--TCATCCAACCTAATGGGGCTTTCTGGTGGTCT	93
Arabidopsis	AGAAGTCTCTGTTTTCAGCTTCTTCATCCAACGGTTCGCCGCCGGTATCGGAGGATC	96
Tomate	AGGAGTTCACGTCTCC-----TCATCTCTCTAATGGGGCTACTCTGGTGTGCT	96
Arroz	GGCGCCTGCGCTTCTCCGCTTCGCTCCCAATGGTGCAGCTGTTCCATCTCCCTAAGT	180
	* * * * *	
Medicago	GGAAGTGGTGGTGGTCCAGTGATCTGGAACCTCCTCTTGATAGATAAAGGGCCCT	153
Arabidopsis	---ACGGCGCTCTAGGACCGATGATTCTGGAATACCCTTGGAGAGATACGAAGCCG	153
Tomate	---CAATC-TGCCGGCCAGTGATTCTGAACTTCCCTTGATAAAATCCGAAGGCCA	150
Arroz	GACTCAGAGAAGAAGGGCCCTGTGGTATGGAATTCCTGACACAAAGATTAGGAGCCA	240
	* * * * *	
Medicago	ATGATGAGGACTAGATCAAATGATCAAAACAAGTTCAAGAACCTATGGACAGTATTAGT	213
Arabidopsis	TTGATGCCAACCAGATCCAACGATCAGAACAAAGTGAAGAGCTTATGGATAGTATCCGT	213
Tomate	CTCATGCTACCAGATCTAATGACCAGCAAAAGTGAAGGAACCTGATGGATAGTATCAAG	210
Arroz	CTGATCGGACCGTGCCCAATGATCCAGCCAAGGTGCAAGAACCTATGGACAGTATCCGT	300
	* * * * *	
Medicago	GAAATGGTCTTCAAGTGCCCTATTGATGTGCTCGAGGTTGATGGAACTATTATGGTTTT	273
Arabidopsis	CAAAATCGGTCTTCAAGTCCGATTGATGTGATTGAAGTTGATGGAACTACTATGGGTTT	273
Tomate	GAAATCGGGCTTCAAGTACCTATTGATGTGCTTGAAGTATAGTGGGTTTATTACGGCTT	270
arroz	GTCAATGGCCTCCAAGTACCTATTGACSTACTGGAGGTTGATGGAGTCTACTATGGTTTT	360
	* * * * *	
Medicago	TCTGGCTGTCACCGGTACGAGGCTCACGAGGACTGGACTCCCACCATACGTTGCAAA	333
Arabidopsis	TCGGGATGTCACAGATACGAGGCGCATCAGAAGCTAGGGCTTCCAACTATACGTTGCAAA	333
Tomate	TCTGGTGTTCATCGCTATGAAGCTCATCAGCAACTGGCCTTCTAACTATACGTTGCAAA	330
Arroz	TCTGGATGTACCCTATGAGGCTCACGAGGCTAGGCTTCCGACTATCCGTTGCAAA	420
	* * * * *	
Medicago	ATACGGCTGGCACAAGAGACTCTAAGGCATCACATGCC---	375
Arabidopsis	ATCCGTAAGGAACAAGGAACATTAAGGCATCATCTCGC---	375
Tomate	ATTCGTGAGGAACAAGAAACTTTGAGGCACCATCTCGA---	372
Arroz	GTCCGTGCGGGACAAAGAAACACTAAGGCACCATATGCGATGA	465
	* * * * *	

**Figura 20.- Alineamiento de bases de las secuencias de Srxs vegetales descritas. Secuencias nucleotídicas que codifican la Srx de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Oryza sativa* (arroz).**

Así, se diseñaron el oligonucleótido AtSrx-F (“forward”), que mantiene la pauta de lectura correcta y contiene la secuencia de restricción para *BamH I*, y el oligonucleótido AtSrx-R (“reverse”), que contiene la secuencia de restricción final para *Nco I* (Tabla 7), con los que se realizó una reacción de PCR con una Taq polimerasa de alta fidelidad (bajo número de mutaciones introducidas) usando como DNA molde el cDNA de hojas jóvenes de *Arabidopsis thaliana* o de *Pisum sativum*. Las bandas obtenidas a unos 300 pb como productos de PCR (Fig. 21), fueron recortadas y purificadas, para su clonación en el vector pGEM-T y su posterior secuenciación.





**Fig. 21.- Electroforesis de AtSrx y PsSrx en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.**

A partir de las secuencias obtenidas de la Srx de *A. thaliana* y guisante, se diseñaron oligonucleótidos homólogos que permitieran obtener el resto de la secuencia. Así, para elucidar el extremo N-terminal de la PsSrx, se utilizaron cebadores internos (Tabla 7) usando como molde cDNA de hojas jóvenes de guisante y, por medio de 5'-RACE, se llegó a obtener una banda de unas 390 pb correspondiente a una secuencia nucleotídica que codifica 129 aminoácidos (Fig. 22).

<p><b>A</b></p> <p><u>atggcggcgagcaactttctgctgcagctgccgctgcccagctttaccgtgattaacctggcgagcgcgagcagcagcaacggttcgcgcccgtgat</u>  cggaggatctagcggcgggttaggaccgatgattgtggaattaccgttgagaagatacgaagaccgttgatcggaaccagatccaacgatcagaaca  aagtgaagagcctatggatagatccgtcaaatcggcttcaagtccgattgatgattgaagttgatggaactactatgggttctcgggatgtcacaga  tacgagcgcgatcagaagctagggtccaactatactgtgcaaatcctgtaaaaggaacaaaggaacattaaggcatcatcttcgctga</p>
<p><b>B</b></p> <p>MAASNFLQLPLRSFTVINVASASSSNGSPVIGGSSGGVGP MIVELPLEKIR RPLMRTRSNDQNK  VKELMDSIRQIGLQVPIDVIEVDGTYYGFSGCHR YEAHQKLGLPTIRCKIRKGTKETLRHHLRStop</p>

**Figura 22.- Secuencias de la sulfirredoxina de guisante (número de acceso GU223224.1). A. Secuencia nucleotídica de PsSrx. B. Secuencia aminoacídica de PsSrx.**

## **2.- Análisis de las secuencias de las Srxs de *A. thaliana* y guisante**

La sulfirredoxina naciente de *Arabidopsis thaliana* (AtSrx) (número de acceso At1g31170) posee un total de 125 aminoácidos (Fig. 23), de los que la región peptídica de 22 aminoácidos del extremo amino (MANLMMRLPISLRSFSVSASSS), dirige la proteína hacia su orgánulo de importe. La proteína madura está formada por 103 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 14000 Da y un punto isoeléctrico teórico de 10.17.

```

atggcggaatttgatgatgagattaccaattagcttgagaagcttctctgtttcagcttct
M A A N L M M R L P I S L R S F S V S A S
tcatccaacgggttcgccgccggtgatcggaggatctagcggcgggtgtaggaccgatgatt
S S N G S P P V I G G S S G G V G P M I
gtggaattaccgttggagaagatacgaagaccgttggatgccaaccagatccaacgatcag
V E L P L E K I R R P L M R T R S N D Q
aaciaaagtgaagagcttatggatagtatccgtcaaatcggcttcaagttccgattgat
N K V K E L M D S I R Q I G L Q V P I D
gtgattgaagttgatggaacttactatgggttctcgggatgtcacagatacaggcgcat
V I E V D G T Y Y G F S G C H R Y E A H
cagaagctagggttccaactatacgttgcaaaatccgttaaaggaacaaaggaacatta
Q K L G L P T I R C K I R K G T K E T L
aggcatcatcttcgctga
R H H L R -
    
```

**Figura 19.-** Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la Srx de *A. thaliana* (AtSrx). En negrita se destaca el péptido señal.

La sulfirredoxina naciente de *Pisum sativum* (PsSrx) (número de acceso GU223224) posee un total de 133 aminoácidos (Fig. 24), de los que la región peptídica de 26 aminoácidos del extremo amino (MAASNFLQLPLRSFTVINVASASSS), dirige la proteína hacia su orgánulo de importe. La proteína madura está formada por 107 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 14540 Da y un punto isoelectrónico teórico de 10.00.

```

atggcggcagcaactttctgctgcagctgccgctgcgcagctttaccgtgattaacgtg
M A A S N F L L Q L P L R S F T V I N V
gcgagcgcgagcagcagcaacgggttcgccgccggtgatcggaggatctagcggcgggtgta
A S A S S S N G S P P V I G G S S G G V
ggaccgatgattggaattaccgttggagaagatacgaagaccgttggatgccaaccaga
G P M I V E L P L E K I R R P L M R T R
tccaacgatcagaacaaagtgaagagcttatggatagtatccgtcaaatcggcttcaa
S N D Q N K V K E L M D S I R Q I G L Q
gttcgatgatgtgattgaagttgatggaacttactatgggttctcgggatgacacaga
V P I D V I E V D G T Y Y G F S G C H R
tacgaggcgcatcagaagctagggttccaactatacgttgcaaaatccgttaaaggaaca
Y E A H Q K L G L P T I R C K I R K G T
aaggaaacattaaggcatcatcttcgctga
K E T L R H H L R
    
```

**Figura 24.-** Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la Srx de *guisante* (PsSrx). En negrita se destaca el péptido señal.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las Srxs de *A. thaliana* (375 pb) y *guisante* (399 pb) desvela una alta homología, con tan sólo algunos cambios preferenciales para la codificación de la misma secuencia aminoacídica de la proteína madura (Fig. 25). Poseen un péptido señal diferenciado, con una identidad del 90% entre las proteínas nacientes de cada especie.

PsSrx	1	MAASNFLQLPLRSFTVINVASASSSNGSPPVIGSSGGVGPIMIVELPLEKIRRPLMRTR
AtSrx	1	MANLMMRLPISLRSFSV----SASSSNGSPPVIGSSGGVGPIMIVELPLEKIRRPLMRTR
		** * **** * *****
PsSrx	61	SNDQNKVKELMDSIRQIGLQVPIDVIEVDGTYYGFSGCHRYEAHQKLGLEPTIRCKIRKGT
AtSrx	57	SNDQNKVKELMDSIRQIGLQVPIDVIEVDGTYYGFSGCHRYEAHQKLGLEPTIRCKIRKGT
		*****
PsSrx	121	KETLRHHLR
AtSrx	117	KETLRHHLR
		*****

**Figura 25.- Secuencias aminoacídicas de las Srx de guisante (PsSrx) y A. thaliana (AtSrx).**

Los programas bioinformáticos para la localización subcelular, ChloroP, de localización cloroplastídica, MitoProt, de localización mitocondrial, y MultiLoc/TargetLoc, de localización dual cloroplastídica/mitocondrial, aplicados a las AtSrx y PsSrx, dieron los valores que se recogen en la tabla 10. Estos resultados indican una alta probabilidad de localización dual.

	AtSrx	PsSrx
ChloroP	55%	48%
MitoProt	85%	53%
MultiLoc/TargetLoc	70%	97%

**Tabla 10. Probabilidad de localización subcelular de las AtSrx y PsSrx según los programas bioinformáticos ChloroP, MitoProt y MultiLoc/TargetLoc.**

### **3.- Obtención de mutantes de la AtSrx**

La PCR es una técnica que se caracteriza por su versatilidad. Una de sus utilidades es la de introducir mutaciones puntuales, dirigidas o azarosas en el DNA. Una variante, conocida como PCR solapante, permite hacer mutagénesis dirigida en bases del DNA.

Con objeto de poder realizar un estudio bioquímico y funcional de la sulfirredoxina, se obtuvieron, mediante mutagénesis dirigida, variantes de AtSrx. Para ello, se cambiaron algunos aminoácidos que pudieran estar involucrados en su mecanismo de acción o ser importantes en su función. Las

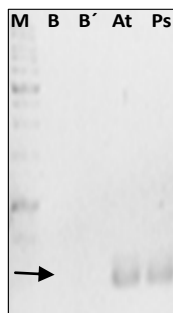
mutaciones dirigidas, mediante el diseño de oligonucleótidos (ver tabla 7), contenían el cambio en el triplete de bases que codifica al nuevo aminoácido, para su modificación por PCR solapante. Los aminoácidos mutados fueron:

- Cisteína 72. Es un aminoácido conservado dentro del motivo catalítico de la enzima y objeto de mutación por serina (C72S-AtSrx). Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos Srx-F / C72S-R y C72S-F/Srx-R, que producen el cambio del triplete *tgt*, que codifica la cisteína, por *agt* que codifica la serina. Mediante una tercera PCR de la mezcla de productos amplificados, utilizando los oligonucleótidos Srx-F / Srx-R, se obtuvo el producto de amplificación codificante a la C72S-AtSrx, que fue confirmada mediante secuenciación.
- Arginina 28. Es un residuo conservado involucrado en la unión al Mg<sup>2+</sup> y en la activación nucleofílica de la cisteína catalítica. Se optó por su mutación por glutamina (R28Q-AtSrx). En este caso, se utilizaron los oligonucleótidos Srx-F / R28Q-R y R28Q-F / Srx-R, que producen el cambio del triplete *aga*, que codifica la arginina, por *caa* que codifica la glutamina. Mediante una tercera PCR de la mezcla de productos amplificados, utilizando los oligonucleótidos Srx-F / Srx-R, se obtuvo el producto de amplificación codificante a la R28Q-AtSrx, que fue confirmada mediante secuenciación.
- Lisina 40. Es un aminoácido conservado e implicado en la unión al ATP, siendo mutado por glutamina (K40Q-AtSrx). Se utilizaron los oligonucleótidos Srx-F / K40Q-R y K40Q-F / Srx-R, que producen el cambio del triplete *aaa*, que codifica la lisina, por *caa* que codifica la glutamina. Mediante una tercera PCR de la mezcla de productos amplificados, utilizando los oligonucleótidos Srx-F / Srx-R, se obtuvo el producto de amplificación codificante a la K40Q-AtSrx, que fue confirmada mediante secuenciación.
- Glutámico 76. Es un aminoácido específico de la Srx de plantas. Se diseñó su mutación por alanina (E76A-AtSrx) mediante PCR con los oligonucleótidos Srx-F / E76A-R y E76A-F / Srx-R que provocan el cambio en el triplete *gag* por *gcg*, y una tercera PCR de la mezcla de productos amplificados con la pareja de oligonucleótidos Srx-F/Srx-R. Dicha amplificación se confirmó mediante secuenciación.
- La mutación doble R28Q/E76A-AtSrx se realizó a partir de la construcción R28Q-AtSrx obtenida previamente, utilizando los oligonucleótidos Srx-F / E76A-R y E76A-F / Srx-R para producir un cambio en el triplete codificante de glutamina por alanina, y una tercera PCR de la mezcla de productos amplificados con la pareja de

oligonucleótidos Srx-F / Srx-R. Dicha amplificación se confirmó mediante secuenciación.

#### **4.- Clonación de la Srx y sus mutantes**

A partir de la amplificación mediante PCR del gen que codifica la Srx de *A. thaliana* (AtSrx) y de guisante (PsSrx), utilizando como molde el gDNA extraído a partir de material vegetal, y empleando los oligonucleótidos específicos Srx-F / Srx-R, se obtuvieron los genes que codifican la Srx madura de cada una de las especies. Al producto obtenido de cada PCR, se le aplicó una separación electroforética en gel de agarosa al 1.5%. Realizada la tinción con bromuro de etidio, se pudieron identificar las bandas correspondientes, de alrededor de 300 pb (Fig. 26).



**Figura 26.- Electroforesis de los productos obtenidos por PCR de la Srx de *A. thaliana* (At) y de guisante (Ps). M: Marcador de pares de bases; B: blanco o control sin gDNA de *A. thaliana*; B': blanco o control sin gDNA de guisante.**

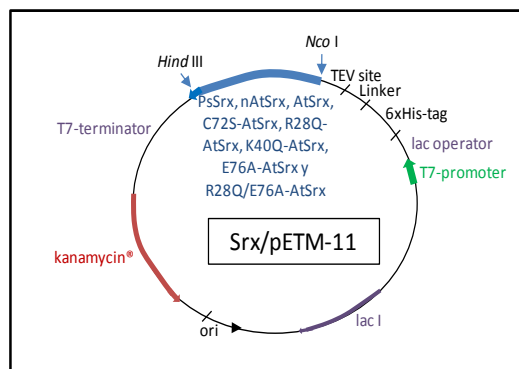
De forma similar, utilizando como molde el producto de amplificación del gen que codifica la Srx “wild type” de *A. thaliana* (AtSrx WT), se obtuvieron cada una de sus variantes con mutaciones dirigidas en aminoácidos implicados en su mecanismo de acción (C72S-AtSrx, R28Q-AtSrx, K40Q-AtSrx, E76A-AtSrx y R28Q/E76A-AtSrx). A los productos amplificados por PCR, se le realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con tinción en bromuro de etidio (Fig. 27), para su purificación y su posterior clonación.



**Figura 27.- Electroforesis de los productos obtenidos por mutagénesis dirigida de la AtSrx.**

Los productos purificados que codifican la PsSrx, la AtSrx y sus diferentes mutantes (C72S-AtSrx, R28Q-AtSrx, K40Q-AtSrx, E76A-AtSrx y R28Q/E76A-AtSrx), se introdujeron, mediante ligación, en un vector de clonación de productos de PCR (ver tabla 6). Estas construcciones se transformaron en la cepa de clonaje DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Realizada la selección de cada clon mediante cultivo en placa de LB agar con ampicilina, se confirmó mediante PCR de colonia y secuenciación, empleando oligonucleótidos contenidos en el plásmido y/o inserto.

Tras el análisis de las secuencias, para confirmar la ausencia de posibles cambios de bases no deseadas y para descartar su inserción en antisentido, se realizó la purificación de alto número de copias plasmídicas mediante “minipreps” de cultivo bacteriano en LB con ampicilina. Cada construcción se sometió a digestión específica con las enzimas de restricción con las que se diseñaron los oligonucleótidos Srx-F y Srx-R (*Nco* I y *Hind* III, respectivamente). De esta manera, mediante electroforesis en gel de agarosa, se observaron los fragmentos digeridos correspondientes a 300 pb aproximadamente. Estas bandas, conteniendo cada secuencia los extremos solapantes, fueron purificadas para su posterior ligación en un vector de expresión (pETM-11) previamente digerido, con las mismas enzimas de restricción y purificado, para dar lugar a las construcciones de interés (Fig. 28).



**Figura 28.- Construcciones plasmídicas de Srx / pETM-11.**

De manera similar, fue amplificado por PCR el gen que codifica la Srx naciente de *A. thaliana* (nAtSrx), conteniendo en su extremo amino el péptido señal. Para ello se emplearon los oligonucleótidos nAtSrx-F / Srx-R (ver tabla 7), diseñados con sitios de restricción para su inserción en el vector de expresión pETM-11, que contiene en su extremo amino (-NH<sub>2</sub>) la cola de histidinas (His-tag).

## **5.- Sobreexpresión de la Srx y sus mutantes**

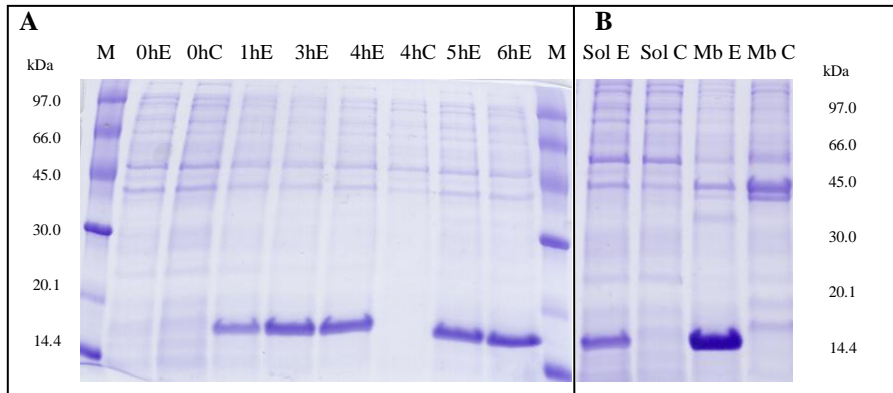
El sistema de expresión pET está basado en la transcripción de genes por parte de la enzima T7-RNA polimerasa (Studier y Moffatt, 1986). La secuencia correspondiente al gen que codifica la proteína de interés, fue clonada a continuación de la secuencia promotora de la enzima T7-RNA polimerasa y la construcción fue introducida por transformación en cepas de *E. coli* que contienen en su genoma una copia del gen que codifica esta enzima. La transcripción del gen de la T7-RNA polimerasa en estas células se encuentra reprimida por medio de la secuencia reguladora lac, inducible por IPTG. La adición de IPTG permite la transcripción y posterior expresión de la enzima T7-RNA polimerasa, la cual dispara a su vez la transcripción del gen de interés. De esta forma, se alcanzan elevados niveles de la proteína recombinante.

Cada una de las construcciones resultantes (PsSrx/pETM-11, nAtSrx/pETM-11, AtSrx/pETM-11, C72S-AtSrx/pETM-11, R28Q-AtSrx/pETM-11, K40Q-AtSrx/pETM-11, E76A-AtSrx/pETM-11 y R28Q/E76A-AtSrx/pETM-11), fueron transformadas por choque térmico en la cepa de expresión de *E. coli* BL21.

La expresión de las proteínas recombinantes se estudió a 37°C con y sin la inducción con IPTG, así como la expresión llevada a cabo por la cepa de *E. coli* conteniendo el vector pETM-11 vacío (control). A lo largo de la expresión de la AtSrx se obtuvieron muestras, a diferentes tiempos del cultivo bacteriano inducido, para realizar un seguimiento mediante electroforesis (Fig. 24.A). Para ello se tomaron alícuotas de 1 mL, del cultivo bacteriano, con intervalos de una hora y se centrifugaron 1 min. a 1600 xg a 4°C. El sedimento bacteriano se resuspendió en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7.9), DTT 0.4 mM, se lisó mediante la prensa de French y se centrifugó. Los extractos crudos solubles mostraron una buena sobreexpresión tras 6 horas de inducción con IPTG (Fig. 29.A). La AtSrx recombinante obtenida posee una masa molecular aproximada de 16 kDa (14 kDa de la proteína madura, más la cola de histidinas). Se observó una inducción de la expresión a lo largo del tiempo, con un máximo a las 5 horas. Por otro lado, se observó que aproximadamente un 30% de la AtSrx se encontraba en la fracción soluble, mientras que la mayor parte de la proteína se localizaba en la fracción membranosa (Fig. 29.B). Esto es debido, posiblemente, a la introducción de la proteína sobreexpresada en cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteínas inactivas que se forman como consecuencia de la sobreexpresión de proteínas

recombinantes. Siguiendo un protocolo desnaturalizante, con urea/cloruro de guanidinio, se pudo extraer la proteína mayoritaria presente en estos agregados.



**Figura 29.- Expresión de la AtSrx recombinante.** **A.** Proteína soluble durante diferentes tiempos de inducción. **B.** Contenido proteico de las fracciones solubles y membranosas de las células tras 6h de inducción. *M:* marcador de masa molecular; *E:* expresión bajo inducción con IPTG; *C:* control de expresión del vector vacío bajo inducción con IPTG; *Sol:* fracción soluble; *Mb:* fracción membranosa.

Las diferentes formas mutadas de la AtSrx, así como la Srx de guisante (Psrx), mostraron en su sobreexpresión un comportamiento similar, por lo que también se optó por la extracción de la proteína recombinante a partir de los cuerpos de inclusión.

## **6.- Desarrollo de un protocolo de purificación para la Srx recombinante**

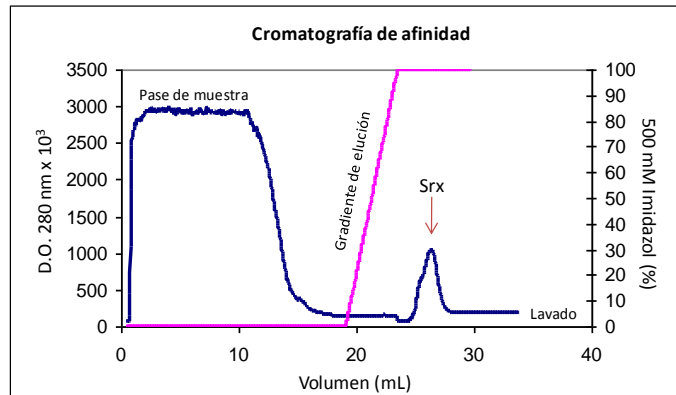
Los altos niveles de expresión alcanzados con el sistema pET, tanto en la proteína soluble como en los cuerpos de inclusión, permitieron el desarrollo de un protocolo de purificación simplificado, en dos pasos cromatográficos (afinidad en columna de níquel e intercambio iónico en columna MonoQ), para las Srxs de guisante y *A. thaliana*, así como para sus formas mutadas.

### **6.1.- Cromatografía de afinidad**

El primer paso de la purificación consistió en una cromatografía de afinidad en columna de níquel-Sepharosa, en la que se retienen las proteínas recombinantes diseñadas con una cola de histidinas (His-tag) en su extremo

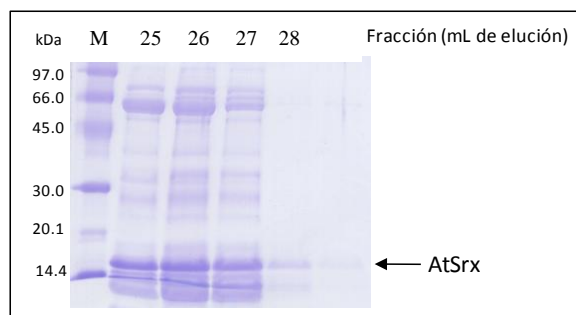


amino (-NH<sub>2</sub>). De esta manera, se fija a la matriz nuestra proteína de interés, que tras ser lavada, es eluida mediante un gradiente creciente de imidazol de 0 a 500 mM. Este primer pase se realizó en columnas de 1 mL ó 5 mL, dependiendo de la cantidad de muestra, en sistema FPLC. En la figura 30 se recoge un cromatograma representativo.



**Figura 30.- Cromatograma obtenido tras la cromatografía de afinidad de la AtSrx por columna de níquel.**

Se determinó la concentración proteica, así como la pureza mediante SDS-PAGE, de las fracciones obtenidas (Fig. 31).



**Figura 31.- SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras cromatografía de afinidad de la AtSrx por columna de níquel. M: marcador de masa molecular.**

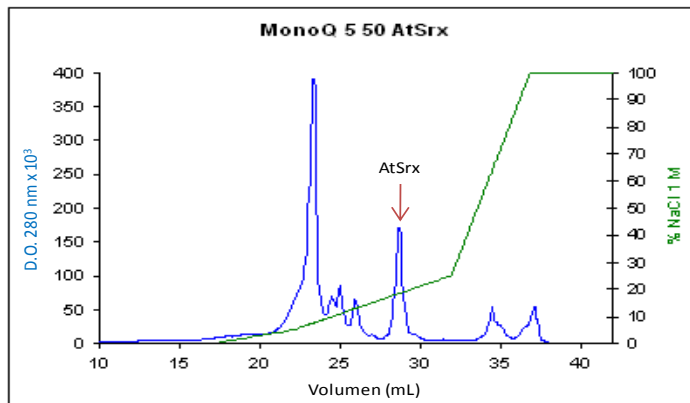
El resto de proteínas recombinantes (PsSrx, nAtSrx y mutantes de la AtSrx) tuvieron un comportamiento similar y como resultado de su primera etapa de purificación en columna de afinidad, se obtuvieron rendimientos similares a la AtSrx.

En algunos casos, con el fin de obtener un mayor rendimiento en esta primera etapa de purificación de la Srx, se optó por obtener la proteína de cuerpos de inclusión. La Srx, tras ser desnaturalizada con 6 M de urea o cloruro de guanidinio para su obtención a partir de la fracción membranosa de las bacterias y para su solubilización, se fijó en la columna de níquel para realizar su plegamiento (“refolding”) mediante gradiente decreciente de urea/cloruro de guanidinio de 6 M a 0 M. Tras su plegamiento en columna, se procedió a su elución con gradiente creciente con imidazol. De esta manera, el rendimiento en la primera fase de la purificación de la Srx fue mayor.

## **6.2.- Cromatografía de intercambio iónico**

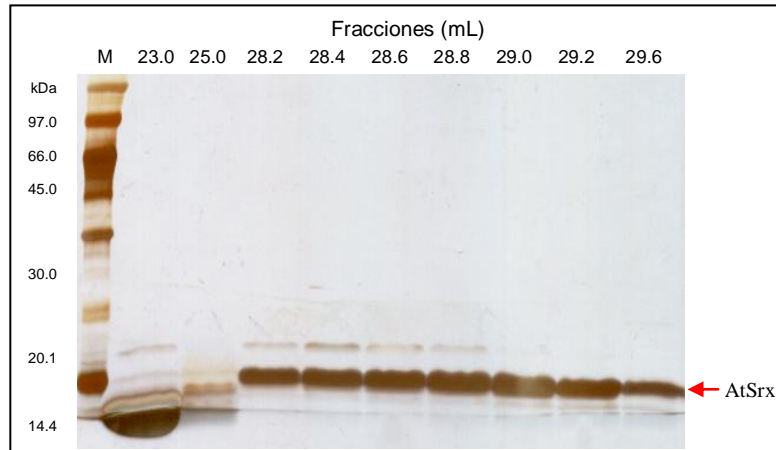
La segunda etapa llevada a cabo en el protocolo de purificación de la Srx y sus mutantes, consistió en una cromatografía de intercambio iónico en columna MonoQ en sistema FPLC. Para ello, fue necesaria una diálisis previa frente a Tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).

La muestra dializada se pasó a través de una columna MonoQ 5/50, en la que la Srx, quedó retenida. La elución se llevó a cabo mediante el aumento de la fuerza iónica. La enzima eluyó a una concentración aproximada de NaCl 0.2 M (Fig. 32).



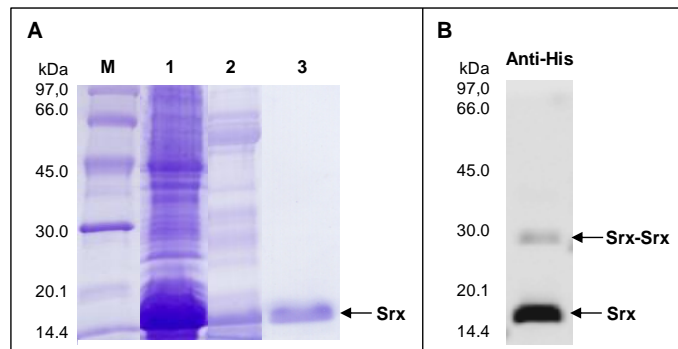
***Figura 32.- Cromatograma obtenido tras cromatografía de intercambio iónico de la AtSrx por columna MonoQ.***

Las fracciones recogidas en la segunda fase del gradiente (200 µL), se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con plata para determinar la pureza de las mismas (Fig. 33).



**Figura 33.- SDS-PAGE de fracciones obtenidas tras cromatografía de intercambio iónico de la AtSrx en columna de MonoQ. M: marcador de masa molecular.**

El comportamiento de la Srx de guisante y *A. thaliana* y sus formas mutadas, fue similar en esta etapa de la purificación, así como en su rendimiento. La pureza de la Srx se analizó en cada paso de purificación mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes y en ausencia de DTT (Fig. 34.A), así como mediante inmunoanálisis empleando el anticuerpo específico frente a la cola de histidina (Fig. 34.B).



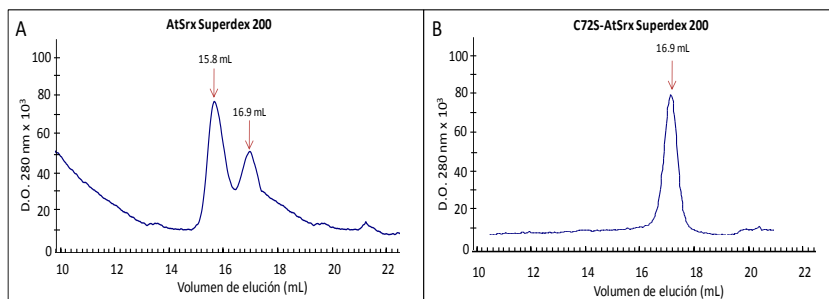
**Figura 34.- Purificación de la AtSrx recombinante. A. SDS-PAGE y tinción con Azul Coomassie. M, marcador de masa molecular; 1, extracto crudo soluble de las células BL21 transformadas con AtSrx/pETM-11; 2, fracciones de la cromatografía de afinidad; 3, fracciones de la cromatografía de intercambio iónico. B. Western blot con anticuerpo específico frente a His-tag de las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico.**

Con estas etapas, se completó la obtención de la Srx recombinante con elevado grado de pureza, siendo reconocida por el anticuerpo específico frente a la His-tag en su forma monomérica, y en menor medida como un dímero.

## **7.- Determinación de la masa molecular de la Srx mediante cromatografía de filtración en gel**

La masa molecular teórica de la Srx madura de *A. thaliana* y de guisante, calculada a partir de la secuencia aminoacídica de la enzima, es de 11546 y 11832 Da respectivamente, mientras que dichas proteínas nativas poseen masas moleculares de 13914 y 14539 Da respectivamente. La Srx madura de ambos orígenes tiene un punto isoeléctrico teórico aproximado de 9.86, mientras que las formas nacientes tienen puntos isoeléctricos de 10.76 y 10.02 para la nAtSrx y nPsSrx respectivamente. La masa molecular de la proteína madura recombinante observada mediante SDS-PAGE fue de 16 kDa, aproximadamente, debido a la incorporación de la His-tag N-terminal. Mediante análisis electroforético en ausencia de DTT, se puede apreciar la aparición de una banda correspondiente a un tamaño molecular aproximado de 28 kDa, que corresponde a un dímero formado por puente disulfuro entre monómeros.

Para el estudio detallado de la masa molecular y radio de Stokes de la AtSrx, se realizó un análisis cromatográfico mediante filtración molecular en columna Superdex S-200 HR acoplada al sistema FPLC. El pase de la proteína por la columna, reveló dos picos bien definidos a 15.8 y 16.9 mL respectivamente (Fig. 35.A). En cambio, el mutante C72S mostró un único pico a 16.9 mL (Fig. 35.B).



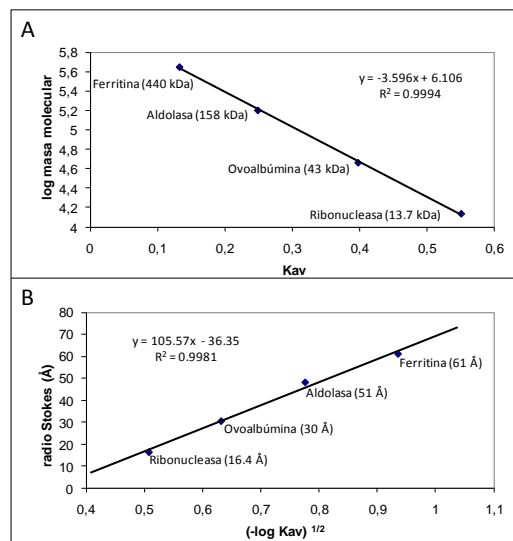
**Figura 35.- Cromatograma obtenido tras el análisis cromatográfico en columna de filtración molecular. A. AtSrx en Superdex 200. B. C72S-AtSrx en Superdex 200.**

Para poder determinar los tamaños moleculares de la Srx, así como el radio de Stokes de ambos picos, se realizó el calibrado de la columna (Fig. 36). Las proteínas patrón utilizadas fueron ferritina (440 kDa, 61 Å), aldolasa (158 kDa, 51 Å), ovoalbúmina (43 kDa, 30 Å) y ribonucleasa (13.7 kDa, 16.4 Å).

Para cada proteína, se calculó la  $K_{av}$  (fracción del volumen de gel estacionario disponible para la difusión de un soluto dado), valor que permite definir la conductancia cromatográfica del soluto independientemente de la longitud del lecho y del grado de empaquetamiento:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

donde  $V_e$  es el volumen de elución para cada proteína,  $V_t$  es el volumen total de la columna (24.4 mL) y  $V_0$  es el volumen de exclusión de la columna (7.9 mL) que se determinó inyectando azul dextrano. La representación del log de la masa molecular frente a la  $K_{av}$  (Fig. 36.A) y, por otra parte, del  $(-\log K_{av})$  frente al radio de Stokes de las proteínas marcadoras (Fig. 36.B), proporciona regresiones lineales que permiten determinar la masa molecular y el radio de Stokes de una proteína conociendo su  $K_{av}$ .



**Figura 36.- Calibración de la Superdex 200 con proteínas marcadoras. A. Masa molecular. B. Radio de Stokes.**

De esta forma, a cada pico obtenido en el cromatograma para la AtSrx (monómero y dímero) y su mutante C72S-AtSrx (monómero), le corresponde una masa molecular experimental y un radio de Stokes aproximado recogidos en la tabla 11. El pico de 16.9 mL corresponde a la forma monomérica de la

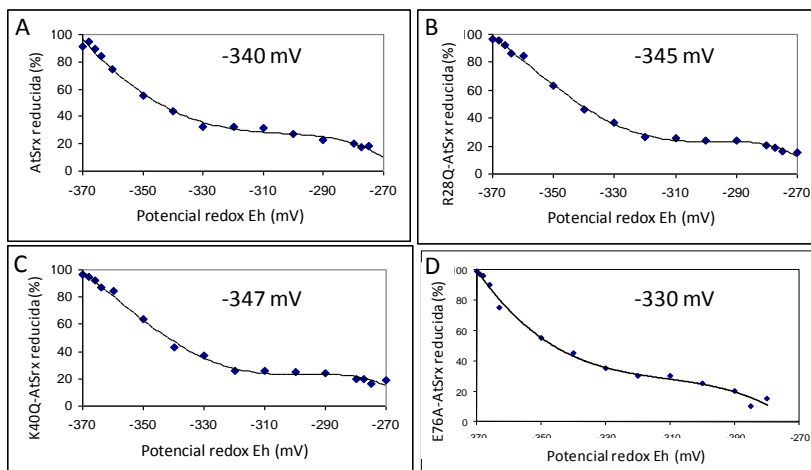
proteína y el pico observado a 15.8 mL corresponde al dímero. Ambos picos se obtienen con la AtSrx, mientras que la mutación en su cisteína catalítica hace que sólo se presente su forma monomérica.

Especie	Volumen (mL)	Masa (kDa)	Radio de Stokes (Å)
Monómero (AtSrx y C72S-AtSrx)	16.9	17.3	13.9
Dímero (AtSrx)	15.8	23.6	25.8

**Tabla 11.- Valores de masa molecular y radio de Stokes de la AtSrx y C72S-AtSrx determinados mediante columna Superdex 200.**

### **8.- Determinación del potencial redox de la AtSrx y sus mutantes**

Con objeto entender mejor el mecanismo de transferencia electrónica del sistema Prx-Srx-Trx, se calculó el potencial redox de la AtSrx y de sus mutantes. A excepción del potencial redox del mutante C72S, que no pudo ser determinado mediante el método fluorimétrico descrito en la sección de *Material y métodos*, todos los potenciales redox fueron determinados a partir de las gráficas mostradas en la figura 37, obteniéndose valores de -340 mV para la AtSrx, -345 mV para R28Q-AtSrx, -347 mV para K40Q-AtSrx y -330 mV para E76A-AtSrx.



**Figura 37.- Potenciales redox para la Srx y sus mutantes. A. AtSrx “wild type”. B. R28Q-AtSrx. C. K40Q-AtSrx. D. E76A-AtSrx.**

## **9.- Determinación de los grupos sulfidrilo de la AtSrx y sus mutantes**

Para determinar si los grupos tiol de la AtSrx se encuentran en zonas expuestas de la proteína, se acudió a la determinación de los mismos mediante la reacción de Ellman, descrita en la sección de *Material y métodos*. En ausencia de agente desnaturizante (SDS), sólo se determinan los grupos tiol que se encuentran expuestos y por tanto accesibles al DTNB. La presencia de SDS, en cambio, permite la determinación de todos los grupos tiol de la proteína.

En la tabla 12, se detallan los valores obtenidos para cada una de las proteínas usadas en el ensayo.

<b>Enzima</b>	<b>Grupos -SH libres / proteína</b>
BSA	1.16 ± 0.12
PsSrx	2.21 ± 0.20
AtSrx	2.17 ± 0.11
AtSrx + SDS	2.29 ± 0.19
R28Q-AtSrx	2.13 ± 0.18
K40Q-AtSrx	1.74 ± 0.19
C72S-AtSrx	0.88 ± 0.12
E76A-AtSrx	1.17 ± 0.18
E76A-AtSrx + ATP	2.25 ± 0.14
E76A-AtSrx + SDS	2.30 ± 0.17
R28Q/E76A-AtSrx	2.09 ± 0.11

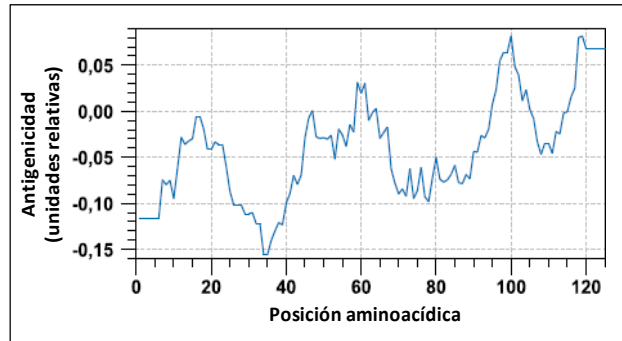
**Tabla 12.- Determinación de los grupos tiol de la Srx de guisante y *A. thaliana*, y sus variantes R28Q, K40Q, C72S, E76A y doble mutante R28Q/E76A.** BSA es utilizado como control, y el SDS como agente desnaturizante. Las determinaciones se realizaron por triplicado, mostrándose la desviación estándar en cada caso.

La albúmina bovina (BSA), con solo un grupo tiol se utilizó como control del ensayo. La Srx, tanto de guisante como de *A. thaliana*, mostró dos grupos tiol libres, correspondientes a las dos cisteínas que contiene en su secuencia y que se encuentran expuestas en su estructura. Sus formas mutadas R28Q y K40Q también contienen dos grupos -SH libres. En cambio, el mutante C72S, como era de esperar y, sorprendentemente, el E76A, sólo

exponen un grupo tiol libre. Éste último, en presencia de SDS o ATP que provocan su desnaturalización o un posible cambio conformacional respectivamente, muestra sus dos grupos –SH expuestos. Por otro lado, el doble mutante presenta en su forma nativa ambas cisteínas expuestas.

## **10.- Obtención y caracterización del anticuerpo policlonal frente a la Srx**

Una vez conocida la secuencia aminoacídica de la Srx de guisante (Psrx) y comparada con la de *A. thaliana* (AtSrx), se realizó un estudio bioinformático de predicción de antigenicidad (Fig. 38) (Welling *et al.*, 1985).



**Figura 38.- Antigenicidad de la nAtSrx basado en el análisis de predicción de Welling.**

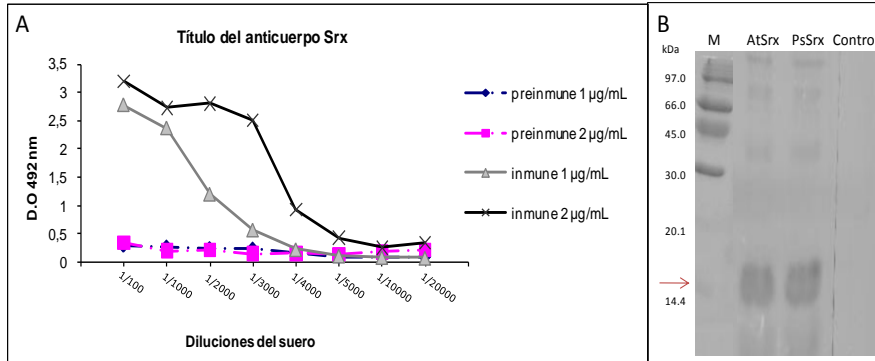
Dicho análisis reveló un máximo de antigenicidad alrededor de la posición 100 de la proteína naciente, por lo que se diseñó un péptido de 15 aminoácidos, correspondiente a esta zona, que contiene las regiones conservadas de la enzima y su centro catalítico conservado:

(94) CHRYEAHQKLGLPTI (108)

La síntesis del péptido, así como la preparación de su anticuerpo, fue realizada por la empresa Abyntek (Vizcaya, España).

Una vez obtenido el antisuero, se determinó su título mediante ELISA (Fig. 39.A) y se ensayó su especificidad mediante Western blot con la proteína recombinante (Fig. 39.B), observando una señal frente a la Srx de *A. thaliana* y de guisante. En cambio, no se apreció señal al utilizar el suero preinmune.





**Figura 39.- Título y especificidad del anticuerpo policlonal frente a la Srx.** **A.** Determinación del título del anticuerpo mediante ELISA, utilizando diferentes diluciones del suero inmune y preinmune. **B.** Western blot de 2 µg de proteínas de extracto de BL21 de Srx de *A. thaliana* (AtSrx) y de guisante (PsSrx) utilizando anti-Srx 1:2000. M, marcador de masa molecular; Control, suero preinmune.

## **11.- Localización subcelular del sistema Prx-Srx**

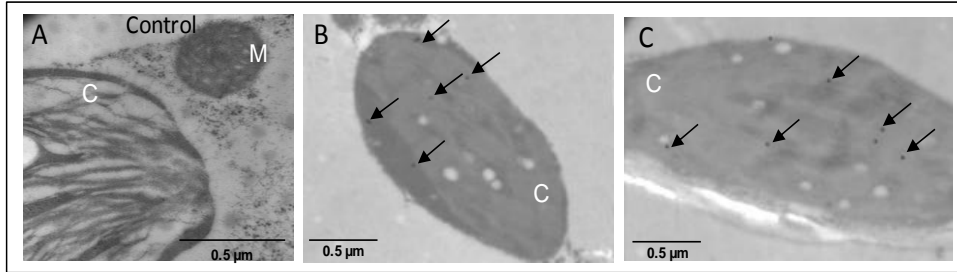
### **11.1.- Localización mediante inmunocitoquímica con microscopía electrónica**

Para determinar la localización subcelular de la Srx, se llevó a cabo la inmunolocalización de la proteína mediante microscopía electrónica. Además, se visualizó la 2-Cys Prx cloroplastídica y su forma sobreoxidada.

Para ello, se realizaron cortes de hojas de guisante tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*, y se trataron con los sueros de los anticuerpos específicos, utilizando los sueros preinmunes como control. Como anticuerpo secundario, se utilizaron anti-IgGs marcadas con partículas de oro coloidal de diferentes tamaños.

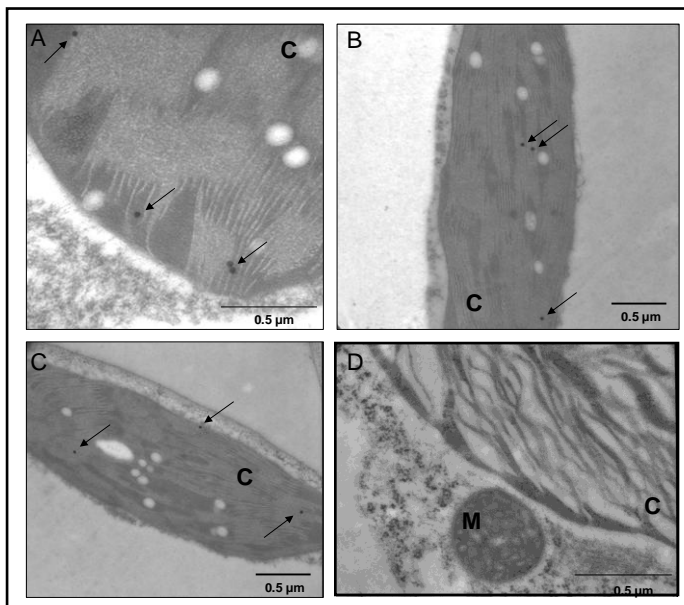
#### **11.1.1.- Localización cloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y Srx**

Mediante inmunodetección, la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx, se localiza, tal y como se observa en la figura 40, en cloroplastos de la hoja de guisantes en condiciones fisiológicas. Como control, no se incubó con anticuerpo primario, no observándose señal (Fig. 40.A).



**Figura 40.-** Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H de cloroplastos de hojas de guisante. A. Control. C, cloroplasto.

La inmunolocalización de la Srx en hojas de guisante reveló que esta enzima se encuentra también en cloroplastos en condiciones fisiológicas, aunque en baja proporción, pero similar a su substrato (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) (Fig. 41).

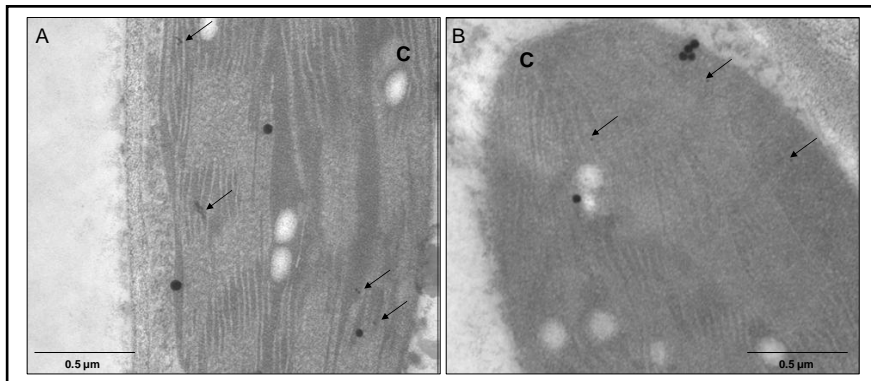


**Figura 41.-** Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la PsSrx de hojas de guisante. D. Control tratado con IgG preinmune. C, cloroplasto; M, mitocondria.

Como control, se realizó la misma incubación en los cortes utilizando como anticuerpo primario el suero preinmune de la Srx, donde no se observó ninguna señal (Fig. 41.D). Además, se realizaron controles negativos sin anticuerpo secundario.

### 11.1.2.- Coinmunolocalización Prx-Srx

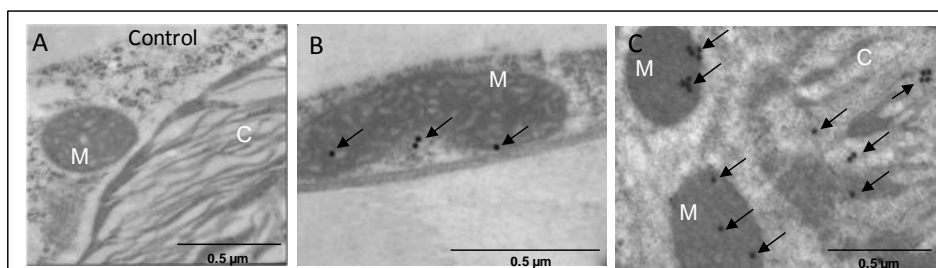
La figura 42.A muestra la doble localización de la 2-Cys Prx y Srx en cloroplastos de guisante, pudiéndose observar una mayor proporción de Prx. Sin embargo, la proporción de la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx es similar a la PsSrx observada en el cloroplasto (Fig. 42.B).



**Figura 42.-** Inmunomarcaje doble de cloroplastos de hojas de guisante. **A.** Muestras tratadas con IgGs anti Srx marcadas con partículas de oro de 30 nm y con anti Ps-2-Cys Prx con partículas de 10 nm. **B.** Muestras tratadas con IgGs anti Srx marcadas con partículas de oro de 30 nm y con anti 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H con partículas de 10 nm. **C,** cloroplasto.

### 11.1.3.- Localización mitocondrial de la Srx

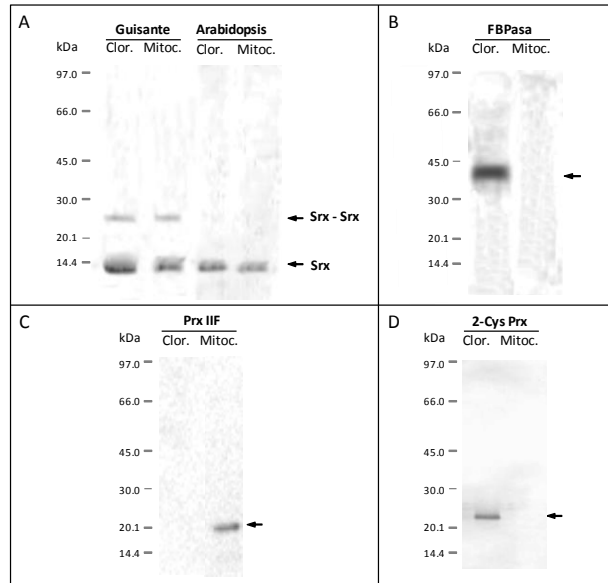
La inmunolocalización de la Srx mediante el uso del anticuerpo específico frente a la enzima en cortes ultrafinos de hojas de guisantes no estresados reveló, además, la presencia de dicha enzima en mitocondrias (Fig. 43). Como control, se incubó con suero preinmune de la Srx, no observando señal (Fig. 43.A).



**Figura 43.-** Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la PsSrx de hojas de guisante. **A.** Control. **C,** cloroplasto; **M,** mitocondria.

## 11.2.- Localización mediante Western blot

Mediante Western blot de orgánulos aislados de guisante y *A. thaliana*, utilizando anticuerpos específicos frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) y la Srx, se detectó la presencia de estas enzimas en cloroplastos y mitocondrias (Fig. 44).



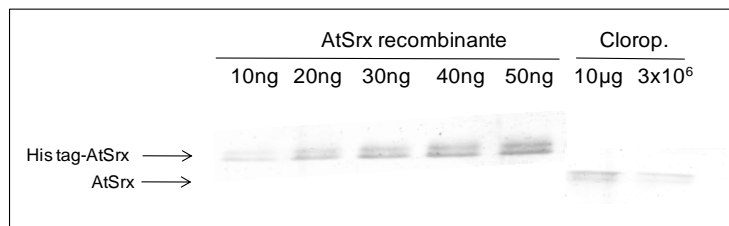
**Figura 44.- Localización en cloroplastos y mitocondrias de guisante y *A. thaliana* del sistema Prx-Srx mediante Western blot. A.** Sulfirredoxina monómero (Srx) y dímero (Srx-Srx). **B.** FBPa cloroplastídica de *A. thaliana*. **C.** Prx IIF mitocondrial de guisante. **D.** 2-Cys Prx cloroplastídica de guisante. Clor., cloroplastos; Mitoc., mitocondrias.

Se detectó la presencia de Srx en su forma monomérica tanto en cloroplastos como en mitocondrias aislada de guisante y *A. thaliana* (Fig. 44.A). La forma dimérica de dicha enzima se observó en menor proporción que el monómero en guisante, no detectándose en *A. thaliana*.

Como control del aislamiento, para descartar cualquier tipo de posible contaminación cloroplasto-mitocondria en las fracciones organulares aisladas, se determinó la FBPa cloroplastídica de *A. thaliana* (Fig. 44.B), proteína de gran abundancia y que no se aprecia en la fracción mitocondrial. Además, se detecta Prx IIF mitocondrial de guisante (Fig. 44.C), indicando ausencia de contaminación cloroplastídica, y la 2-Cys Prx cloroplastídica de guisante (Fig. 44.D), ausente en la fracción mitocondrial.

### 11.2.1.- Cuantificación cloroplastídica de la Srx

Los niveles de Srx en el cloroplasto, similares a los existentes de forma sulfínica de la 2-Cys Prx en condiciones fisiológicas para la planta, se determinaron mediante Western blot. Para ello, se cargaron cantidades conocidas de la AtSrx recombinante que sirvieron como patrón, así como una cantidad conocida de proteínas cloroplastídicas y un número aproximado de cloroplastos intactos aislados de *A. thaliana* (Fig. 45).



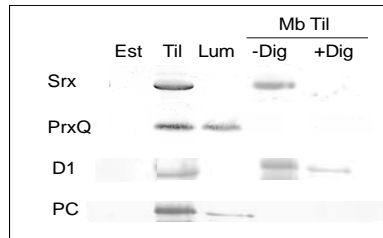
**Figura 45.- Cuantificación por Western blot del contenido de AtSrx en el cloroplasto.** Análisis comparativo de la Srx presente en 10 µg de proteínas cloroplastídicas y en 3 millones de cloroplastos de *A. thaliana*, utilizando como patrón diferentes cantidades de Srx de *A. thaliana* recombinante (10-50 ng).

Se estimó que aproximadamente existen 2 ng de AtSrx por µg de proteína total de cloroplasto, ó 3.3 ng de AtSrx por millón de cloroplastos.

### 11.2.2.- Localización intracloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y Srx

Con el objetivo de localizar la Srx dentro del cloroplasto, se procedió a su lisis por choque hipotónico, tras ser aislados intactos de hojas de guisantes en gradiente de Percoll, tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*. Las fracciones estromática, luminal y membranas tilacoidales, se analizaron mediante Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la Srx, así como otros anticuerpos policlonales que reconocen proteínas cloroplastídicas como control (Fig. 46).

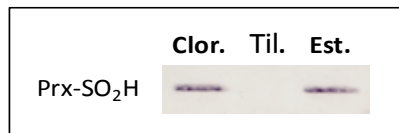
La PsSrx se detectó asociada a la membrana tilacoidal, estando ausente tanto en la fracción estromática como en el lumen tilacoidal, con la misma localización que la proteína D1 del centro de reacción cloroplastídico. En cambio, la Prx Q, al igual que la plastocianina (PC), se encontraron en el lumen tilacoidal.



**Figura 46.- Localización intracloroplastídica de la PsSrx.** Est, estroma; Til, tilacoides; Lum, lumen; Mb Til, membrana tilacoidal sin tratamiento con digitonina (-Dig) o tratadas con digitonina (+Dig). Srx, sulfirredoxina de guisante; PrxQ, peroxirredoxina Q; D1, proteína D1 del centro de reacción; PC, plastocianina.

Para conocer si la Srx, localizada en la membrana tilacoidal, se encuentra en la cara externa o estromática, o asociada a la cara interna o lumínica, las membranas tilacoidales se trataron con digitonina, que hidroliza las proteínas lumínicas de la membrana tilacoidal. De esta manera, por Western blot, se confirmó la localización de la PsSrx en la membrana tilacoidal externa, en contacto con la zona estromática del cloroplasto (Fig. 46).

Del mismo fraccionamiento cloroplastídico, se analizó la localización del sustrato de la Srx mediante Western blot, utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx (Fig. 47).



**Figura 47.- Localización intracloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H.** Análisis por Western blot de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx en cloroplastos de guisante y su fracción tilacoidal y estromática.

La forma sulfínica de la 2-Cys Prx se localizó, a diferencia de la Srx, en la fracción estromática del cloroplasto.

La secuencia de la AtSrx se sometió a un estudio bioinformático (TMpred) para analizar la posible existencia de regiones transmembrana que pudieran atravesar la membrana tilacoidal, encontrando que dicha secuencia puede contener, con alta probabilidad, dos regiones transmembrana:

- Del aminoácido 10 al 31, de la membrana interna a la cara externa (estromática): 60.2%.
- Del aminoácido 27 al 44, de la cara externa hacia la membrana interna (lumínica): 76.2%.

Por tanto, la Srx de plantas posee una alta probabilidad de estar incluida en la membrana tilacoidal, presentando dos dominios transmembrana y regiones tanto en la cara estromática como en la cara lumínica.

### 11.2.3.- Localización intramitocondrial de la Srx

Una vez localizada la Srx en mitocondrias aisladas, se realizó el fraccionamiento mitocondrial por sonicación, tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*, para separar las proteínas de la matriz mitocondrial de la fracción de membranas mitocondriales. Se observó, mediante Western blot, la localización intramitocondrial de la Srx y Prx IIF de guisante mediante el uso de los anticuerpos específicos frente a las mismas (Fig. 48).



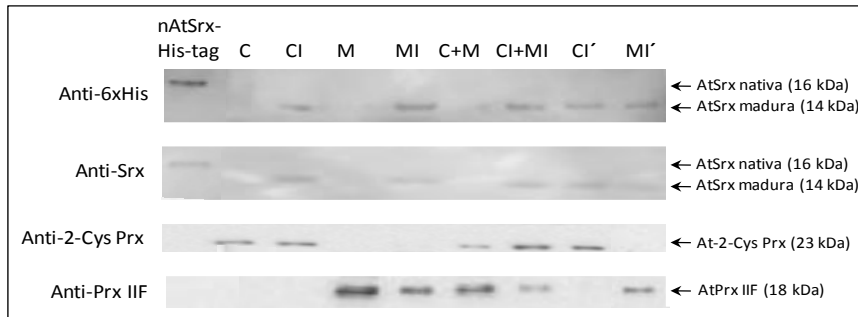
**Figura 48.- Localización sub-mitocondrial de la PsSrx.** Análisis por Western blot de la Srx y Prx IIF en mitocondrias de guisante y su fracción matricial y membranosa.

La PsSrx se encuentra localizada en la fracción soluble de la matriz mitocondrial, coincidiendo con la Prx IIF y estando ambas ausentes en las membranas mitocondriales.

### 11.3.- Importe dual *in vitro* de la nAtSrx a cloroplasto y mitocondria

Con objeto de corroborar la localización dual de la Srx en cloroplastos y mitocondrias, se realizó el importe de la proteína nativa recombinante (nAtSrx) en estos orgánulos aislados tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*.

Tras el ensayo de importe de dicha proteína a cloroplastos y mitocondrias aisladas de plantas de *A. thaliana* carentes de Srx ( $\Delta$ Srx), tanto los orgánulos por separado como conjuntamente, se analizaron, mediante Western blot, con los anticuerpos específicos para la cola de histidinas que presenta la proteína, así como frente a la Srx (Fig. 49). Además, como control, se utilizaron los anticuerpos frente a las Prxs cloroplastídicas y mitocondrial.



**Figura 49.- Western blot del ensayo de importe dual de la nAtSrx a cloroplastos y mitocondrias de *A. thaliana* carentes de Srx ( $\Delta$ Srx).** La proteína nativa recombinante de *A. thaliana* (nAtSrx His-tag) con péptido señal fue importada a cloroplastos (C) y mitocondrias (M) y detectada mediante el uso de anticuerpos frente a la cola de polihistidinas (Anti-6xHis), la Srx (Anti-Srx), la 2-Cys Prx cloroplastídica (Anti-2-Cys Prx) y la Prx IIF mitocondrial (Anti-Prx IIF). nAtSrx-His-tag: nAtSrx nativa recombinante no importada; C: cloroplastos aislados antes del importe; CI: cloroplastos aislados después del importe; M: mitocondrias aisladas antes del importe; MI: mitocondrias aisladas después del importe; C+M: cloroplastos y mitocondrias antes del importe; CI+MI: cloroplastos y mitocondrias después del importe; CI': cloroplastos aislados después del importe junto a mitocondrias; MI': mitocondrias aisladas después del importe junto a cloroplastos.

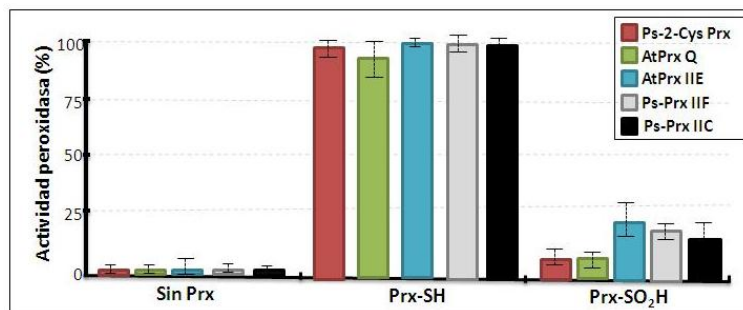
La proteína recombinante, antes de ser importada, presenta un tamaño molecular aproximado de 16 kDa, que se reduce a unos 14 kDa como consecuencia de la pérdida del péptido señal después del importe *in vitro* a los orgánulos de destino. Se observó que la Srx se introduce tanto en cloroplastos, como en mitocondrias, de forma similar. En cloroplastos se encuentra presente la 2-Cys Prx, que no se detecta en mitocondrias, descartando la posibilidad de contaminación en el proceso de aislamiento. De forma similar, la Prx IIF sólo se detecta en la fracción mitocondrial y no en la cloroplastídica. Para descartar la posibilidad de detectar la Srx presente en los orgánulos, el importe se realizó con las plantas mutantes de *A. thaliana* carentes de Srx ( $\Delta$ Srx) y la proteína se detectó también mediante el anticuerpo específico frente a la cola de histidinas presente en el extremo carboxilo (-COOH) de la enzima recombinante.



## 12.- Obtención de la forma sobreoxidada de las Prxs

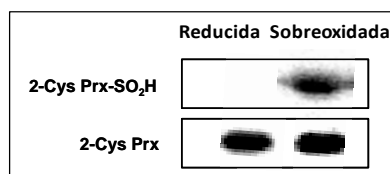
Para la obtención de la forma sulfínica de las diferentes Prxs (Ps-2-Cys Prx, At-2-Cys Prx, AtPrx Q, AtPrx IIE, PsPrx IIF y PsPrx IIC) se realizó un tratamiento de sobreoxidación tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*, que consiste en la reducción previa de estas enzimas con DTT, y la posterior oxidación con  $H_2O_2$ .

Para confirmar la obtención de la forma sulfínica, se realizó primeramente la determinación de la actividad peroxidasa dependiente de DTT (Fig. 50).



**Figura 50.- Actividad peroxidasa de las formas reducidas y sobreoxidadas de las Prxs.** Media de la actividad peroxidasa *in vitro* de la Ps-2-Cys Prx, AtPrx Q, AtPrx IIE, PsPrx IIF y PsPrx IIC en sus formas reducida y sulfínica. Como control, se realiza la determinación en ausencia de Prx.

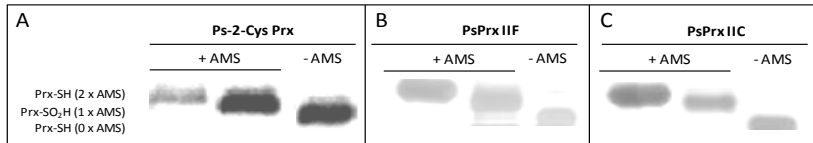
Como se puede observar, la sobreoxidación de las diferentes Prxs produce una pérdida de gran parte de su actividad peroxidasa, quedando una actividad residual correspondiente a la cantidad de enzima que no llega a sobreoxidarse. Ésta es mayor en las Prxs tipo II al ser más resistentes a la sobreoxidación. Además, mediante el uso del anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la Prx de 2 Cys, se comprobó la sobreoxidación de la 2-Cys Prx (Fig. 51).



**Figura 51.- Western blot de la 2-Cys Prx reducida y sobreoxidada.** Immunodetección de la forma sobreoxidada *in vitro* de la 2-Cys Prx de guisante. Como control de carga, se utiliza el anticuerpo frente a la Prx total.

El anticuerpo frente a la forma sobreoxidada de la Prx reconoce sólo la enzima sometida al tratamiento de sobreoxidación, y no la enzima en su forma reducida, justificando la eficiencia del tratamiento de sobreoxidación y la especificidad de dicho anticuerpo. Como control, se detectó la proteína total cargada mediante el uso del anticuerpo específico frente a la Ps-2-Cys Prx, que reconoce tanto la forma reducida como la sobreoxidada.

Con objeto de confirmar la obtención de la forma sobreoxidada del resto de Prxs para las que no existe el anticuerpo específico, se realizó el ensayo de unión de los grupos –SH al agente alquilante (AMS), que incrementa en 0.5 kDa la masa molecular por cada AMS unido. De esta manera, se comprobó la sobreoxidación mediante Western blot utilizando los anticuerpos específicos frente a las Prxs de guisante, 2-Cys Prx, Prx IIF y Prx IIC (Fig. 52).

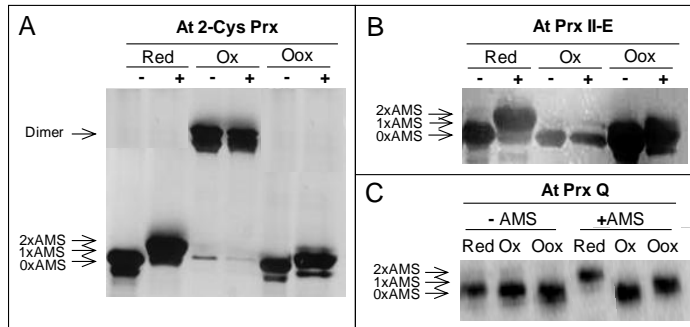


**Figura 52.- Western blot de las formas sobreoxidadas de las Prxs de guisante tratadas con AMS. A. Anti-2-Cys Prx. B. Anti-Prx IIF. C. Anti-Prx IIC.**

Se observa una banda intermedia entre las formas reducidas con y sin AMS, correspondiente a las formas sobreoxidadas de las Prxs, a la que se le ha unido un solo AMS a su cisteína resolutora. Esta banda se encuentra entre las bandas correspondientes a la forma reducida de las Prxs tratadas y sin tratar con AMS, a las que se les une 2 y 0 AMS respectivamente.

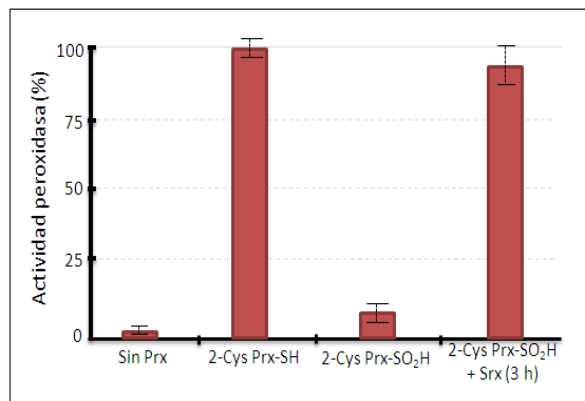
De forma similar, se analizó la sobreoxidación de las Prxs cloroplastídicas de *A. thaliana* (Fig. 53).

Las Prxs de *A. thaliana* sometidas al tratamiento de sobreoxidación y con AMS, muestran por inmunoanálisis un tamaño intermedio entre las formas reducidas con y sin AMS. La forma oxidada corresponde a la proteína sin tratamiento ni de reducción ni de oxidación, y para el caso de la 2-Cys Prx se muestra en forma dimérica.



**Figura 53.- Western blot de las formas reducida (Red), oxidada (Ox) y sobreoxidada (Oox) de las Prxs de *A. thaliana* tratadas con AMS (+AMS) o sin AMS (-AMS). A. Anti-2-Cys Prx. B. Anti-Prx IIE. C. Anti-Prx Q.**

Mediante estos ensayos de ausencia de actividad peroxidasa, análisis de anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx y Western blot tras tratamiento con AMS, se comprobó la eficiencia del tratamiento puesto a punto. Sin embargo, la sobreoxidación desde la forma previamente reducida, podría llevar a la forma de ácido sulfónico en lugar de ácido sulfínico, que es lo que se pretende. Por tanto, para comprobar que se trata de la forma sulfínica, se ensayó la recuperación de la actividad peroxidasa de la 2-Cys Prx sobreoxidada tras ser incubada durante 3 h con Sr<sub>x</sub>, ATP, MgCl<sub>2</sub> y DTT (Fig. 54).



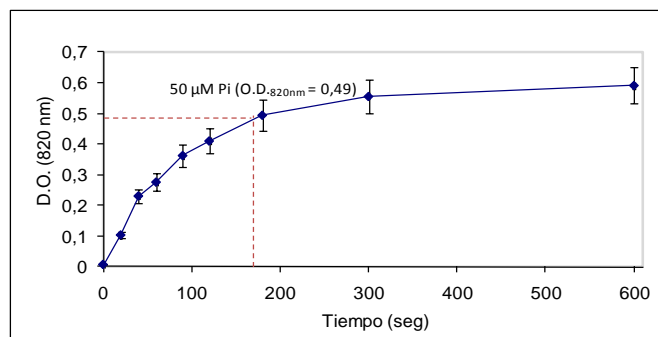
**Figura 54.- Actividad peroxidasa de las formas reducida y sobreoxidada de la 2-Cys Prx y regenerada por la Sr<sub>x</sub>. Determinación de la actividad peroxidasa de la 2-Cys Prx-SH, Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y esta tras ser regenerada por la PsSr<sub>x</sub> después de 3 h de incubación de la mezcla de reacción.**

Tras incubar la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx de guisante con Srx durante tres horas en el medio de reacción, se observó la recuperación de la actividad peroxidasa de la 2-Cys Prx. De esta forma, se demuestra que el tratamiento de sobreoxidación ha sido eficiente para producir la forma sulfínica de la 2-Cys Prx, sustrato de la Srx, y no la forma de ácido sulfónico irreversible.

### **13.- Actividad enzimática de la Srx**

La actividad de la sulfirredoxina para reducir la forma sulfínica inactiva de la Prx, ha sido determinada, tal y como se describe en la sección de *Material y métodos*, mediante un nuevo método de cuantificación del fosfato inorgánico liberado, con el acoplamiento de enzimas para la reducción del NADPH o mediante la determinación del ADP generado. Los dos primeros procedimientos se tratan de ensayos colorimétricos y espectrofotométricos, mientras que el último de ellos se es un método cromatográfico acoplado al sistema FPLC.

El nuevo método colorimétrico de cuantificación de fosfato para medir la actividad Srx, consiste en la formación de un complejo molibdenico del  $P_i$  en medio ácido. El bajo pH necesario produce la autohidrólisis del ATP presente en la reacción, por lo que resulta necesaria la adición de citrato para captar el exceso de  $P_i$  proveniente de dicha autohidrólisis ácida. Debido a ello, se ensayó en las condiciones de reacción la adición de citrato, a diferentes tiempos, en una muestra estándar con  $50 \mu\text{M}$  de  $P_i$  (Fig. 55).



**Figura 55.- Análisis de estabilización de hidrólisis del ATP mediante adición de citrato.** Diferentes tiempos de adición de citrato trisódico para la determinación colorimétrica de  $P_i$ .

Como se observa en la gráfica, se produce una estabilización en la determinación de  $P_i$  a partir de 3 min., momento en el que si se adiciona el

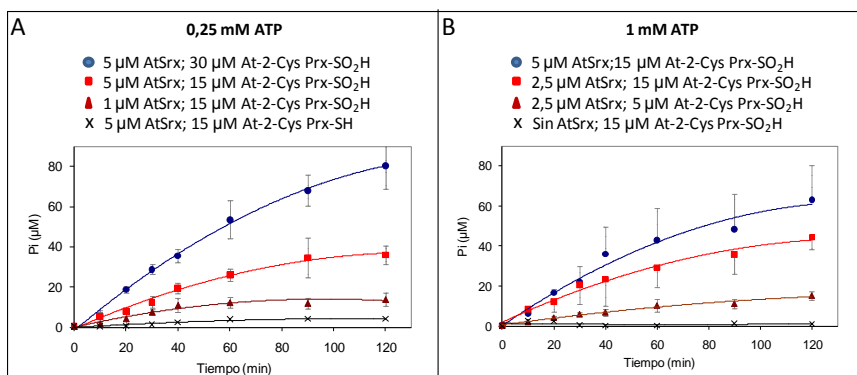
citrato, la D.O. a 820 nm corresponde a la concentración estándar añadida. Los 3 min. exactos para la formación del complejo son suficientes y aunque la hidrólisis ácida continúa liberando  $P_i$  éste es captado por el citrato.

### 13.1.- Cinéticas con la 2-Cys Prx

La Srx posee *in vitro* una cinética enzimática diferenciada en ausencia o presencia de agente reductor, como puede ser DTT, GSH o Trx. En ausencia de reductor en el medio de reacción, se produce un ciclo fútil que libera una cantidad de fosfato inorgánico, como consecuencia de la hidrólisis del ATP, mayor que la concentración de Prx-SO<sub>2</sub>H (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). Dependiendo de la ausencia o presencia de reductor, se utilizó uno u otro método enzimático.

#### 13.1.1.- Sin reductor

Mediante la determinación colorimétrica del  $P_i$  liberado, se realizaron las cinéticas de la reacción de la AtSrx en la reducción de la forma sulfínica de la At-2-Cys Prx en ausencia de agente reductor (Fig. 52). Para ello, se cuantificó el  $P_i$  liberado a diferentes tiempos, y durante 2 h, en el medio de reacción conteniendo tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 0.25 ó 1 mM y las concentraciones de 2-Cys Prx (reducida y sobreoxidada) y Srx que se indican en la figura 56.



**Figura 56.- Actividad enzimática de la AtSrx determinada mediante cuantificación del  $P_i$  liberado en ausencia de agente reductor. A. ATP 0.25 mM y concentraciones variables de AtSrx y At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, utilizando la forma reducida de la Prx como control. B. ATP 1 mM y concentraciones variables de AtSrx y At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, realizando el control sin Srx.**

En la gráfica de la figura 56.A, se observa una mayor liberación de  $P_i$ , cuanto mayor es la concentración de Srx ó 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H. Dicha liberación se incrementa durante las dos primeras horas de reacción. Como control, se utilizó la forma reducida de la 2-Cys Prx, donde no se produce liberación de  $P_i$ . Con mayor concentración de ATP (1 mM) (Fig. 56.B), se produce una mayor liberación de  $P_i$ , que también es proporcional a la concentración de sustrato o enzima. Como control, la reacción se llevó a cabo en ausencia de Srx, donde no se observó liberación de  $P_i$ .

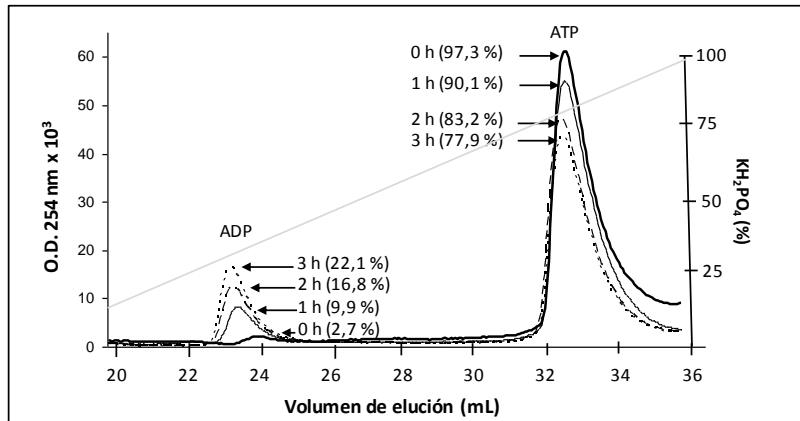
Para demostrar la eficacia y sensibilidad del método de determinación de la actividad Srx mediante la cuantificación de  $P_i$ , se realizó la comparación con el método basado en la determinación del NADH acoplado el ADP producido a las reacciones de la piruvato kinasa y láctico deshidrogenasa con fosfoenolpiruvato, utilizando diferentes concentraciones de Srx, 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP (Tabla 13).

AtSrx (μM)	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H (μM)	ATP (mM)	P <sub>i</sub> (μM)	ADP (μM)	Significancia
5	15	0.25	35.9 ± 4.3	42.1 ± 2.5	≥ 0.99
5	30	0.25	80.4 ± 11.5	78.4 ± 2.1	≥ 0.99
2.5	15	0.25	24.4 ± 3.1	26.4 ± 3.4	≥ 0.99
5	15	1	63.2 ± 5.0	77.5 ± 5.3	≥ 0.98
5	30	1	96.6 ± 7.6	97.6 ± 4.5	≥ 0.99
2.5	15	1	44.3 ± 4.4	59.6 ± 3.1	≥ 0.98

**Tabla 13.- Actividad Srx mediante determinación de  $P_i$  y de ADP generado.** Las mezclas de reacción con las concentraciones indicadas, se incubaron durante 2 h a 30°C. Los valores medios ± SD corresponden a 3 determinaciones independientes y la similitud entre ambos métodos fue analizada estadísticamente por la t-Student de 2 colas.

Tal y como se observa, existe una elevada significancia entre los datos obtenidos en la determinación de la actividad Srx por ambos métodos.

Ya que la Srx en las condiciones de reacción produce la hidrólisis del ATP para formar ADP y  $P_i$  a concentraciones equimolares, la actividad Srx, puede determinarse mediante análisis del ADP formado en columna MonoQ FPLC (Fig. 57).



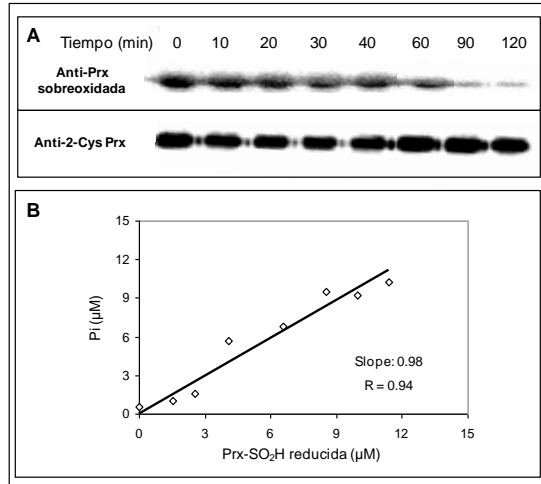
**Figura 57.- Análisis en columna Mono Q en sistema FPLC del ADP generado por la actividad de la Srx a los tiempos indicados. La mezcla de reacción contiene Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub>, 1 mM, ATP 100 μM, AtSrx 15 μM y At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H 30 μM. A los tiempos indicados, 200 μL de la mezcla de reacción fueron inyectados para la separación en columna MonoQ.**

De esta manera, puede observarse un incremento del pico correspondiente al ADP durante las tres primeras horas de reacción, acompañado de un descenso del pico correspondiente al ATP.

### 13.1.2.- Con reductor

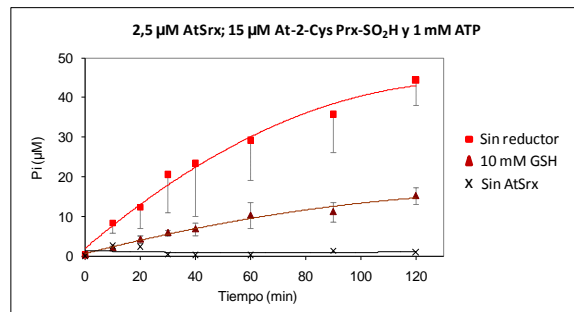
Mediante análisis por Western blot, utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx, se observó la disminución de la forma sulfínica de la Prx en comparación con la Prx total, a lo largo del tiempo de reacción con la Srx (Fig. 58.A).

Se puede apreciar la desaparición de casi la totalidad de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx tras 2 h de incubación en medio de reacción con la Srx. Mediante análisis de imagen de la señal del Western blot se observa que el descenso relativo de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, se correlaciona con los datos obtenidos de la determinación de la actividad Srx por cuantificación de P<sub>i</sub> a los mismos tiempos de reacción (Fig. 58.B).



**Figura 58.-** Correlación entre la determinación de la actividad Srx mediante cuantificación del P<sub>i</sub> liberado y análisis de inmunoblot. **A.** Western blot frente a la 2-Cys Prx sobreoxidada y 2-Cys Prx total de alícuotas obtenidas de la reacción a los tiempos indicado. El medio de reacción, contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), ATP 250 µM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, GSH 10 mM AtSrx 5 µM y At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H 15 µM . **B.** Concentración de Prx-SO<sub>2</sub>H reducida determinada mediante análisis de imagen del Western blot frente a la concentración de P<sub>i</sub> cuantificada para cada muestra.

De esta manera, se obtuvo una gráfica lineal de pendiente y coeficiente de regresión lineal cercano a la unidad, lo que demuestra la validez del método colorimétrico para la determinación de la actividad Srx. La cinética de la actividad Srx en presencia y ausencia de agente reductor (GSH), mediante la determinación del P<sub>i</sub> liberado, se representa en la figura 59.



**Figura 59.-** Actividad enzimática de la AtSrx determinada mediante cuantificación del P<sub>i</sub> liberado en ausencia y presencia de agente reductor (GSH). El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) AtSrx 2.5 µM, At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, 15 µM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ATP 1 mM. Se representa un control sin AtSrx.



Como se observa en la gráfica, en presencia de GSH, la liberación final de  $P_i$  es similar a la concentración de 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H (15  $\mu$ M), mientras que en ausencia de reductor, la concentración de  $P_i$  alcanzada un valor mayor. Similares resultados se obtuvieron a otras concentraciones de enzima y sustratos, al igual que con DTT como agente reductor.

### **13.2.- Cinéticas con otras Prxs vegetales**

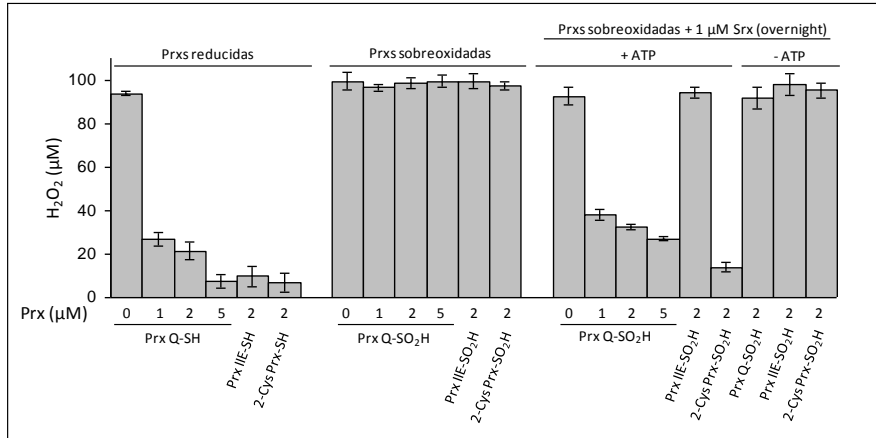
Teniendo en cuenta que la Srx es una enzima recientemente descubierta y poco estudiada en vegetales, su localización mitocondrial observada por nosotros y la presencia de diferentes tipos de Prxs con posibilidad de sobreoxidarse e inactivarse hasta la forma sulfínica, decidimos confirmar si alguna de ellas podía ser reducida por la Srx. Por ello, ensayamos la recuperación de la actividad peroxidasa tras su incubación en el medio de reacción con Srx. Además, estudiamos las cinéticas de reacción mediante la determinación del  $P_i$  y del ADP generados.

Para abordar dicho objetivo, se agruparon las Prxs en cloroplastídicas (Prx Q y Prx IIE, además de la 2-Cys Prx) y no cloroplastídicas (Prx IIF mitocondrial y la Prx IIC citosólica). Las Prxs cloroplastídicas recombinantes fueron de *A. thaliana*, mientras que las no cloroplastídicas fueron de guisante.

#### **13.2.1.- Cloroplastídicas**

Además de la 2-Cys Prx, la Prx Q y Prx IIE son susceptibles de ser inactivadas en su forma sulfínica, perdiendo su actividad peroxidasa. (Fig. 60).

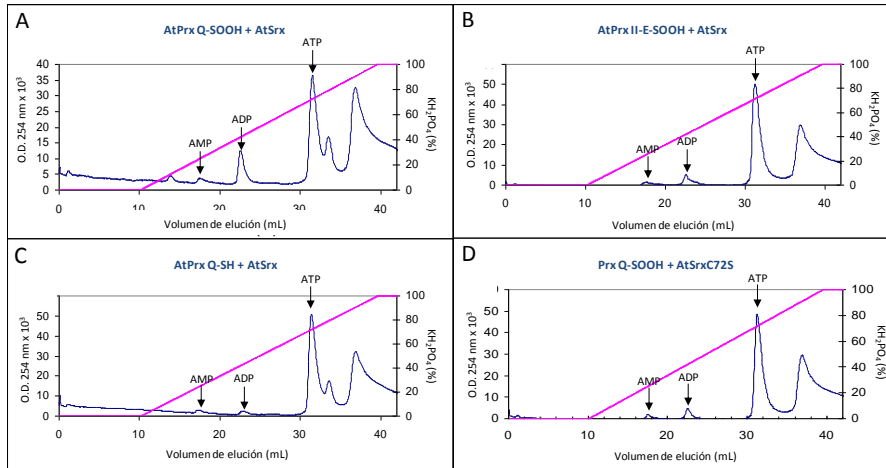
Como se puede observar en la gráfica de la figura 59, las Prxs cloroplastídicas en su forma reducida, presentan actividad peroxidasa, haciendo eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del medio de reacción. En ausencia de Prxs (controles), no se observó reducción del peróxido de hidrógeno. En presencia de Prx Q se observó un incremento en la reducción, dependiente de la concentración de Prx. Las formas sulfínicas (sobreoxidadas) de las Prxs eran inactivas, siendo incapaces de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en el medio de reacción, que se encontraba en los mismos niveles que en ausencia de Prx. Tras la incubación de las Prxs-SO<sub>2</sub>H con la AtSrx durante la noche, la 2-Cys Prx recuperó, como era previsible, el total de su actividad. De forma similar le sucedió a la Prx Q tras ser regenerada por la Srx. En cambio, la Prx IIE no fue regenerada en presencia de Srx en la mezcla de reacción.



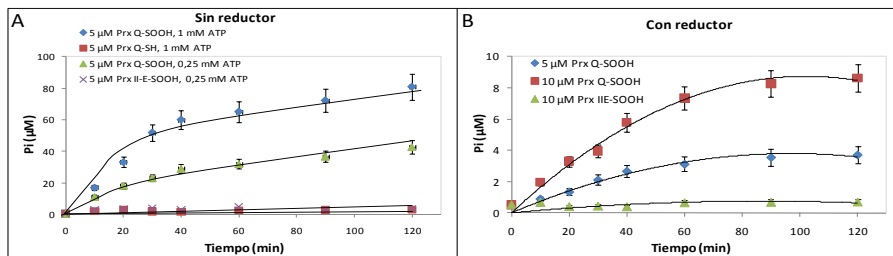
**Figura 60.- Actividad peroxidasa de las Prxs cloroplásticas reducidas (Prxs-SH), sobreoxidadas (Prxs-SO<sub>2</sub>H) y sobreoxidadas incubadas con AtSrx “overnight”.** El medio de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Srx 1 µM y las concentraciones indicadas de Prxs. El control se realizó en ausencia de ATP (- ATP).

Para confirmar la actividad de la AtSrx frente a la AtPrx Q-SO<sub>2</sub>H y no frente a la AtPrx IIE-SO<sub>2</sub>H, se realizó una separación cromatográfica, en sistema de FPLC, del ATP-ADP generados por medio de la columna MonoQ tras 3 h de reacción (Fig. 57). La reducción de la forma sulfínica de la Prx Q por medio de la Srx, generó la producción de ADP que se observa en el pico cromatográfico correspondiente al mismo (Fig. 61.A). En cambio, el pico que se genera para el ADP como consecuencia de la incubación de la forma sulfínica de la Prx IIE con la Srx es menor (Fig. 61.B), siendo similar al obtenido con los controles realizados con la forma reducida de la Prx Q o utilizando el mutante C72S-AtSrx.

Las cinéticas de actividad de la AtSrx con las Prx Q y Prx IIE fueron determinadas mediante la cuantificación del P<sub>i</sub> liberado, tanto en ausencia de reductor (Fig. 62.A) como en presencia de DTT (Fig. 62.B).



**Figura 61.- Análisis en FPLC del ADP generado por la actividad de la Srx tras 3 h de reacción. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5),  $MgCl_2$  1 mM, ATP 100  $\mu$ M, AtSrx 15  $\mu$ M y AtPrx 30  $\mu$ M. A. En presencia de la forma sulfínica de la AtPrx Q. B. Con la forma sulfínica de la AtPrx IIE. C. Con la forma reducida de la AtPrx Q. D. Con la forma sulfínica de la Prx Q en presencia del mutante C72S-AtSrx.**

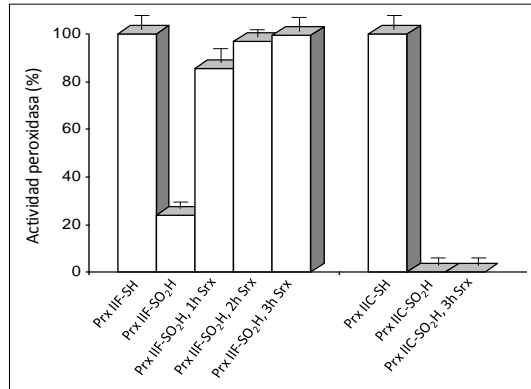


**Figura 62.- Actividad enzimática de la AtSrx (1  $\mu$ M) con AtPrx Q y AtPrx IIE cloroplásticas, determinada mediante cuantificación del  $P_i$  liberado. A. En ausencia de reductor. Como control, se utiliza la forma reducida de la Prx Q. B. En presencia de reductor (DTT 10 mM).**

La actividad de la Srx con la forma sulfínica de la Prx IIE, no produce liberación de  $P_i$  en ausencia o presencia de reductor, por lo que se confirma que la Prx IIE-SO<sub>2</sub>H no es reducida enzimáticamente por la Srx. En cambio, la Srx es capaz de reducir la forma sulfínica de la Prx Q, liberando elevada concentración de  $P_i$  en ausencia de reductor, la cual es mayor cuanto mayor es la concentración de sustrato. En presencia de DTT, la concentración máxima de  $P_i$  alcanzada corresponde a la concentración de Prx Q-SO<sub>2</sub>H.

### 13.2.2.- No cloroplastídicas

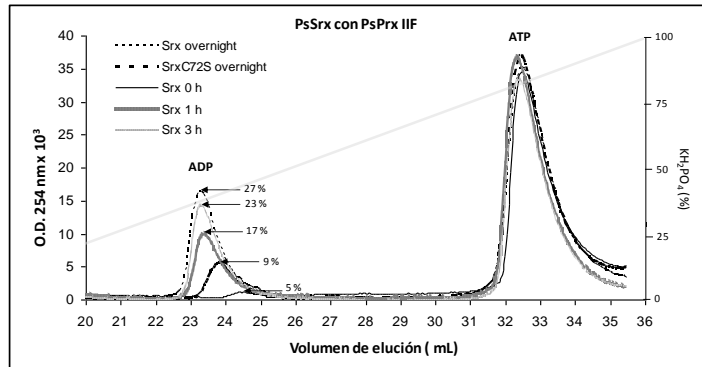
Las formas sulfínicas de las Prxs vegetales de tipo II no cloroplastídicas, al igual que las cloroplastídicas, se inactivan por sobreoxidación. Sin embargo, mientras que la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H mitocondrial puede ser reducida en presencia de Srx, ATP y Mg<sup>2+</sup>, la Prx IIC-SO<sub>2</sub>H citosólica no es reducida mediante este sistema enzimático (Fig. 63).



**Figura 63.- Actividad peroxidasa de las Prxs no cloroplastídicas PsPrx IIF y PsPrx IIC en sus formas reducidas, sobreoxidadas y tras ser incubadas con la PsSrx. La mezcla de reacción en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, Prxs 5 μM y Srx 1 μM.**

Tras 3 h de reacción, la PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H recuperó el total de su actividad peroxidasa, alcanzando la misma actividad que su forma reducida, como consecuencia de la reducción por parte de la Srx de guisante. En cambio, tras ese mismo tiempo de incubación, la forma inactiva Prx IIC-SO<sub>2</sub>H continuó siendo inactiva. Por tanto, la PsSrx reduce la forma sulfínica de la Prx IIF, pero no de la Prx IIC.

Para confirmar dicho proceso de reducción por parte de la Srx con una Prx atípica mitocondrial, se estudió la generación de ADP, mediante análisis cromatográfico, de la mezcla de reacción de la forma sulfínica de la Prx IIF con la Srx de guisante (Fig. 64).

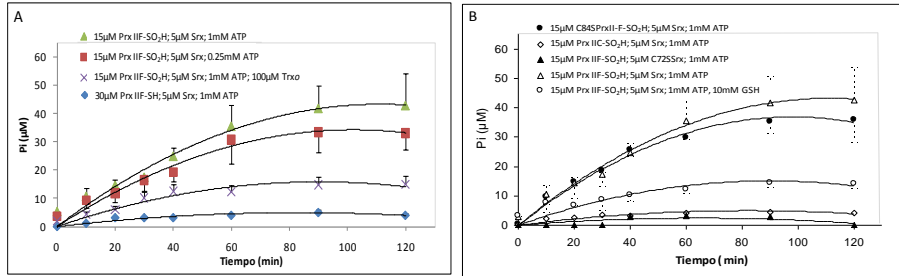


**Figura 64.- Análisis en FPLC del ADP generado por la actividad de la Srx con la Prx IIF.** La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 100 μM, AtSrx 15 μM y AtPrx 30 μM. Como control se utilizó el mutante C72S-AtSrx. Aliquotas de 200 μL fueron inyectadas a los tiempos de reacción indicados para su separación en columna MonoQ.

Se observa una generación de ADP que se va incrementando en función del tiempo de incubación de la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H con la Srx. Dicha producción se debe a la actividad de la Srx en su proceso de reducción de la Prx IIF sobreoxidada. En cambio, el mutante C72S-AtSrx, tras una noche de incubación en el medio de reacción con la forma sulfínica de la Prx IIF, no llegó a generar ADP.

La cinética enzimática en el proceso de reducción de la forma sulfínica de la PsPrx IIF por medio de la PsSrx, se realizó mediante la determinación del P<sub>i</sub> liberado, ensayando diferentes concentraciones de enzima y sustratos, en ausencia o presencia de agentes reductores fisiológicos que pueden encontrarse en la mitocondria vegetal (Trx<sub>o</sub> mitocondrial o GSH) para completar el ciclo (Fig. 65).

Las curvas de actividad de la PsSrx con la PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H, demostraron un comportamiento similar que al resto de Prxs. La actividad es dependiente de la concentración de sustratos (ATP y Prx). En ausencia de reductor, la concentración generada de P<sub>i</sub> es mayor que en su presencia. Dicho reductor fisiológico puede ser tanto GSH como Trx<sub>o</sub>. El mutante C72S-AtSrx confirma que dicha actividad es debida a la Srx, mientras que el mutante C84S-PsPrx IIF, al presentar actividad como la Prx IIF “wild type”, demuestra que la cisteína peroxidable es la esencial para la formación de la forma sulfínica y su reducción posterior por parte de la Srx.

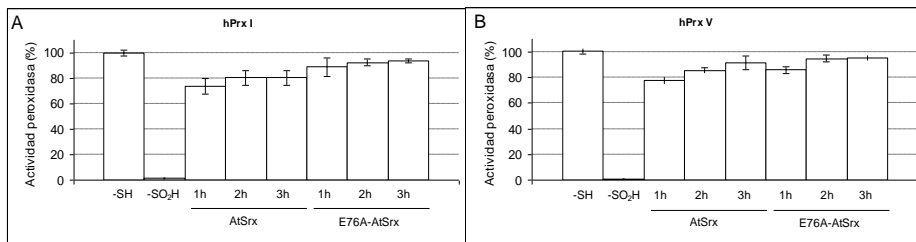


**Figura 65.- Actividad enzimática de la PsSrx con la PsPrx IIF determinada mediante cuantificación del  $P_i$  liberado. A. Con Prx IIF-SO<sub>2</sub>H 15  $\mu$ M, Srx 5  $\mu$ M y ATP 0.25 ó 1 mM, en ausencia o presencia de reductor (100  $\mu$ M Trx). Como control, se utilizó la forma reducida de la Prx IIF. B. Con Prx IIF-SO<sub>2</sub>H (o su mutante C84S), 15  $\mu$ M, Srx 5  $\mu$ M y ATP 1 mM, en ausencia o presencia de reductor (GSH 10 mM). Como control se utilizó el mutante C72S-AtSrx.**

### 13.3.- Cinéticas con Prxs humanas

Debido a que la Srx de plantas no es exclusiva de cloroplasto y que la Srx humana puede transportarse a la mitocondria bajo determinadas condiciones (Noh *et al.*, 2009) y a que la Srx vegetal reduce la forma sulfínica de la Prx atípica mitocondrial, decidimos abordar el estudio de forma similar con las Prxs humanas I y V, típica y atípica respectivamente.

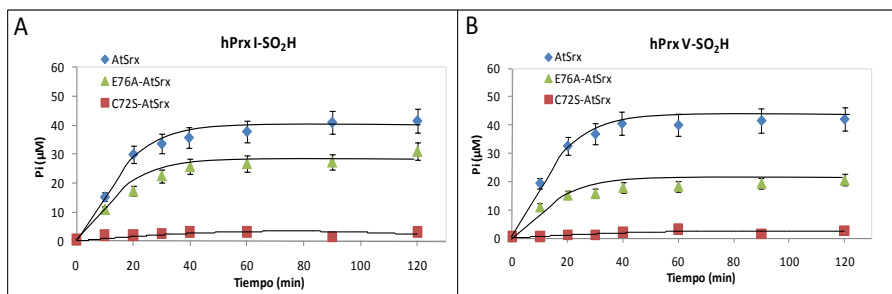
La forma sulfínica de las hPrxs I y V se obtuvo mediante el tratamiento de reducción y oxidación indicado en *Material y métodos* y se comprobó la inactivación por sobreoxidación de estas enzimas (Fig. 66).



**Figura 66.- Actividad peroxidasa de las Prx I y V humanas en sus formas reducidas, sobreoxidadas y tras ser incubadas con la PsSrx. La mezcla de reacción en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 1 mM, DTT 10 mM, Prxs 5 $\mu$ M y Srx 1  $\mu$ M.**

La forma sulfínica obtenida de estas Prxs humanas sufrió la pérdida de actividad peroxidasa, que tras ser incubadas varias horas en medio de reacción con ATP y  $Mg^{2+}$ , recuperó la mayor parte de su actividad peroxidasa debido a su reducción *in vitro* por la AtSrx. El mutante E76A-AtSrx, que presenta mutado el ácido aspártico ausente en la hSrx, se ensayó de la misma manera, resultando también activo. En este ensayo de actividades interespecies, era de esperar la regeneración de la hPrx I, pero sorprendentemente resultó también activa la Srx de plantas con la hPrx V-SO<sub>2</sub>H.

Para confirmar este hecho novedoso, se realizaron las cinéticas de actividad de la AtSrx, E76A-AtSrx y C72S-AtSrx con la forma sulfínica de las hPrxs I y V mediante la determinación del P<sub>i</sub> liberado (Fig. 67). La AtSrx presenta unas curvas de actividad *in vitro* con las hPrxs similar a las Prxs de las de plantas, mostrando una liberación de P<sub>i</sub> elevada en ausencia de reductor. La AtSrx “wild type” reduce de forma similar a la hPrx I-SO<sub>2</sub>H que a la hPrx V-SO<sub>2</sub>H, aunque el mutante E76A-AtSrx posee un 80% de actividad con la hPrx I y un 50% con la hPrx V.

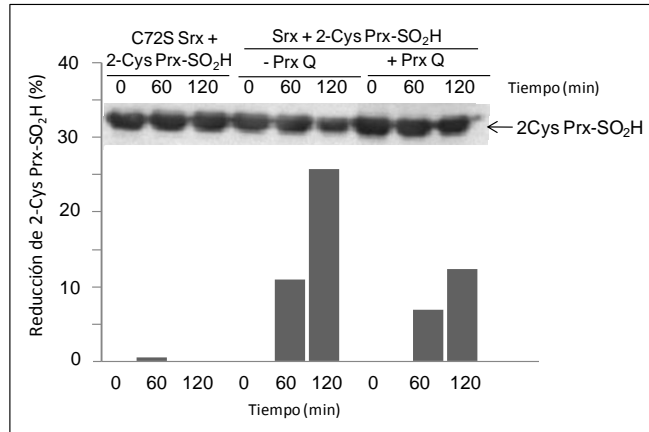


**Figura 67.- Actividad enzimática de la AtSrx con las hPrxs determinada mediante cuantificación del P<sub>i</sub> liberado. A.** Con hPrx I-SO<sub>2</sub>H 15 µM, Srx (o sus mutantes) 5 µM y ATP 1 mM. Como control, se utilizó C72S-AtSrx. **B.** Con hPrx V-SO<sub>2</sub>H 15 µM, Srx (o sus mutantes) 5 µM y ATP 1 mM, en ausencia o presencia de reductor (GSH 10 mM). Como control, se utiliza el mutante C72S-AtSrx.

### **13.4.- Preferencia catalítica de la Srx sobre las Prxs**

Para realizar el estudio preferencial de la actividad Srx sobre las diferentes formas sobreoxidadas de las Prxs, se realizó un análisis de imagen del Western blot frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx típica en ausencia o presencia de otra Prx atípica en su forma sulfínica.

De esta manera, se estudió la preferencia de la AtSrx sobre las Prxs cloroplásticas susceptibles de ser sobreoxidadas de forma reversible (2-Cys Prx y la Prx Q) (Fig. 68).



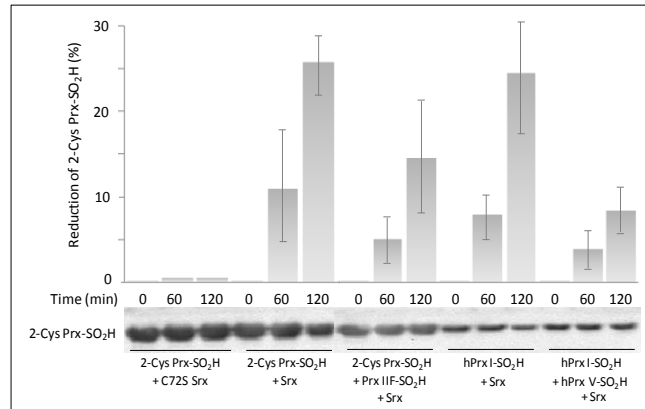
**Figura 68.- Actividad catalítica preferencial de la AtSrx con las Prxs cloroplásticas At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H Vs AtPrx Q-SO<sub>2</sub>H, mediante análisis de imagen del Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx. La mezcla de reacción contenía 10  $\mu$ M de cada enzima, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y GSH 10 mM.**

Se observa como en presencia de la AtPrx Q-SO<sub>2</sub>H, la reducción de la forma sulfínica de la At-2-Cys Prx disminuye aproximadamente a la mitad. Como control, se incubó el mutante C72S-AtSrx, que no produce reducción de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, en la misma mezcla de reacción.

De forma similar, se realizó el ensayo de la PsSrx, por análisis del Western blot, con la Ps-2-Cys-Prx-SO<sub>2</sub>H o hPrx I-SO<sub>2</sub>H en ausencia o presencia de las Prxs mitocondriales Ps-Prx IIF-SO<sub>2</sub>H o hPrx V-SO<sub>2</sub>H respectivamente (Fig. 69).

Como se observa en el gráfico, la presencia de las Prxs mitocondriales junto a las Prxs-SO<sub>2</sub>H típicas disminuyen su reducción en aproximadamente un 50%. Como control se realizó la actividad, a los mismos tiempos, con el mutante C72S-AtSrx, que no produce disminución en la intensidad de la banda de la Prx-SO<sub>2</sub>H.

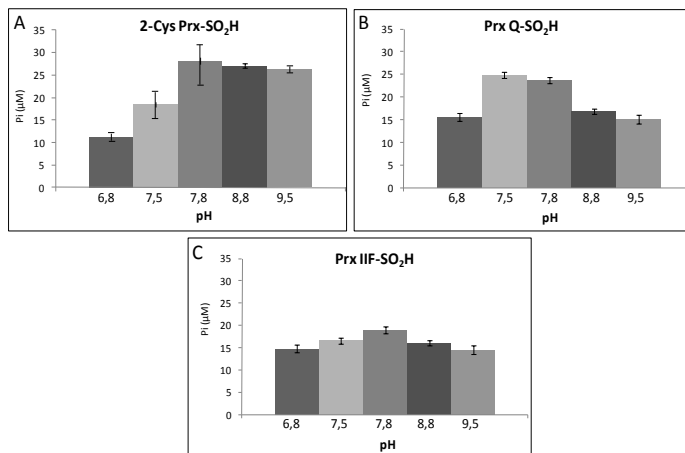




**Figura 69.- Actividad catalítica preferencial de la PsSrx con la Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H frente a la PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H y la hPrx I-SO<sub>2</sub>H frente a la hPrx V-SO<sub>2</sub>H, mediante análisis de imagen del Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx. La mezcla de reacción contenía 10  $\mu$ M de cada enzima, ATP 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y GSH 10 mM.**

### 13.5.- Eficiencia catalítica a diferentes pH

Para comprobar el comportamiento catalítico de la Srx en función del pH y determinar las condiciones óptimas para la reducción de la forma sulfínica de las diferentes Prxs, se determinó el P<sub>i</sub> generado tras 2 h de reacción incubada a diferentes pH del tampón (Fig. 70).

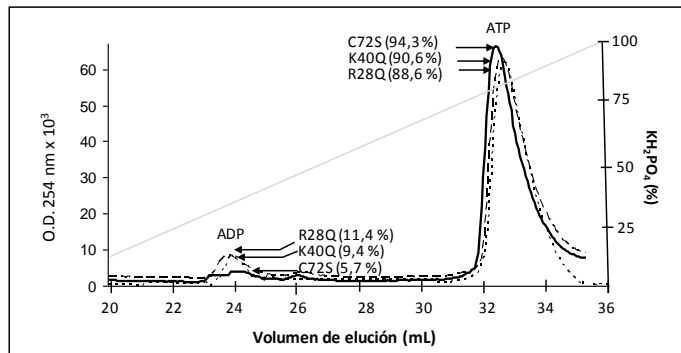


**Figura 70.- Actividad Srx a diferentes pH mediante determinación del P<sub>i</sub> liberado tras 2 h de reacción. Las mezclas de reacción en 50 mM Tris-HC, la los pH indicados, contenía Srx 1  $\mu$ M, Prxs-SO<sub>2</sub>H 5  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ATP 0.25 mM. A. Con la Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H. B. Con la AtPrx Q-SO<sub>2</sub>H. C. Con la PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H.**

## **14.- Actividad enzimática de los mutantes de la AtSrx**

El análisis de actividad de las diferentes formas mutadas de la AtSrx en aminoácidos concretos, pueden ayudar a la comprensión del papel de estos residuos en la reducción dependiente de ATP de la forma sulfínica de las Prxs.

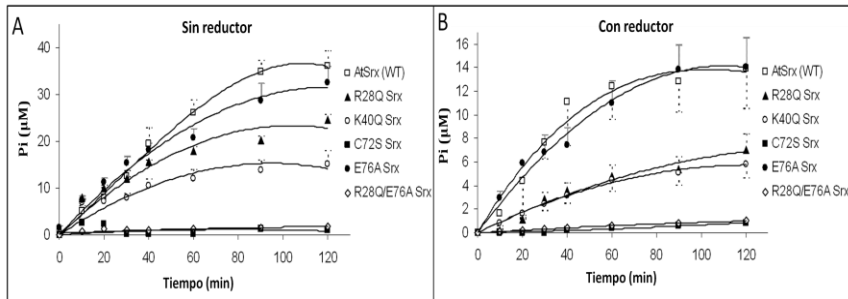
Mediante análisis cromatográfico en columna MonoQ, se observó el ADP formado en la reacción de reducción de la At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H por medio del C72S-AtSrx, R28Q-AtSrx y K40Q-AtSrx (Fig. 71).



**Figura 71.- Análisis en FPLC del ADP generado por la actividad de mutantes de la Srx tras 3 h de incubación.** La mezcla de reacción contenía en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ATP 100 μM, C72S-AtSrx, K40Q-AtSrx o R28Q-AtSrx 15 μM y At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H 30 μM. A los tiempos indicados, 200 μL de la mezcla de reacción fueron inyectados para la separación en columna MonoQ.

En el gráfico se puede observar como la mutación de la cisteína 72 por serina en la AtSrx provoca la inactivación de la enzima, incapaz de generar ADP por hidrólisis del ATP. En el mutante de la lisina 40 por glutamina se produce un pico de ADP menor que con el mutante de la arginina 28 por glutamina, lo que hace pensar en un comportamiento de actividad diferente entre ambos mutantes con actividad parcial, en comparación con la AtSrx “wild type” (Fig. 57).

Mediante la determinación colorimétrica del P<sub>i</sub> liberado, se analizan las curvas de actividad de los 5 mutantes de la AtSrx obtenidos por mutagénesis dirigida en ausencia (Fig. 72.A) o presencia (Fig. 72.B) de agente reductor.



**Figura 72.- Actividad enzimática de los mutantes de la AtSrx determinada mediante cuantificación del P<sub>i</sub> liberado. La mezcla de reacción contiene At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H 15 μM, AtSrx o sus mutantes 5 μM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ATP 0.25 mM. A. En ausencia de agente reductor. B. En presencia de GSH 10 mM.**

La liberación de P<sub>i</sub> alcanzó, en el caso del mutante E76A-AtSrx, una concentración final similar a la “wild type” (AtSrx WT), tanto con GSH (14 μM) como sin reductor (35 μM). Sin embargo, tanto el mutante de la C72S como el doble mutante R28Q/E76A, resultaron inactivos. El mutante simple R28Q-AtSrx conservó alrededor de un 60% de la actividad, tanto en ausencia como en presencia de reductor, mientras que el K40Q-AtSrx presentó un 40% de la actividad de la AtSrx WT.

## **15.- Determinación de parámetros cinéticos de la Srx**

La actividad de la Srx de guisante y *A. thaliana* se cuantificó con el método colorimétrico determinando el P<sub>i</sub> liberado en los primeros 5-10 min. de reacción. De esta manera, se determinaron los parámetros cinéticos para cada uno de los sustratos (Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP), así como para cada una de las Prxs vegetales cuya sobreoxidación es reversible a través de la actividad de la Srx (Tabla 14).

Las Srxs vegetales poseen unos parámetros de K<sub>m</sub> similares a la hSrx, con una cinética lenta de reducción de la forma sulfínica de las Prxs. Para ambos sustratos (Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP), los valores fueron del mismo orden, incluso para los diferentes tipos de Prxs y especies. En general, la Srx de plantas posee una K<sub>m</sub> menor para el ATP que para la forma sulfínica de la 2-Cys Prx, lo que indica una mayor afinidad por el ATP. En cambio, en el caso de la PsSrx se observó una mayor afinidad por la PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H. En algunos

casos, la  $k_{cat}/K_m$  con el ATP es del orden de 10 veces menor que para la Prx-SO<sub>2</sub>H.

Enzima	Substrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	Referencia
hSrx	PrxI-SO <sub>2</sub> H	-	0.1-0.18	-	Chang <i>et al.</i> , 2004
	ATP	30	0.2-0.5	-	Jeong <i>et al.</i> , 2006
AtSrx	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	79	0.662	$8.38 \times 10^{-3}$	Iglesias-Baena <i>et al.</i> ; 2010
	ATP	29	0.025	$8.62 \times 10^{-4}$	
AtSrx	Ps-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	71	0.654	$9.21 \times 10^{-3}$	
	ATP	23	0.020	$8.69 \times 10^{-4}$	
AtSrx	At-Prx Q-SO <sub>2</sub> H	85	0.224	$2.64 \times 10^{-3}$	
	ATP	45	0.108	$2.40 \times 10^{-3}$	
PsSrx	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	14	0.017	$1.21 \times 10^{-3}$	
PsSrx	Ps-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	80	0.702	$8.77 \times 10^{-3}$	Iglesias-Baena <i>et al.</i> ; 2010 (enviado)
	ATP	7.5	0.020	$2.67 \times 10^{-3}$	
PsSrx	Ps Prx IIF-SO <sub>2</sub> H	17	0.195	$11.55 \times 10^{-3}$	
	ATP	33	0.019	$5.76 \times 10^{-4}$	

**Tabla 14.- Parámetros cinéticos de la Srx de *A. thaliana* y guisante con cada uno de sus substratos.** Los datos fueron la media de los valores obtenidos por la medida del  $P_i$  a los 5 min. de reacción conteniendo Srx 30  $\mu\text{M}$ , Prx-SO<sub>2</sub>H 0-40  $\mu\text{M}$ , MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ATP 0-500  $\mu\text{M}$  en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).

Con objeto de conocer la importancia de los residuos mutados en las Srxs de *A. thaliana* que conservan actividad, se determinaron los parámetros cinéticos y el porcentaje relativo al coeficiente  $k_{cat}/K_m$  de la AtSrx “wild type” para cada proteína en su proceso de reducción de la At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H (Tabla 15). El mutante R28Q-AtSrx conserva un 20% de la  $k_{cat}/K_m$  para ambos substratos, mientras que el mutante K40Q-AtSrx mantiene un 34% y 14% del coeficiente para la At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP respectivamente. Por otro lado, el mutante E76A-AtSrx posee unas constantes cinéticas idénticas a la AtSrx “wild type” (WT).

Enzima	Substrato	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ (%)
AtSrx (WT)	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H ATP	$1.39 \times 10^2$ $0.14 \times 10^2$	100 100
R28Q-AtSrx	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H ATP	$0.27 \times 10^2$ $0.03 \times 10^2$	19 21
K40Q-AtSrx	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H ATP	$0.47 \times 10^2$ $0.02 \times 10^2$	34 14
E76A-AtSrx	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H ATP	$1.46 \times 10^2$ $0.16 \times 10^2$	105 114

**Tabla 15.- Parámetros cinéticos de la AtSrx y sus mutantes con cada uno de sus substratos.** Los datos fueron la media de los valores obtenidos por la medida del  $P_i$  a los 5 min. de reacción conteniendo AtSrx 30  $\mu$ M, At-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H 0-40  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y ATP 0-500  $\mu$ M en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5).

## **16.- Valores de pK<sub>a</sub> de la Srx**

Mediante la predicción de los valores de pK<sub>a</sub> de la cisteína catalítica y de la histidina adyacente, así como la influencia de los residuos cercanos a los mismos, se puede determinar la reactividad de sus cadenas laterales para ayudar a entender el mecanismo de acción de la Srx y el diferente comportamiento entre la Srx humana y la de plantas.

Los valores obtenidos para la hSrx basados en la estructura proteica de la misma (Tabla 16) le asignan un pK<sub>a</sub> para su cisteína catalítica (Cys 99) de 4.98. Dicho valor de pK<sub>a</sub> anómalo para la cisteína, cuyo valor estándar es 9.0, hace a dicha cisteína especialmente reactiva, siendo los puentes de hidrógeno formados con la arginina 51 y la serina 55 los principales responsables de la elevada nucleofilia de la cisteína 99.

Residuo	pK <sub>a</sub>	Localización	Efectos de desolvatación		Puentes de hidrógeno de cadenas laterales		Puentes de hidrógeno centrales	
			Masivo	Local				
Cys 99	4.98	Superficie	0.00 363	0.00 0	-1.46 -1.50	Ser 55 Arg 51	-0.73 -0.33	Val 56 Cys 99
His 100	6.29	Superficie	0.00 278	-0.21 3	0.00	-	0.00	-

**Tabla 16.- Valores de pK<sub>a</sub>, efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno de la hSrx.** Predicciones de PROPKA para la cisteína catalítica y la histidina cercana basado en el 1xw3 del PDB.

Para conocer la existencia de otros residuos involucrados en la activación nucleofílica de la cisteína 72, se obtuvo un modelo de estructura terciaria de la AtSrx proporcionado por el servidor Geno3D. Los dos mejores modelos obtenidos fueron basados en las coordenadas de la hSrx (PDB 1xw3) y su mutante de la cisteína 99 (PDB 3cyi). La predicción de los valores de  $pK_a$  para la cisteína 72 de dichos modelos de la AtSrx fueron 6.46 y 4.29 respectivamente. El análisis de los residuos involucrados en la activación de la cisteína 72 (Tabla 17) identifica a la arginina 28 como el principal responsable del cambio en el  $pK_a$  para el modelo basado en la hSrx.

Residuo	$pK_a$	Localización	Efectos de desolvatación		Puentes de hidrógeno de cadenas laterales	Puentes de hidrógeno centrales
			Masivo	Local		
Cys 72	6.46	Superficie	0.00 358	0.07 1	-1.60 Arg 28 0.00 - 0.00 -	-0.36 Thr 33 -0.62 Cys 72 -0.03 His 73
His 73	6.36	Superficie	0.00 295	-0.14 2	0.00 -	0.00 -

**Tabla 17.- Valores de  $pK_a$ , efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno del modelo de estructura terciaria de la AtSrx basado en el 1xw3 del PDB. Predicciones de PROPKA para la cisteína catalítica y la histidina cercana.**

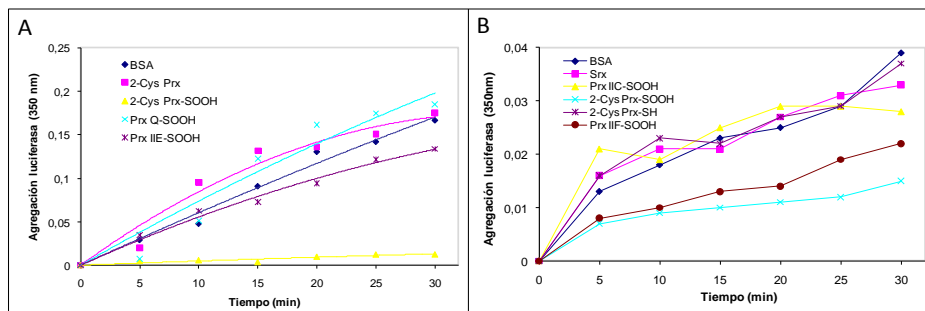
En cambio, el modelo basado en el C99S-hSrx (Tabla 18) muestra un comportamiento diferente, siendo la histidina 73 y treonina 33 los principales residuos que contribuyen a un bajo  $pK_a$  de la cisteína 72. En el modelo basado en las coordenadas de este mutante de la hSrx, la influencia del grupo -SH de la cisteína sobre la histidina 73 se hace apreciable, al ser responsable de un  $pK_a$  de 7.22 para la histidina, cuando el valor normal suele ser cercano a 6.5.

Residuo	$pK_a$	Localización	Efectos de desolvatación		Puentes de hidrógeno de cadenas laterales	Puentes de hidrógeno centrales
			Masivo	Local		
Cys 72	4.29	Superficie	0.00 337	0.14 2	-1.60 Thr 33 0.00 - 0.00 -	-0.81 Thr 33 -0.78 Cys 72 -1.67 His 73
His 73	7.22	Superficie	0.00 293	-0.07 1	0.79 Glu 76	0.00 -

**Tabla 18.- Valores de  $pK_a$ , efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno del modelo de estructura terciaria de la AtSrx basado en el 3cyi del PDB. Predicciones de PROPKA para la cisteína catalítica y la histidina cercana.**

## 17.- Actividad chaperona

La pérdida de la actividad peroxidasa de las peroxirredoxinas en su forma de ácido sulfínico, puede conllevar a la ganancia de actividad chaperona que presentan complejos de alto peso molecular cuando están sobreoxidados. Esto se ha descrito en plantas para la 2-Cys Prx (Kim *et al.*, 2009), pero no se ha estudiado el papel de la Srx en el control de la actividad chaperona ni en esta Prx, ni en otras retrorreducidas por la Srx. Por ello, decidimos abordar el estudio de la actividad chaperona, analizada mediante la prevención de la agregación térmica de la luciferasa, ensayando la 2-Cys Prx reducida, sobreoxidada y tras retrorreducción desde su forma sulfínica por medio de la Srx. Además, se comprobó la actividad chaperona de la forma sulfínica de la Prx Q, Prx IIE, Prx IIC y Prx IIF (Fig. 73).

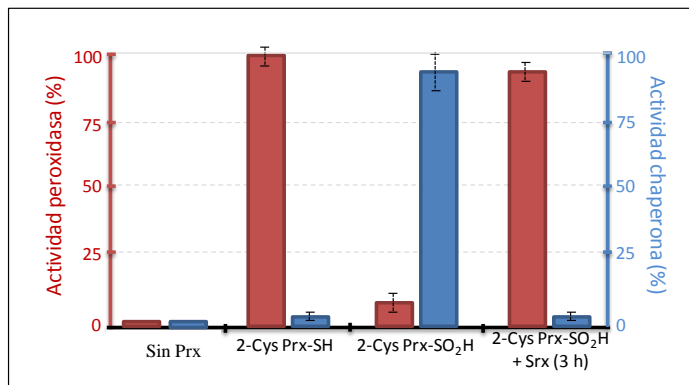


**Figura 73.- Actividad chaperona de las Prxs y Srxs vegetales.** **A.** De la forma sulfínica de las Prxs cloroplastídicas de *A. thaliana* (At-2-Cys Prx, AtPrx Q y AtPrx IIE) y de la At-2-Cys Prx reducida. **B.** De las Prxs no cloroplastídicas (PsPrx IIC y PsPrx IIF), de la forma sulfínica de la Ps-2-Cys Prx (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) y tras ser incubada por la noche con la Srx de guisante (2-Cys Prx-SH), así como de la Srx de guisante. Como control, se utilizó BSA.

De las Prxs ensayadas presentes en el cloroplasto de *A. thaliana* (Fig. 72.A), tan sólo la forma de ácido sulfínico de la 2-Cys Prx previene la agregación térmica de la luciferasa, presentando una elevada actividad chaperona. En cambio, la forma reducida de la 2-Cys Prx, no presenta actividad chaperona. De la misma manera, se produce agregación de la luciferasa en presencia de la forma sobreoxidada de la Prx Q y Prx IIE, de forma similar a como sucede en presencia de BSA.

De los estudios de actividad chaperona con Prxs no cloroplastídicas de guisante en su forma sobreoxidada (Fig. 69.B), la Prx IIC citosólica no presenta actividad chaperona, de forma similar al BSA. En cambio, la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H mitocondrial previene la agregación térmica de la luciferasa de forma similar a la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H. Esta última, al ser retrorreducida totalmente por la PsSrx en presencia de ATP y Mg<sup>2+</sup>, pierde su actividad chaperona. Como control, se analizó por separado la posible actividad chaperona de la Srx, llegando a la conclusión de que no protege de la agregación térmica de la luciferasa.

Para confirmar el papel de la Srx en la regulación de la actividad chaperona/peroxidasa de la Prx-SO<sub>2</sub>H/Prx-SH, se determinaron ambas actividades enzimáticas de la 2-Cys Prx en su forma reducida, sobreoxidada y tras reducción de la forma sulfínica por la Srx (Fig. 74).



**Figura 74.- Actividad peroxidasa y chaperona de la At-2-Cys Prx reducida, sobreoxidada y tras retrorreducción por la AtSrx.** Determinaciones de la actividad peroxidasa dependiente de DTT y de la actividad chaperona por medida de la agregación térmica de la luciferasa. Las mezclas de reacción contenían 2-Cys Prx reducida (-SH) o sobreoxidada (-SO<sub>2</sub>H) 1 μM, y tras 3 h de incubación con AtSrx 1 μM en medio de reacción conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1mM y ATP 0.25 mM. Como control, se determinaron ambas actividades en ausencia de Prx.

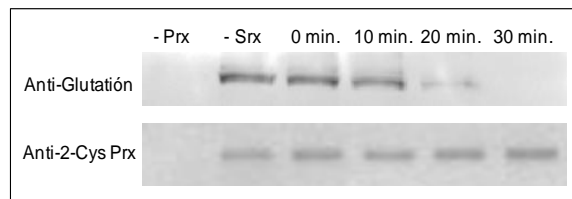
La forma reducida de la Prx (2-Cys Prx-SH) presenta actividad peroxidasa y carece de actividad chaperona. Estas actividades se invierten tras sobreoxidación de la Prx hasta la forma sulfínica (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H), presentando actividad chaperona y perdiendo su actividad peroxidasa. Tras incubación de esta forma sobreoxidada de la Prx con Srx, se recupera la actividad peroxidasa y se pierde la actividad chaperona.



## **18.- Actividad desglutacioniladora o eliminadora de glutatión**

La sulfirredoxina humana posee, además de su actividad ácido sulfínico reductasa de Prxs, una actividad desglutacioniladora de la 2-Cys Prx glutacionilada. La hSrx revierte la modificación post-traducciona de proteínas glutacioniladas, como la actina o la protein tirosin fosfatasa 1B (Findlay *et al.*, 2006). Su substrato, la 2-Cys Prx, puede unirse a GSH y ser revertida en un proceso catalizado por la hSrx (Park *et al.*, 2009)

En cambio, en vegetales no se ha estudiado dicha actividad de la Srx, por lo que hemos abordado su estudio mediante análisis por Western blot, utilizando el anticuerpo específico frente al GSH. Para ello, se incubó previamente la 2-Cys Prx con GSSG 10 mM a 4°C en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7.5) conteniendo NaCl 100 mM. Posteriormente se incubó a 37°C con una concentración equimolar de la AtSrx y se determinaron los niveles de Prx unida a GSH a diferentes tiempos (Fig. 75).



**Figura 75.- Actividad desglutacioniladora de la Srx frente a la 2-Cys Prx.** Análisis por Western blot frente a la GSH-proteína tras incubación de la At-2-Cys Prx 40  $\mu$ M con GSSG 10 mM a 4°C durante la noche, e incubación a diferentes tiempos con AtSrx 40  $\mu$ M. Como control se analizó la señal en ausencia de ambas enzimas. Como control de carga, se determinó de forma paralela la señal con el anticuerpo específico frente a la 2-Cys Prx total.

Tal y como se observa en el Western blot, la Srx de *A. thaliana* cataliza la desglutacionilación de la 2-Cys Prx glutacionilada, eliminando en 30 min. todo el GSH unido a la Prx.

## **19.- Interacción proteica del sistema Prx-Srx-Trx**

Para el estudio de la interacción proteína-proteína del sistema enzimático formado por las diferentes Prxs en su forma sulfínica, la Srx y la Trx como reductor final que completa el ciclo, se abordó, desde el punto de

vista proteómico y termodinámico, la formación de cada uno de los heterocomplejos enzimáticos.

### **19.1.- Heterocomplejo Prxs-Srxs**

El análisis de los complejos de la Srx con sus diferentes substratos (Prxs-SO<sub>2</sub>H) se estudió mediante Western blot de los “pull-down” de la columna de Ni<sup>2+</sup> y se analizaron mediante ITC las constantes termodinámicas de cada complejo.

#### **19.1.1.- 2-Cys Prx y Srx de *A. thaliana* y guisante**

El primero de los heterocomplejos analizados y estudiados en profundidad, fue el formado por la Srx y la 2-Cys Prx cloroplastídica.

##### **19.1.1.1.- Análisis proteómico**

Debido a la presencia de la cola de histidinas (His-tag) en el extremo amino de la Srx recombinante de guisante, esta queda retenida en la matriz de Ni-sepharosa. Antes de ser eluída con imidazol, se incubó con la forma sulfínica o reducida de la 2-Cys Prx de guisante. De esta manera, tras la elución se analizó, mediante Western blot, utilizando los anticuerpos específicos frente a ambas enzimas (Fig. 76).

<b>His-tag PsSrx</b>	-	+	+	+	+
<b>Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H</b>	+	-	+	+	-
<b>Ps-2-Cys Prx-SH</b>	-	-	-	-	+
<b>ATP</b>	-	-	-	+	-
<b>Anti - PsSrx</b>					
<b>Anti - Ps-2-Cys Prx</b>					

**Figura 76.- Caracterización de la interacción 2-Cys Prx / Srx mediante ensayo “pull-down”. Análisis por Western blot tras interacción en columna de Ni<sup>2+</sup> de la PsSrx con la Ps-2Cys Prx reducida y sobreoxidada, en presencia o ausencia de ATP 1 mM.**

El resultado muestra que la forma sulfínica de la Prx, en ausencia de Srx, no se fija a la matriz de Ni-Sepharosa, mientras que la Srx por sí sola queda retenida en la matriz y es detectada tras su elución. La forma sulfínica de la 2-Cys Prx se detecta al ser incubada en la matriz conteniendo fijada la Srx, tanto en presencia como en ausencia de ATP. En cambio, la forma reducida de la 2-Cys Prx no es detectada en el eluido tras ser fijada la Srx a la matriz.

### 19.1.1.2.- Parámetros termodinámicos

Para confirmar la formación del complejo específico de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx con la Srx de plantas, así como caracterizar termodinámicamente dicha interacción, se analizó, mediante el ITC, los diferentes valores de constante de disociación, entalpía, energía libre de Gibbs y entropía de los procesos entre la Srx y la 2-Cys Prx reducida o sobreoxidada de *A. thaliana* y de guisante (Tabla 19).

Jeringa	Célula	T <sup>a</sup> (°C)	K <sub>d</sub> (μM)	ΔG (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
AtSrx	At-2-Cys Prx-SH	25	-	3.67 ± 0.01	-3.01x10 <sup>-5</sup>	-12.2 ± 1.4
	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	25	7.32 x10 <sup>-5</sup>	-7.99 ± 0.03	9.01 ± 0.51	57.0 ± 1.7
PsSrx	Ps-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	25	3.03 x10 <sup>-6</sup>	-8.84 ± 0.05	8.92 ± 0.99	59.6 ± 1.0

**Tabla 19.- Parámetros termodinámicos de la interacción 2-Cys Prx / Srx.** Determinación mediante ITC de la interacción de la Srx con la 2-Cys Prx sulfínica de *A. thaliana* y guisante. Como control, se determinó la interacción de la AtSrx con la forma reducida de la At-2-Cys Prx.

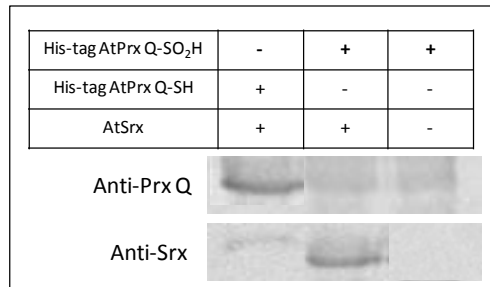
Mediante el análisis del ITC, no se observó interacción entre la forma reducida de la 2-Cys Prx y la Srx, donde no fue posible determinar la constante de disociación. Energéticamente, se trata de un proceso desfavorable (incremento de energía libre de Gibbs positivo). Sin embargo, los valores termodinámicos como resultado de la interacción de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx con la Srx, muy similares para las enzimas de *A. thaliana* y de guisante, indican que se trata de procesos energéticamente favorables (incremento de energía libre de Gibbs negativo).

### 19.1.2.- Prx Q y Srx de *A. thaliana*

Debido a que la actividad de la sulfirredoxina cloroplastídica podía reducir la forma sulfínica de la Prx Q, se estudió la interacción de ambas enzimas de *Arabidopsis thaliana*.

#### 19.1.2.1.- Análisis proteómico

Mediante Western blot del ensayo de “pull-down”, se realizó el análisis de la interacción entre ambas proteínas. Para ello, se fijó a la matriz de Ni-Sepharosa la AtPrx Q, que contiene en su extremo amino una cola de polihistidinas (His-tag). Se estudia la interacción de la AtSrx con la forma reducida y sobreoxidada, hasta la forma sulfínica, de la AtPrx Q (Fig. 77). A la Srx se le eliminó previamente la cola de polihistidinas mediante digestión con TEV.



**Figura 77.- Caracterización de la interacción Prx Q / Srx mediante ensayo “pull-down”. Análisis por Western blot tras interacción en columna de Ni<sup>2+</sup> de la His-tag AtPrxQ reducida (-SH) o sobreoxidada (-SO<sub>2</sub>H) con la AtSrx sin cola de histidinas (His-tag).**

De forma similar a como sucede con el complejo 2-Cys Prx / Srx, la forma sulfínica de la Prx Q interacciona con la Srx de *A. thaliana*. En cambio, la AtSrx no interacciona con la forma reducida de la 2-Cys Prx.

#### 19.1.2.2.- Parámetros termodinámicos

Mediante análisis en el ITC, se determinaron los valores termodinámicos de la interacción entre la Srx y la Prx Q de *A. thaliana*, tanto en su forma reducida como en su forma de ácido sulfínico (Tabla 20).

Jeringa	Célula	T <sup>a</sup> (°C)	K <sub>d</sub> (μM)	ΔG (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
AtSrx	AtPrx Q-SH	25	-	5.11 ± 0.04	-2.25x10 <sup>-5</sup>	-17.2 ± 1.2
	AtPrx Q-SO <sub>2</sub> H	25	4.85x10 <sup>-6</sup>	-8.38 ± 0.09	1.22 ± 0.06	32.2 ± 0.3

**Tabla 20.-** Parámetros termodinámicos de la interacción Prx Q / Srx. Determinación mediante ITC de la interacción de la Srx con la Prx Q sulfínica y reducida de *A. thaliana*.

Al analizar los valores termodinámicos de la interacción entre la Prx Q-SO<sub>2</sub>H y la Srx, se obtuvieron incrementos de entalpía y entropía positivos, mientras que para la energía libre de Gibbs fue negativa, constituyendo, por tanto un proceso favorable. En cambio, con la Prx Q reducida (Prx Q-SH), el sistema es energéticamente desfavorable (ΔG positivo).

### 19.1.3.- Prx IIF y Srx de guisante

Debido a la presencia de la Srx en mitocondrias y a la actividad de la misma para reducir la forma sulfínica de la Prx mitocondrial (Prx IIF), se estudió la interacción de ambas enzimas de guisante.

#### 19.1.3.1.- Análisis proteómico

Mediante Western blot del ensayo de “pull-down” mediante fijación de la PsSrx a la matriz de Ni-Sepharosa, se estudió si la PsPrx IIF reducida y sobreoxidada interaccionaban con ella para formar un heterocomplejo proteico, así como la implicación del ATP en el dicho proceso (Fig. 78).

His-tag PsSrx	-	+	+	+	+
PsPrx IIF-SO <sub>2</sub> H	+	-	+	+	-
PsPrx IIF-SH	-	-	-	-	+
ATP	-	-	-	+	-
Anti - PsSrx					
Anti - PsPrx IIF					

**Figura 78.-** Caracterización de la interacción Prx IIF / Srx mediante análisis “pull-down”. Análisis por Western blot tras interacción en columna de Ni<sup>2+</sup> de la PsSrx con la Ps-Prx IIF reducida y sobreoxidada, en presencia o ausencia de ATP 1 mM.

De forma similar a como sucede con el complejo 2-Cys Prx / Srx, se aprecia claramente que tras ser fijada la Srx a la columna, ésta interacciona con la Prx IIF mitocondrial cuando se encuentra en su forma sulfínica. Ni la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H por sí misma, ni la forma reducida de la misma, quedaron retenidas en la columna, ya que no interaccionan con la matriz. Además, se observó que la interacción formada entre la Srx y la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H es independiente del ATP.

### 19.1.3.2.- Parámetros termodinámicos

Mediante análisis en el ITC, se determinaron los valores termodinámicos de la interacción entre la Srx y la Prx IIF de guisante, tanto en su forma reducida como en su forma de ácido sulfínico (Tabla 21).

Jeringa	Célula	T <sup>a</sup> (°C)	K <sub>d</sub> (μM)	ΔG (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
PsSrx	PsPrx IIF-SH	25	-	4.16 ± 0.02	-2.50x10 <sup>-5</sup>	-14.2 ± 1.5
	PsPrx IIF-SO <sub>2</sub> H	25	2.85x10 <sup>-6</sup>	-8.80 ± 0.06	1.02 ± 0.06	33.0 ± 0.3

**Tabla 21.- Parámetros termodinámicos de la interacción Prx IIF / Srx. Determinación mediante ITC de la interacción de la Srx con la Prx IIF sulfínica y reducida de guisante.**

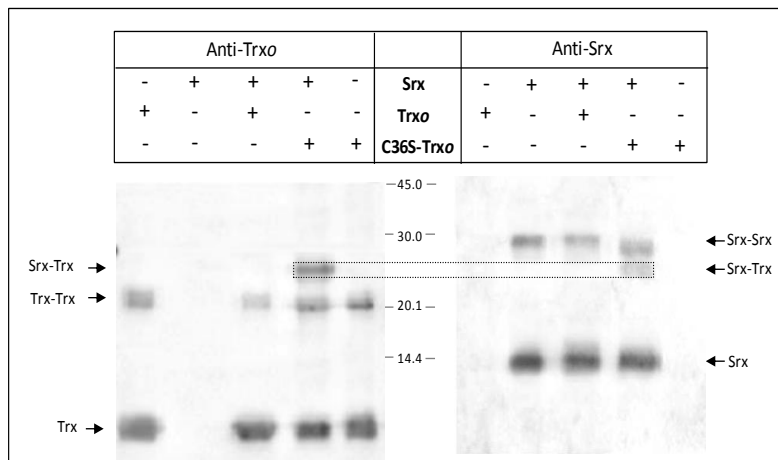
Al analizar los valores termodinámicos de la interacción entre la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H y la Srx, se observa un incremento de energía libre de Gibbs negativo. En cambio, con la Prx IIF reducida el ΔG es positivo.

### 19.2.- Heterocomplejo Srxs-Trxs

Para completar el estudio de formación de complejos proteína-proteína del sistema enzimático, se analizó la interacción entre la Srx y la Trx, reductor fisiológico de la misma.

### 19.2.1.- Análisis proteómico

Para poder visualizar el complejo Sr<sub>x</sub> / Tr<sub>x</sub> tras la interacción *in vitro* de ambas enzimas, es necesario disponer del mutante C36S de la Tr<sub>xo</sub> mitocondrial, la cual presenta una de sus cisteínas mutadas para formar un complejo estable con cualquiera de sus dianas. De esta manera, se incubaron ambas enzimas y se analizaron mediante Western blot utilizando los anticuerpos específicos frente a la Sr<sub>x</sub> y la Tr<sub>xo</sub> (Fig. 79).



**Figura 79.- Caracterización de la interacción Sr<sub>x</sub> / Tr<sub>xo</sub> mediante Western blot.** Análisis con los anticuerpos frente a la Tr<sub>xo</sub> y la Sr<sub>x</sub> tras interacción *in vitro* de la PsSr<sub>x</sub> con la Tr<sub>xo</sub> o su forma mutada C36S.

En ambos Western blots, se observa la presencia de una banda correspondiente al complejo Sr<sub>x</sub> / C36S-Tr<sub>xo</sub>, que no aparece en el caso de la interacción con la forma “wild type” de la Tr<sub>xo</sub>. Como control, se observaron las bandas de ambas enzimas independientes que se presentan tanto en forma monomérica como dimérica. Además, se identificó dicho complejo mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”.

### 19.2.2.- Parámetros termodinámicos

Para la caracterización termodinámica de la interacción de la Sr<sub>x</sub> con las Tr<sub>x</sub>s, se determinaron, en el ITC, los valores fisicoquímicos de dicho proceso entre la Sr<sub>x</sub> y Tr<sub>x</sub> cloroplastídica de *A. thaliana*, y entre la Sr<sub>x</sub> y Tr<sub>xo</sub> mitocondrial de guisante (Tabla 22).

Jeringa	Cell	T <sup>a</sup> (°C)	K <sub>d</sub> (μM)	ΔG (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
AtSrx	AtTrrx	25	2.24x10 <sup>-6</sup>	-8.67 ± 0.08	-2.46 ± 0.09	20.8 ± 0.4
PsSrx	PsTrxo	25	2.88x10 <sup>-6</sup>	-8.81 ± 0.06	-69.85 ± 0.63	-205.6 ± 2.1

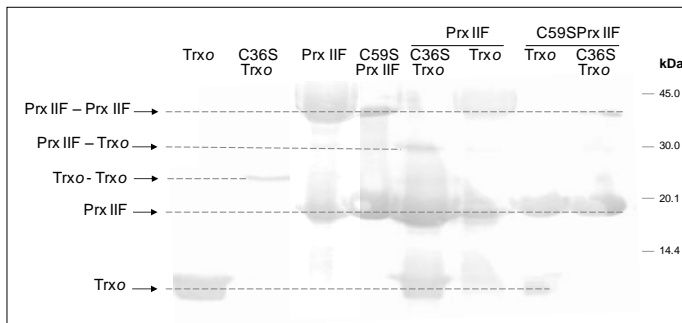
**Tabla 22.- Parámetros termodinámicos de la interacción Srx / Trx.** Determinación mediante ITC de la interacción de la Srx con la Trxx cloroplastídica y la Trxo mitocondrial de *A. thaliana* y guisante respectivamente.

Para ambas Trxs, los sistemas se caracterizan como un proceso favorable, con los valores de constante de disociación, energía libre de Gibbs y entalpía que se indican en la tabla 22.

### 19.3.- Heterocomplejo Prx-Trx

Para completar el ciclo del sistema enzimático Prx-Srx-Trx, y debido a que se cuenta con el mutante C36S-Trxo, se realizó el ensayo de confirmación del complejo formado por la Prx y Trx mitocondrial. Dicha interacción ha sido recientemente caracterizada *in vitro* mediante el uso de proteínas recombinantes e *in situ* con extractos de mitocondrias aisladas (Barraco-Medina *et al.*, 2008) y utilizando el mutante C36S-Trxo (Martí *et al.*, 2009).

Tras la incubación de la Prx IIF en su estado nativo (oxidado) con su reductor fisiológico la Trxo o su forma mutada, la C36S-Trxo, solo esta última forma un complejo estable que permite ser visualizado mediante análisis electroforético (Fig. 80).



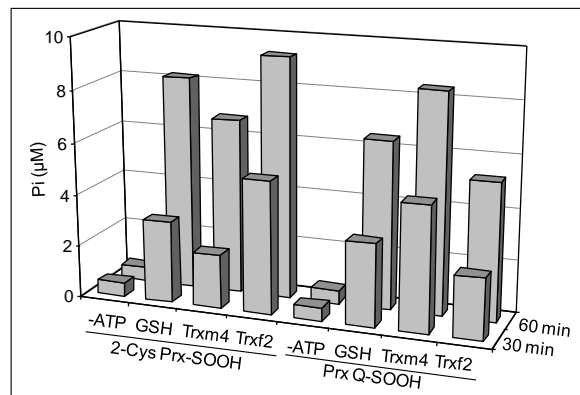
**Figura 80.- Análisis electroforético de la interacción entre Prx IIF y Trxo mitocondrial de guisante.** Gel teñido con Azul Coomassie de la Trxo o su mutante C36S con la Prx IIF o su mutante C59S.



En el gel se observa la formación de un complejo estable formado únicamente entre el mutante C36S-Trx $\alpha$  y la Prx IIF de un tamaño molecular aproximado de 30 kDa. La Trx $\alpha$  “wild type“ es capaz de reducir la Prx mitocondrial, pero el complejo formado no es estable. Dicho heterocomplejo no tiene lugar con el mutante de la cisteína catalítica de la Prx IIF (C59S-Prx IIF).

## **20.- Agente reductor cloroplastídico preferencial del sistema Prx-Srx-Trx**

La presencia de diferentes agentes reductores fisiológicos en el cloroplasto, donde la Srx es capaz de reducir la forma sulfínica de la 2-Cys Prx y de la Prx Q, nos llevó a estudiar el reductor que podría actuar en dichos sistemas de manera más eficiente. Para ello, se determinó el P $_i$  liberado en la reacción de la Srx con ambas Prxs-SO $_2$ H tras 30 y 60 min. de incubación, utilizando como reductor GSH, Trxm4 o Trxf2 (Fig. 81).



**Figura 81.- Actividad Srx con la forma sulfínica de la 2-Cys Prx o la Prx Q usando diferentes agentes reductores fisiológicos cloroplastídicos.** Determinación del P $_i$  liberado tras 30 ó 60 min de reacción en Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), Srx 5 μM, At-2-Cys Prx-SO $_2$ H o AtPrx Q-SO $_2$ H 15 μM, ATP 1 mM, MgCl $_2$  1 mM y GSH, Trxm4 o Trxf2 reducidas 10 μM. Como control, se realizó la determinación en ausencia de ATP en la reacción.

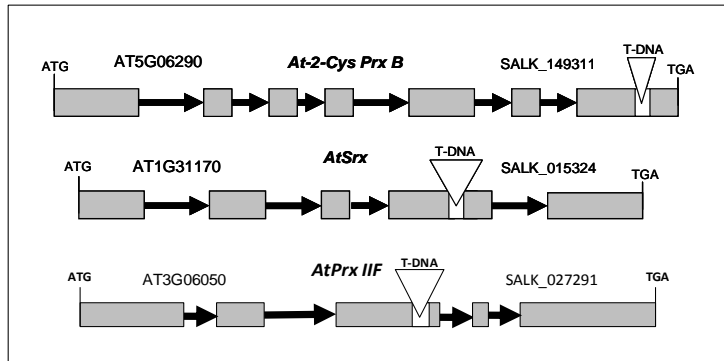
En el proceso de reducción de la 2-Cys Prx-SO $_2$ H, se produce una mayor liberación de P $_i$  en presencia de Trxf2 como agente reductor, seguido de GSH y finalmente de Trxm4. En cambio, para la reducción de la Prx Q-SO $_2$ H, la mayor actividad se da en presencia de la Trxm4, seguido del GSH y de la Trxf2. Por tanto la preferencia de la Srx por las Trxs cloroplastídicas se invierte dependiendo del sustrato a reducir.

## **21.- Estudio de plantas de *A. thaliana* “knock out” en Prx/Srx**

Mediante la utilización de líneas mutantes “knock out” en Prxs y Srx de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante inserción del T-DNA, se caracterizó el papel fisiológico de estas enzimas vegetales.

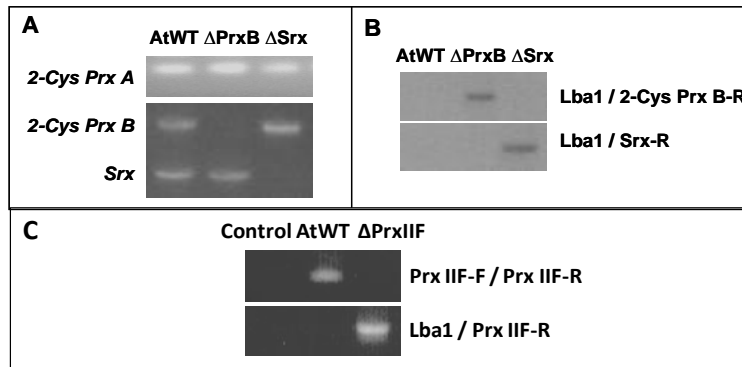
### **21.1.- Identificación de $\Delta$ Prx B, $\Delta$ Prx IIF y $\Delta$ Srx**

Las líneas mutantes de *A. thaliana* suministradas por SALK son líneas homocigotas que contienen en su DNA inserciones dentro de regiones intrónicas de los genes que codifican la 2-Cys Prx B (At5g06290), Prx IIF (At3g06050) y Srx (At1g31170) (Fig. 82).



**Figura 82.- Esquema genómico de las inserciones contenidas en las líneas mutantes  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx. Se representan los genes codificantes para cada enzima de *A. thaliana*, indicado por su código de acceso, conteniendo insertado el T-DNA que da lugar a cada línea mutante.**

Para la selección de las líneas mutantes, se obtuvo una primera generación mediante germinación y crecimiento en MS con kanamicina, resistencia conferida a los mutantes. A continuación, se identificaron mediante PCR a partir del cDNA de la segunda generación y se diseñaron reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos de cada gen o mediante un oligo de la secuencia consenso de la inserción del T-DNA y otro oligo específico del gen (Fig. 83).

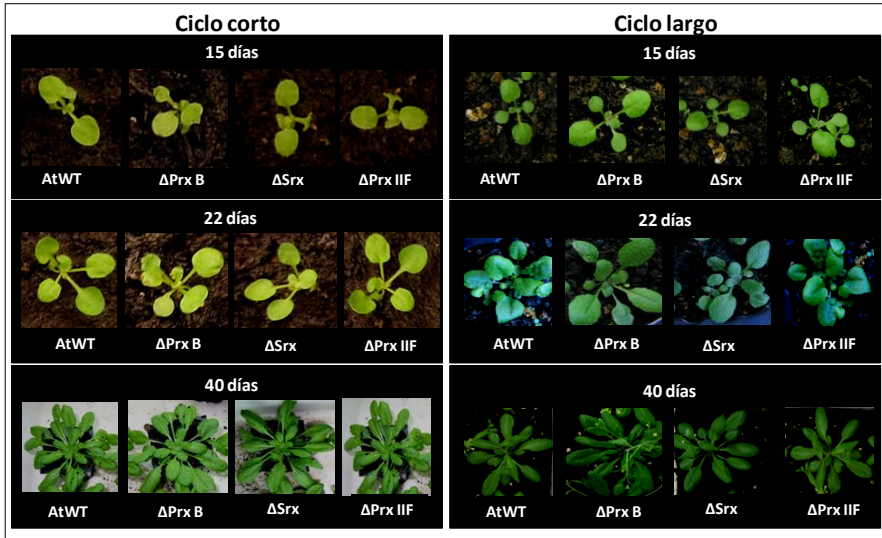


**Figura 83.- Identificación de los mutantes de *A. thaliana*  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx mediante PCR. A.** Electroforesis de PCR de AtWT,  $\Delta$ PrxB y  $\Delta$ Srx amplificando los genes correspondientes a la 2-Cys PrxA, 2-Cys Prx B y Srx. **B.** Electroforesis de PCR empleando el oligonucleótido Lba1 (“Forward”) y 2-Cys Prx B o Srx (“Reverse”). **C.** Chequeo del  $\Delta$ Prx IIF mediante PCR del gen de la Prx IIF con oligos específicos o con el oligo del T-DNA Lba1.

En el mutante  $\Delta$ Prx B no se observó la banda de tamaño correspondiente al gen de la 2-Cys Prx B (Fig. 83.A) que amplifica en el “wild type” (AtWT), debido a que contiene la inserción del T-DNA (Fig. 83.B). De forma similar, el mutante  $\Delta$ Srx no presentó la banda de tamaño correspondiente al gen de la Srx (Fig. 83.A) ya que contiene el inserto (Fig. 83.B) del que carece la variedad silvestre (AtWT). La confirmación del mutante “knock out” en Prx IIF se comprobó al no observarse banda correspondiente al gen que codifica a dicha enzima mitocondrial y amplificar con un oligonucleótido específico del inserto contenido en su genoma con un oligonucleótido del gen, obteniéndose la banda al tamaño esperado (Fig. 83.C).

## 21.2.- Caracterización del fenotipo

Cuando las líneas mutantes fueron crecidas en cámara de cultivo de ciclo corto (8 h de luz / 16 h de oscuridad), no se observaron diferencias fenotípicas con respecto a la “wild type” (AtWT). Sin embargo, cuando se crecieron bajo fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad (ciclo largo), se pudieron observar diferencias fenotípicas con respecto al tamaño y desarrollo en relación con la AtWT (Fig. 84).



**Figura 84.-** Diferencias fenotípicas en el crecimiento de los mutantes en Prxs y Srx de *A. thaliana* crecidos durante 15, 22 y 40 días en ciclo corto o largo. Crecimiento del  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Srx y  $\Delta$ Prx IIF en comparación con el “wild type” (AtWT).

Tal y como se observa en la figura 84, bajo condiciones de ciclo largo, se aprecia que el mutante de *A. thaliana* “knock out” en 2-Cys Prx B ( $\Delta$ Prx B) muestra un mayor tamaño que la línea silvestre (AtWT). Por otro lado, el mutante de *A. thaliana* “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx), crecido en ciclo largo, presenta un menor tamaño que la AtWT. Sin embargo, no se aprecia diferencias fenotípicas entre el mutante KO en Prx IIF ( $\Delta$ Prx IIF) y la AtWT.

La línea silvestre (AtWT) presenta un tamaño y desarrollo foliar intermedio entre el  $\Delta$ Srx y el  $\Delta$ Prx B (Fig. 85).



**Figura 85.-** Diferencias fenotípicas del  $\Delta$ Srx y  $\Delta$ Prx B y recuperación del fenotipo salvaje (AtWT) por complementación ( $\Delta$ Srx+Srx). Fenotipo de mutantes de *A. thaliana* y transformada tras 5 semanas de crecimiento en ciclo largo (fotoperiodo 16 h de luz).

Con objeto de revertir el fenotipo descrito para el mutante de *A. thaliana* “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx), se complementó dicho mutante con AtSrx

bajo la expresión de un promotor 35S mediante transformación con *Agrobacterium*. De esta manera, se obtuvo la línea transformada por suplementación  $\Delta$ Srx+Srx, la cual revierte el fenotipo (Fig. 81) y se desarrolla de forma similar a la línea silvestre.

En la tabla 23, se presentan diferentes parámetros fenotípicos, determinados para las líneas AtWT,  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Srx,  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx+Srx.

Parámetros	AtWT	$\Delta$ Prx B	$\Delta$ Srx	$\Delta$ Prx IIF	$\Delta$ Srx+Srx
Diámetro de la roseta (cm)	7.87 $\pm$ 0.91	9.42 $\pm$ 0.95	6.21 $\pm$ 0.57	7.77 $\pm$ 0.80	7.91 $\pm$ 0.81
Longitud de la raíz (cm)	7.18 $\pm$ 0.65	9.67 $\pm$ 1.40	6.57 $\pm$ 0.95	7.22 $\pm$ 0.94	7.09 $\pm$ 0.98
Peso fresco foliar (mg/hoja)	140.55 $\pm$ 4.12	163.82 $\pm$ 3.98	108.14 $\pm$ 6.02	132.24 $\pm$ 7.12	130.32 $\pm$ 6.20
Clorofilas a+b ( $\mu$ g/mL)	7.31 $\pm$ 0.18	7.26 $\pm$ 0.12	10.47 $\pm$ 1.02	8.31 $\pm$ 0.32	9.47 $\pm$ 0.81
$F_v/F_m$	0.82 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.02	0.80 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.02

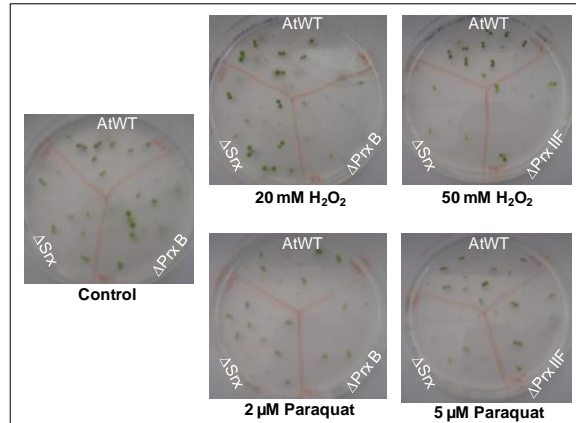
**Tabla 23.- Parámetros fenotípicos de los mutantes y transformada de *A. thaliana*.** Medidas de la roseta, raíz, peso fresco de la hoja, clorofila y  $F_v/F_m$  de la planta silvestre (AtWT), sus mutantes  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Srx y  $\Delta$ Prx IIF y la transformada  $\Delta$ Srx+Srx. Los valores son la media  $\pm$  SD de las medidas o determinaciones en 10 individuos independientes de 5 semanas crecidos en ciclo largo.

El tamaño de la roseta mostró diferencias entre la AtWT y los mutantes “knock out” en 2-Cys Prx B (1.55 cm de diámetro mayor, como media) y Srx (1.66 cm de diámetro menor). Esas diferencias fueron estadísticamente significativas por el test de la t-Student de 2-colas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la AtWT y el  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx+Srx. La longitud de la raíz de la planta es algo mayor en el  $\Delta$ Prx B y algo menor en el  $\Delta$ Srx, en comparación con la AtWT, y similares para la  $\Delta$ Prx IIF y la línea transformada. Paralelamente, el peso fresco de las hojas es mayor en  $\Delta$ Prx B (23 mg/hoja de media) y menor en  $\Delta$ Srx (32 mg/hoja) que en la silvestre (AtWT). El contenido en clorofilas a+b mostró valores algo mayores en el mutante  $\Delta$ Srx y la eficiencia fotosintética ( $F_v/F_m$ ) mostró valores similares en todos los casos, lo cual indica que la mutación de las enzimas del sistema Prx/Srx no afecta a la eficiencia fotosintética de la planta.

### **21.3.- Sensibilidad a estrés abiótico**

Las diferentes líneas mutantes de *A. thaliana* viables carentes de Prx cloroplastídica (2-Cys Prx), mitocondrial (Prx IIF) o Srx, fueron sometidas a diferentes condiciones de estrés oxidativo para estudiar su sensibilidad y conocer el papel de dichas enzimas.

Para conocer la respuesta de los mutantes  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx durante la germinación en placa bajo condiciones de estrés oxidativo, se sembraron sus semillas de *A. thaliana* en MS conteniendo  $H_2O_2$  o Paraquat (Fig. 86).



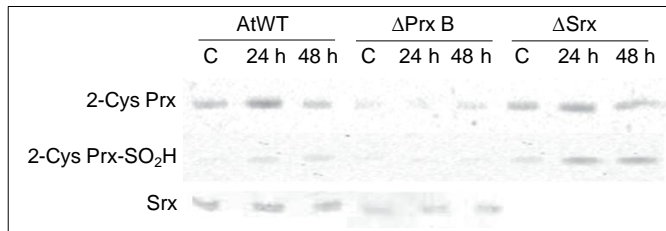
**Figura 86.- Caracterización de los mutantes de *A. thaliana* mediante estrés durante la germinación.** Crecimiento de los mutantes  $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Prx IIF y  $\Delta$ Srx en medio MS con  $H_2O_2$  o Paraquat.

Tal y como se observa en la figura 86, las semillas de *A. thaliana* que carecen de la Prx cloroplastídica ( $\Delta$ Prx B) muestran una mayor sensibilidad a la germinación en condiciones de estrés oxidativo, tanto para  $H_2O_2$  20 mM como con Paraquat 2  $\mu$ M. Sin embargo, el  $\Delta$ Prx IIF y el  $\Delta$ Srx mostraron sensibilidad a la germinación en placa bajo concentraciones más altas de  $H_2O_2$  y Paraquat (50 mM y 5  $\mu$ M, respectivamente).

Para conocer la respuesta de los mutantes de *A. thaliana* al estrés oxidativo, se trataron la AtWT, el  $\Delta$ Prx B y el  $\Delta$ Srx, crecidas bajo ciclo corto (8 h de luz) durante 5 semanas, con  $H_2O_2$  20 mM. Tras 24 y 48 h de tratamiento, se recogieron las proteínas solubles de hoja y se analizaron por Western blot los niveles de 2-Cys Prx, 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y Srx (Fig. 87).

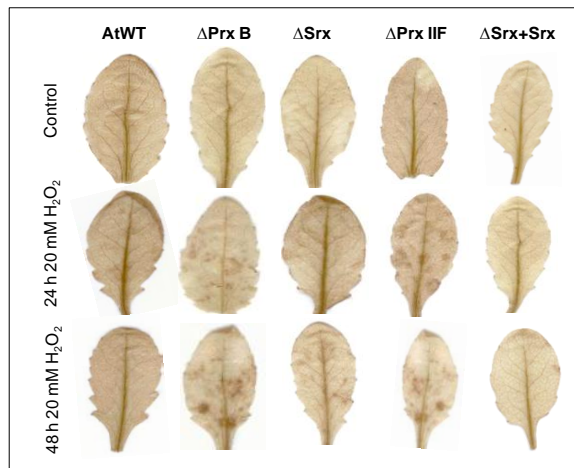
En el Western blot se puede observar que el  $\Delta$ Prx B presenta bajos niveles de 2-Cys Prx total, debido a que dicho mutante tiene solo la 2-Cys Prx A, así como de la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx. Por otro lado, en extractos de hoja del mutante  $\Delta$ Srx no se apreció, como era de esperar, la presencia de sulfirredoxina ni en condiciones fisiológicas, ni bajo condiciones de estrés. Mediante tratamiento con  $H_2O_2$ , se incrementan los niveles de 2-Cys Prx total de forma similar en el  $\Delta$ Srx que en el AtWT, pero la ausencia de Srx

condiciona que gran parte de esta Prx se encuentre en forma de ácido sulfinico. Los niveles de AtSrx se mantienen similares en las plantas silvestres tratadas, mientras que el mutante  $\Delta$ Prx B presenta menor contenido de Srx en hoja.



**Figura 87.- Respuesta del  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx al tratamiento por  $H_2O_2$ .** Western blot de los mutantes de *A. thaliana*, tratados con  $H_2O_2$  20 mM durante 24 y 48 h, utilizando anticuerpos específicos frente a la Srx, la 2-Cys Prx y su forma sobreoxidada. Se cargaron 10  $\mu$ g y 20  $\mu$ g, de proteínas solubles de hoja, para la detección de las Prxs y Srx, respectivamente.

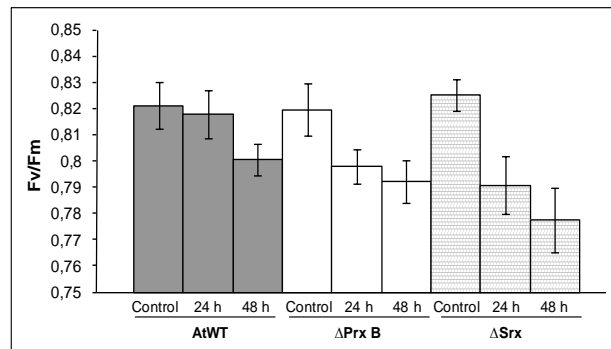
En los mutantes de *A. thaliana* ( $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Srx y  $\Delta$ Prx IIF) y en la línea transformada ( $\Delta$ Srx+Srx), sometidas a tratamiento por  $H_2O_2$ , se determinó la presencia en hoja de  $H_2O_2$  en comparación con la AtWT (Fig. 88).



**Figura 88.- Tinción de  $H_2O_2$  en hoja de mutantes de *A. thaliana* bajo tratamiento oxidativo.** Detección histoquímica con DAB del  $H_2O_2$  presente a las 24 y 48 h en hoja de las líneas mutantes ( $\Delta$ Prx B,  $\Delta$ Srx y  $\Delta$ Prx IIF) y transformada ( $\Delta$ Srx+Srx) tras tratamiento con  $H_2O_2$  20 mM.

En la cepa silvestre de *A. thaliana* sometida a tratamiento con  $H_2O_2$  20 mM durante 24 ó 48 h, no se observó un acúmulo acusado de  $H_2O_2$  en hojas. En cambio, los mutantes en Prxs ( $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Prx IIF) contienen en sus hojas  $H_2O_2$  como consecuencia del tratamiento tanto a las 24 h como a las 48 h. El  $\Delta$ Srx presenta menores niveles de  $H_2O_2$  en hoja tras 48 h de tratamiento oxidativo, mientras que dicho mutante complementado por transformación con Srx ( $\Delta$ Srx+Srx) no muestra acúmulo de  $H_2O_2$  tras ser tratado.

Para determinar la eficiencia fotosintética y conocer el estado general de los mutantes  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx tratados con  $H_2O_2$ , se determinó el coeficiente  $F_v/F_m$  (Fig. 89).

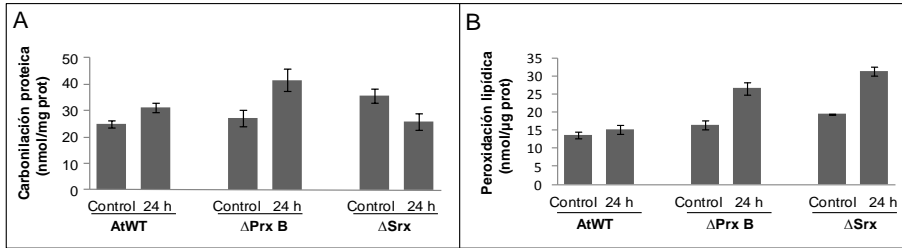


**Figura 89.- Medidas de fluorescencia de hojas de mutantes tratados con  $H_2O_2$ .** Determinaciones de  $F_v/F_m$  en hojas de AtWT,  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx tratados con  $H_2O_2$  20 mM durante 24 y 48 h. Las medidas se representan como los valores medios de 3 hojas de 3 experimentos diferentes  $\pm$  SD.

El tratamiento con  $H_2O_2$  20 mM produce un pequeño descenso de la  $F_v/F_m$  a las 48 h, similar al que se produce en el mutante  $\Delta$ Prx B. Sin embargo, se observa un mayor descenso de la eficiencia fotosintética en las plantas “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx) tras el tratamiento por  $H_2O_2$  a las 24 y 48 h.

Para estudiar la susceptibilidad de los mutantes de *A. thaliana* al daño oxidativo, se determinaron los valores de carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica de las plantas carentes de 2-Cys Prx y Srx tratadas con 20 mM de  $H_2O_2$  (Fig. 90).





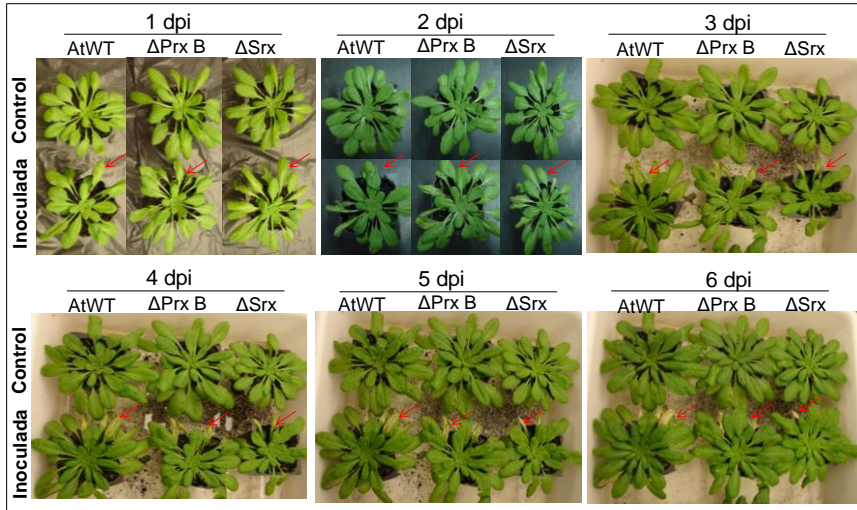
**Figura 90.- Parámetros de daño oxidativo en hojas de mutantes de *A. thaliana* tras 24 h de tratamiento con  $H_2O_2$  20 mM. A. Determinación de carbonilación proteica en AtWT,  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx. B. Determinación de peroxidación lipídica en AtWT,  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx. Las medidas se representan como los valores medios de 3 hojas de 3 experimentos diferentes  $\pm$  SD.**

Los valores de proteínas carboniladas en hojas de plantas de *A. thaliana* (Fig. 90.A) se ven incrementados ligeramente en el  $\Delta$ Srx bajo condiciones fisiológicas, mientras que el  $\Delta$ Prx B presenta valores similares a la línea “wild type” (AtWT). El tratamiento con  $H_2O_2$  20 mM durante 24 h produce en la planta silvestre un pequeño incremento de las proteínas carboniladas, mientras que en el mutante  $\Delta$ Prx B se observa un mayor incremento de las mismas. En cambio, el  $\Delta$ Srx tratado presenta similares niveles respecto al AtWT y una ligera reducción de carbonil proteínas respecto al control.

Los valores de peroxidación lipídica en hojas de plantas de *A. thaliana* (Fig. 90.B) se encuentran ligeramente incrementados en ambos mutantes ( $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx) respecto a la AtWT. El tratamiento con  $H_2O_2$  produce un incremento de la peroxidación lipídica en ambos mutantes carentes de 2-Cys Prx y Srx.

#### **21.4.- Sensibilidad a estrés biótico**

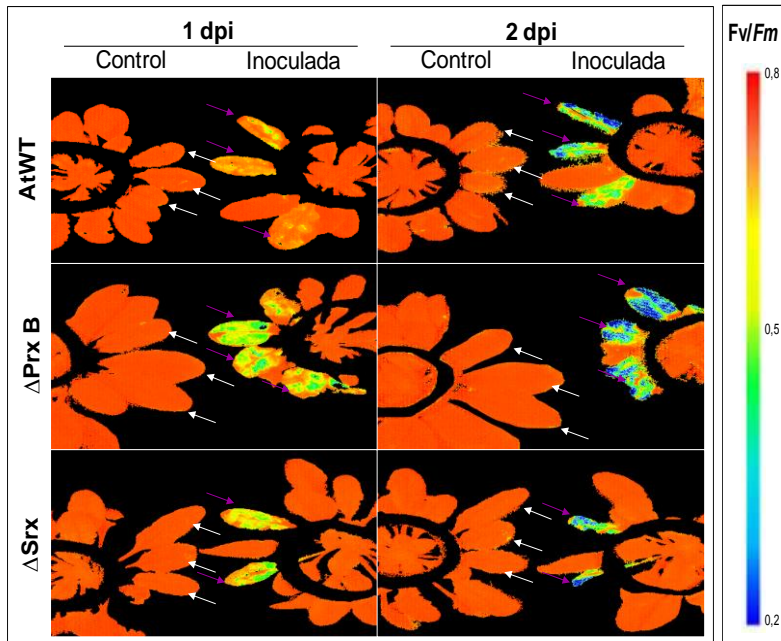
Para el estudio de la implicación del sistema Prx / Srx en plantas sometidas a estrés biótico, se realizó la inoculación bacteriana (*Pseudomonas syringae*) de tres hojas de la roseta de *A. thaliana* y sus mutantes “knock out” en 2-Cys Prx ( $\Delta$ Prx B) y en Srx ( $\Delta$ Srx). De esta manera, se siguió el proceso de la infección varios días post-inoculación (dpi), tanto en plantas controles, a las que se les ha inoculado solución de inoculación, como en las plantas inoculadas con la solución bacteriana a alta densidad (Fig. 91).



**Figura 91.- Seguimiento de plantas de *A. thaliana* y mutantes inoculadas con bacterias.** Desarrollo de la infección bacteriana en hojas de AtWT,  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx inoculadas con *Pseudomonas* durante los 6 días post-inoculación (dpi). Las plantas controles son inoculadas con la solución de inoculación, y las plantas inoculadas son infiltradas con la solución bacteriana a alta densidad.

Durante los primeros 2 dpi, no se apreciaron síntomas de la infección en las hojas inoculadas. Tan sólo aparecieron daños mecánicos como consecuencia del proceso de la infiltración tanto en las plantas inoculadas como en las controles. Sin embargo, a partir de los 3 dpi comienza a aparecer un proceso de clorosis foliar en las hojas inoculadas, que resulta más acusado en ambos mutantes, donde además las hojas inoculadas sufren un plegamiento dorsal. En los 4 y 5 dpi, comienza a aparecer tejido necrosado en las hojas inoculadas, mientras que las hojas de las plantas controles se recuperaron totalmente del daño mecánico, algo más prolongado para el  $\Delta$ Prx B. A los 6 dpi, la línea silvestre (AtWT) presenta un estado saludable, mientras que los mutantes  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx muestran una recuperación general con muerte de algunas hojas inoculadas.

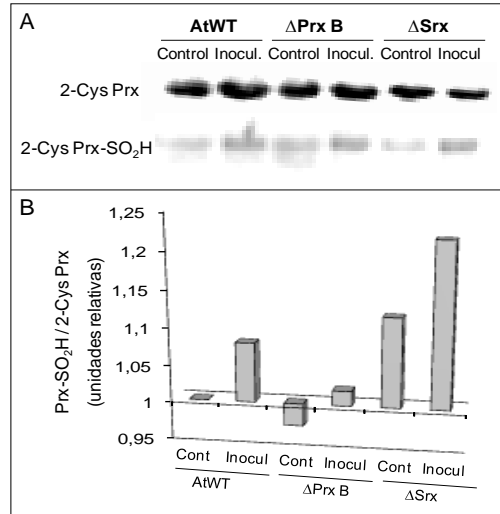
Para seguir dicho proceso de infección bacteriana y poder ver la posible sensibilidad de ambos mutantes de *A. thaliana* a estrés biótico, se realizó el seguimiento de la infección de las plantas inoculadas y controles mediante medida de fluorescencia. Para ello se determinaron diversos parámetros, entre ellos la eficiencia fotosintética de las plantas en FluorCam, donde se puede visualizar en escala de falsos colores la  $F_v/F_m$  (Fig. 92).



**Figura 92.- Visualización de la eficiencia fotosintética de mutantes de *A. thaliana* sometidos a estrés biótico.** Determinación en FluorCam de la  $F_v/F_m$  tras 1 y 2 días post-inoculación (dpi) con *Pseudomonas* en hojas de AtWT,  $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx. Con flechas blancas se indican las hojas infiltradas con solución de inoculación, y con flechas moradas se indican las hojas inoculadas con solución bacteriana de alta densidad.

En las imágenes se puede observar un descenso leve de la eficiencia fotosintética en las plantas inoculadas con bacterias, en comparación con hojas de plantas controles. A 1 dpi, se produce un descenso de la eficiencia fotosintética mayor en el caso del  $\Delta$ Srx y, sobre todo, del  $\Delta$ Prx B, en comparación con la silvestre (AtWT), donde la progresión de la infección es más lenta. Incluso, se puede llegar a observar la posible migración del daño producido por las bacterias a las hojas anexas a las inoculadas en el caso del  $\Delta$ Prx B. A 2 dpi, el descenso de la  $F_v/F_m$  es considerable en las hojas inoculadas, llegando a valores por debajo de 0.4, especialmente en el caso de los mutantes, donde conducirá a la muerte del tejido vegetal de la hoja inoculada.

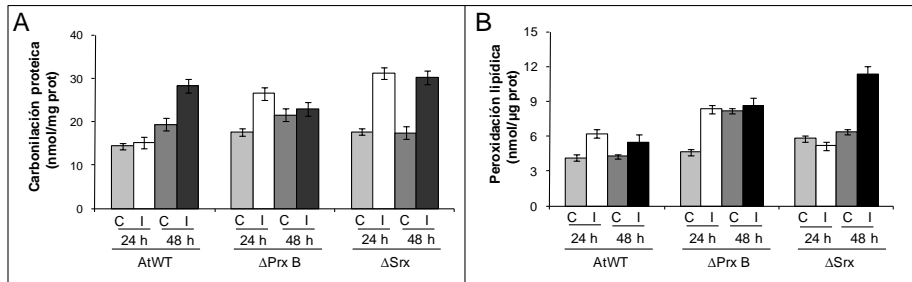
Para conocer la respuesta del sistema antioxidante frente al estrés biótico, se analizó el Western blot de las plantas mutantes “knock out” en las enzimas de dicho sistema tras haber sufrido inoculación en hojas por *Pseudomonas syringae* (Fig. 93).



**Figura 93.- Inmunoanálisis de la Prx total y sobreoxidada de mutantes de *A. thaliana* sometidos a estrés biótico. A.** Western blot de 10  $\mu$ g de extracto total de proteínas solubles de hojas de AtWT y  $\Delta$ Srx y 20 g de proteínas para  $\Delta$ Prx B tras 2 dpi con *Pseudomonas*, utilizando anticuerpos específicos frente a la 2-Cys Prx total y sobreoxidada (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H). **B.** Análisis de imagen de los Western blot, determinando la cantidad relativa de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx.

Se aprecia un aumento de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx como consecuencia de la infección por *Pseudomonas syringae*. Dicho incremento es más evidente en el  $\Delta$ Srx, donde ya la hoja control contiene mayor cantidad relativa de 2-Cys Prx sobreoxidada que la AtWT inoculada. Para el mutante  $\Delta$ Prx B, donde se carga el doble de proteína soluble total de hoja, la baja cantidad de Prx A existente da lugar a un pequeño incremento de la forma sobreoxidada de ésta como consecuencia del estrés biótico.

Finalmente, para determinar el daño producido en los mutantes de *A. thaliana* carentes de 2-Cys Prx ( $\Delta$ Prx B) y Srx ( $\Delta$ Srx) como consecuencia del estrés biótico causado por la infección en hoja con *Pseudomonas syringae*, se cuantificaron a 1 y 2 dpi los niveles de proteínas carboniladas y de peroxidación lipídica en hoja (Fig. 94).



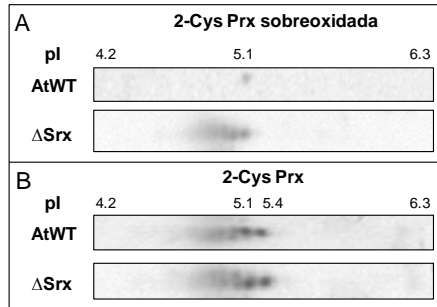
**Figura 94.- Parámetros de daño oxidativo en hojas de mutantes de *A. thaliana* tras 24 y 48 h inoculación con *Pseudomonas*. A. Determinación de los valores de carbonilación de proteínas en hojas infiltradas con solución de inoculación (C) o inoculadas con solución bacteriana de alta densidad (I) en la línea silvestre (AtWT), “knock out” en 2-Cys Prx ( $\Delta$ Prx B) o en Srx ( $\Delta$ Srx). B. Cuantificación de la peroxidación lipídica en hojas infiltradas con solución (control) (C) o inoculadas con solución bacteriana de alta densidad (I) en plantas silvestre (AtWT), “knock out” en 2-Cys Prx ( $\Delta$ Prx B) o en Srx ( $\Delta$ Srx).**

Los niveles de proteínas carboniladas (Fig 90.A) sólo se incrementan en la planta silvestre (AtWT) a los 2 dpi, mientras que en ambos mutantes ( $\Delta$ Prx B y  $\Delta$ Srx) se produce un incremento significativo a las 24 h de ser inoculadas. En cambio, los valores de peroxidación lipídica apenas son incrementados en la AtWT sometida a estrés biótico, mientras que el mutante  $\Delta$ Srx sufre un importante incremento de dichos valores a 2 dpi. Sin embargo, el  $\Delta$ Prx B contiene elevados valores de peroxidación lipídica tras 24 y 48 h, tras la inoculación, e incluso a los 2 dpi de la planta control.

## **22.- Estudio del estado redox de las Prxs en $\Delta$ Srx mediante técnicas bidimensionales**

Para conocer el papel de la Srx de plantas en el estado redox de las diferentes Prxs, se estudió mediante análisis bidimensional y Western blot, la presencia de dichas forma sobreoxidada en el mutante de *A. thaliana* carente de Srx ( $\Delta$ Srx) en comparación con la cepa silvestre (AtWT).

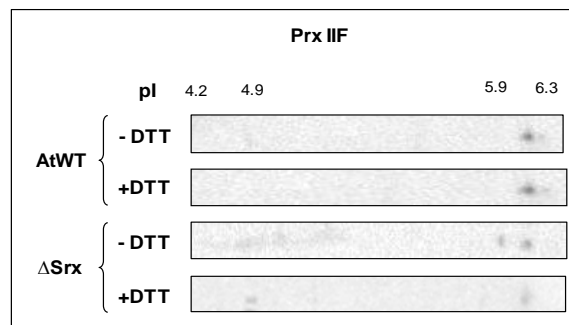
Para analizar la presencia de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx en el  $\Delta$ Srx en comparación con el AtWT, se realizó una separación electroforética en dos dimensiones de extractos de ambas líneas y se analizó utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx (Fig. 95).



**Figura 95.- Inmunoanálisis bidimensional de la 2-Cys Prx en extracto de hoja del mutante “knock out” en Srx.** A. 2-Cys Prx sobreoxidada en la ΔSrx en comparación con la AtWT. B. 2-Cys Prx total en la ΔSrx en comparación con la AtWT.

En el mutante “knock out” en Srx (ΔSrx) se observan múltiples “spots” de formas sobreoxidadas de la 2-Cys Prx (Fig. 95.A) en comparación con la silvestre (AtWT). Sin embargo, la cantidad de 2-Cys Prx total (Fig. 95.B) es similar en ambos extractos de *A. thaliana* analizados.

Para estudiar el estado redox de la Prx IIF mitocondrial dependiente de la Srx, al no disponer del anticuerpo específico frente a su forma sobreoxidada, se analizaron bidimensionalmente los extractos de hoja del AtWT y ΔSrx frente al anticuerpo específico a la Prx IIF, en ausencia o presencia de DTT, agente reductor capaz de reducir las formas sulfínicas, pero no las sulfónicas (Fig. 96).

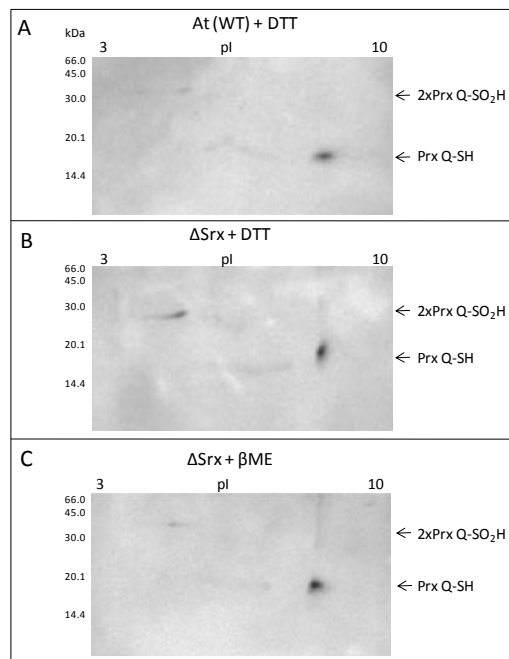


**Figura 96.- Inmunoanálisis bidimensional de la Prx IIF en extracto de hoja del mutante “knock out” en Srx (ΔSrx) en comparación con la AtSrx, en ausencia (-DTT) o presencia (+DTT) de agente reductor.**

En la cepa silvestre (AtWT) se observa la presencia de un único “spot” con un pI aparente de 6.2, correspondiente a la forma reducida de la Prx IIF. En el mutante “knock out” en Srx (ΔSrx) se observa, en ausencia de DTT, la

existencia, además, de varios “spots” de formas oxidadas, los cuales son reducidos al ser incubados con DTT 10 mM. Sin embargo, uno de los “spots”, correspondiente a un pI aparente de 4.9 que no es reducido por DTT, puede tratarse de una forma sobreoxidada de la Prx IIF presente en el  $\Delta$ Srx y no en el AtWT.

De forma similar, se estudió la influencia de la Srx en *A. thaliana* sobre el estado redox de la Prx Q cloroplastídica. Para ello, se analizó mediante Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la Prx Q, tras la electroforesis 2D de extractos de hoja de la AtWT y del  $\Delta$ Srx en presencia de DTT o de  $\beta$ -mercapto etanol ( $\beta$ ME), que reduce a pH 4 la forma oxidada y sobreoxidada (ácido sulfínico) de las proteínas (Fig. 97).



**Figura 97.- Inmunoanálisis bidimensional de la Prx Q sobreoxidada en extracto de hoja de *A. thaliana* en presencia de agentes reductores. A. Extracto de la línea silvestre (AtWT) en presencia de DTT 10 mM. B. Extracto del mutante de *A. thaliana* “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx) en presencia de DTT 10 mM. C. Extracto del mutante de *A. thaliana* “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx) en presencia de  $\beta$ -mercapto etanol ( $\beta$ ME) 10 mM a pH 4.**

La cepa silvestre (AtWT) presenta toda la Prx Q en su forma reducida al ser tratada con DTT (Fig. 97.A), mientras que la cepa  $\Delta$ Srx presenta una forma oxidada dimérica que no es reducida por DTT (Fig. 97.B). Sin embargo,

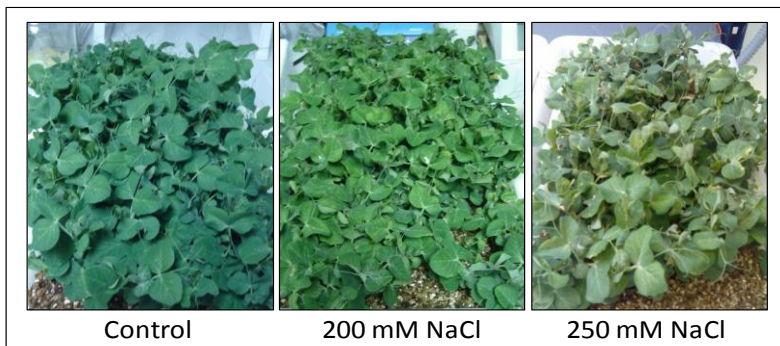
al ser tratado el extracto de hoja de la  $\Delta$ Srx con  $\beta$ ME, dicho “spot” con un pI aparente de 5.0, disminuye considerablemente (Fig. 97.C).

### **23.- Estrés abiótico en guisante**

Para conocer la respuesta al estrés abiótico de las enzimas del sistema Prx/Srx, las plantas de guisante de 15 ó 21 días se trataron con riego salino en la Solución nutritiva, o con diferentes tratamientos oxidativos aplicados mediante riego por pulverización.

#### **23.1.- Estrés salino**

El tratamiento mediante riego con sal en plantas de guisante se realizó tal y como se indica en la tabla 3 de la sección de *Material y métodos*. A los 15 días de desarrollo, tras 5 días de riego con la concentración alcanzada de 200 ó 250 mM de sal, no se apreciaron efectos a simple vista en hoja y raíz. En cambio, a los 21 días de desarrollo de la planta y con 11 días de riego con la concentración de sal alcanzada, se aprecian en hojas síntomas de clorosis a 200 mM y de necrosis a 250 mM (Fig. 98).

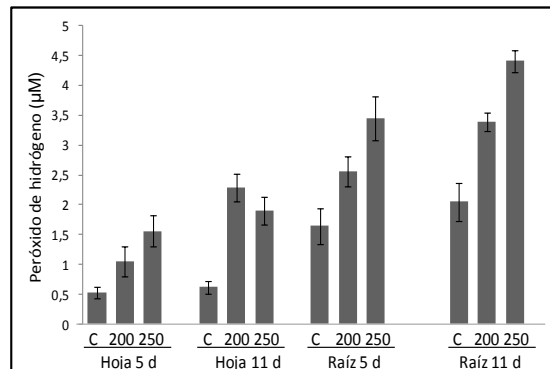


**Figura 98.- Estrés salino en plantas de guisante de 21 días.** Plantas de *Pisum sativum* sometidas a tratamiento con 200 ó 250 mM de NaCl durante 11 días. Como control se realizó un riego con solución nutritiva en ausencia de elevados niveles de sal.



### 23.1.1.- Daño oxidativo

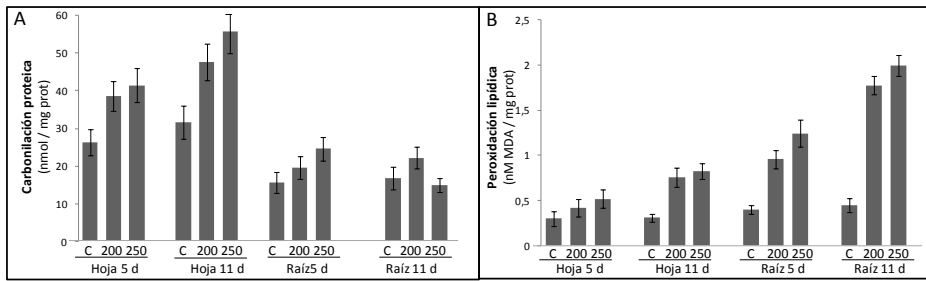
Como el estrés salino es considerado un estrés oxidativo, se determinó la producción de peróxido de hidrógeno en hoja y raíz de plantas de guisante sometidas a este tipo de estrés (Fig. 99).



**Figura 99.- Determinación de peróxido de hidrógeno en plantas de guisante sometidas a estrés salino.** Valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hoja y raíz de guisantes de 15 y 21 días sometidos a tratamiento por 200 ó 250 mM de NaCl durante 5 y 11 días. C, control.

En hojas de guisante se produce un incremento significativo de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como consecuencia del estrés salino, que hace que se duplique en guisantes tratados con 200 mM de NaCl durante 5 días, y que se triplique en aquellos tratados con 250 mM. En guisantes tratados durante 11 días, los niveles son entre 4-5 veces superior para ambos tratamientos que para las plantas control. Por otro lado, en la raíz, la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor al estar en contacto directo con el substrato y el riego, y el incremento resulta gradual en función del tratamiento y duración del mismo.

Para determinar el daño oxidativo indirecto producido en macromoléculas como consecuencia del estrés salino en plantas de guisante, se cuantificó la carbonilación de proteínas y la peroxidación lipídica en hoja y raíz de plantas de 11 ó 21 días sometidas a riego con NaCl 200 ó 250 mM (Fig. 100).



**Figura 100.- Parámetros de daño oxidativo en plantas de guisante sometidas a estrés salino.** **A.** Determinación de carbonilación proteica en hoja y raíz de guisantes de 15 y 21 días sometidos a tratamiento con NaCl 200 ó 250 mM durante 5 y 11 días. **B.** Determinación de peroxidación lipídica en hoja y raíz de guisantes de 15 y 21 días sometidos a tratamiento con NaCl 200 ó 250 mM durante 5 y 11 días. C, control.

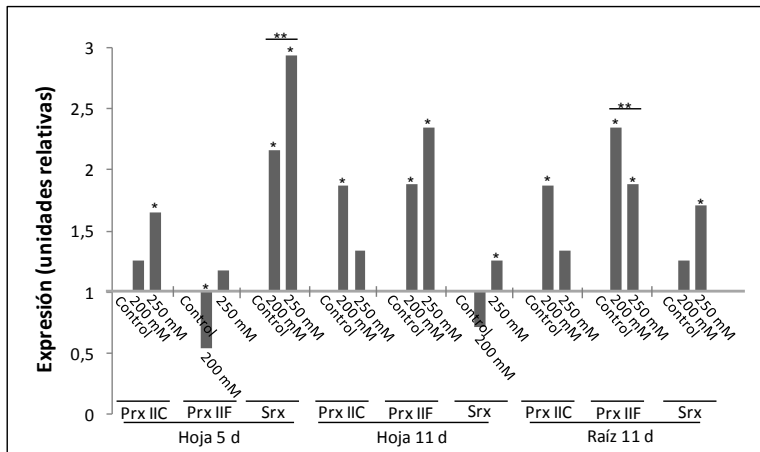
Los niveles de proteínas carboniladas (Fig. 100.A) en hoja sufren un incremento significativo como consecuencia del estrés salino, siendo algo mayor con NaCl 250 mM que con 200 mM y, a su vez, mayor durante 11 días de tratamiento que durante 5 días. A nivel de la raíz de guisante el incremento como consecuencia del estrés salino en las proteínas carboniladas es más leve, aunque mantiene el mismo patrón, a excepción de la raíz de guisantes tratados con NaCl 250 mM durante 21 días, donde no se incrementan.

La peroxidación lipídica (Fig. 100.B) sufre un leve incremento en hoja de guisantes tratados con NaCl durante 5 días, siendo mucho mayor tras 11 días de tratamiento. El efecto es más evidente en raíz, donde se llega a producir un incremento de 4 veces los valores de peroxidación lipídica como consecuencia del estrés salino, siendo algo mayor con 250 mM de sal que con 200 mM.

### 23.1.2.- Niveles de expresión

Como respuesta al estrés salino en plantas de guisante, se estudió la expresión a nivel transcripcional y traduccional de las proteínas implicadas en el sistema Prx / Srx.

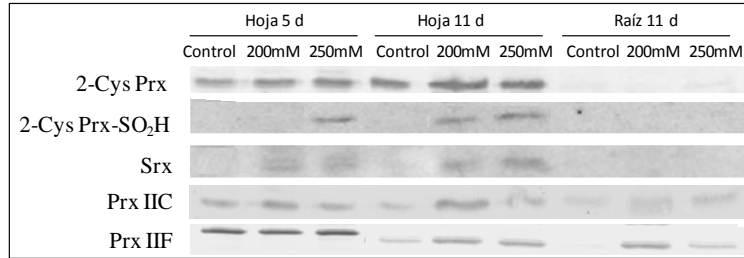
A través de un análisis de PCR cuantitativa en hoja y raíz de plantas de guisante de 15 y 21 días sometidas a estrés salino (NaCl 200-250 mM durante 5 y 11 días), se determinaron los valores de expresión de las Prxs citosólica (Prx IIC) y mitocondrial (Prx IIF) y de la Srx (Fig. 101).



**Figura 101.- Niveles de expresión transcripcional del sistema Prx/Srx en plantas de guisante sometidas a estrés salino.** Expresión de  $RNA_m$  de Prx IIC, Prx IIF y Srx obtenida por PCR cuantitativa de hoja y raíz de guisantes de 15 y 21 días sometidos a tratamiento con NaCl 200 ó 250 mM durante 5 y 11 días. Con asterisco se señalan los datos estadísticamente significativos.

En el gráfico, se puede apreciar una tendencia al incremento de los niveles de transcrito como respuesta al estrés salino. La Prx IIC es sobreexpresada en hoja de 5 días con NaCl 250 mM y en hoja de 11 días con 200 mM de sal, de forma similar a como sucede en raíz. La expresión de la Prx IIF mitocondrial se incrementa en hoja tratada 2 veces más que la planta control, de forma similar a como sucede en la raíz. Los niveles de RNAm de la Srx son fuertemente incrementados en hoja como consecuencia del estrés salino, siendo la expresión 3 veces mayor tras 5 días con NaCl 250 mM. En cambio, la expresión de Srx es casi basal en hoja sometida a tratamiento salino durante 11 días. En raíz, se incrementa ligeramente la expresión en función del tratamiento.

Mediante Western blot de las proteínas solubles de extractos de hoja y raíz de plantas de guisante sometidas a estrés salino, se estudió la expresión de la 2-Cys Prx cloroplástica (total y sobreoxidada), la Prx IIC citosólica, la Prx IIF mitocondrial y la Srx, mediante el uso de anticuerpos específicos frente a las mismas (Fig. 102).



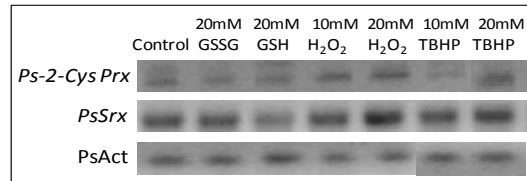
**Figura 102.- Niveles de expresión traduccional del sistema Prx/Srx en plantas de guisante sometidas a estrés salino.** Expresión proteica de 2-Cys Prx, 2-CysPrx IIF y Srx obtenida por Western blot de hoja y raíz de guisantes de 15 y 21 días sometidos a tratamiento con NaCl 200 ó 250 mM durante 5 y 11 días, utilizando anticuerpos específicos frente a la 2-Cys Prx total y sulfínica, la Srx, la Prx IIC y Prx IIF.

Los niveles de expresión proteica de las Prxs cloroplastídica, citosólica y mitocondrial estudiadas, se ven incrementados ligeramente en hoja tras estrés salino de 5 días, con un incremento mayor en el caso de 11 días, sin apreciarse diferencias entre 200 y 250 mM. En cambio, donde sí se encuentra diferencia de expresión, es en la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx, que sólo es apreciable en hoja de plantas tratadas durante 5 días con 250 mM o durante 11 días tratadas con NaCl 200 ó 250 mM. La Srx sólo se expresa en condiciones de estrés salino, siendo algo mayor a los 11 días con 250 mM de sal. Ni la 2-Cys Prx cloroplastídica ni la Srx se observan en raíz de plantas tratadas o sin tratar, mientras que los niveles de Prx IIC apenas varían y la Prx IIF se incrementa bajo estrés con 200 mM de sal.

### **23.2.- Otros tipos de estrés oxidativo**

Para completar el estudio del sistema antioxidante Prx / Srx, se realizaron diferentes tipos de estrés oxidativo mediante aplicación en spray a plantas de guisante y se analizaron los niveles transcripcionales de la 2-Cys Prx y la Srx mediante PCR semicuantitativa, utilizando como gen constitutivo la actina (Fig. 103).

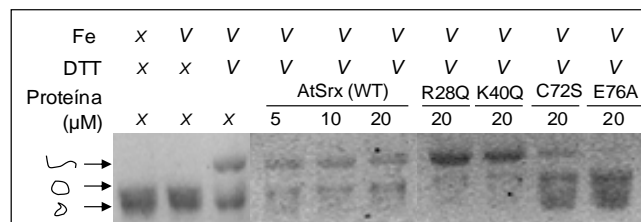
La expresión a nivel transcripcional de la 2-Cys Prx se observa incrementada tras la aplicación de tratamientos oxidantes fuertes, como son H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 ó 20 mM y TBHP 20 mM, mientras que mediante glutatión oxidado no se observa incremento. De forma similar le sucede a los niveles de transcrito de la Srx, que se incrementan tras 24 h de estrés oxidativo. En cambio, el tratamiento con 20 mM de glutatión reducido produce un ligero descenso en los niveles de transcrito tras 24 h de aplicación en hojas de guisante.



**Figura 103.- Niveles de expresión transcripcional del sistema Prx/Srx en hojas de plantas de guisante sometidas a diferentes tipos de estrés oxidativo.** Expresión de RNAm de 2-Cys Prx y Srx por PCR semicuantitativa de hoja de guisante de 15 días después de 24 h de estrés por glutatión oxidado (GSSG) o reducido (GSH), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o terc-butil hidroperóxido (TBHP). Act, actina.

## **24.- Ensayo de interacción a DNA de la Srx**

Para estudiar la capacidad de protección del DNA por parte de la Srx, se emplearon condiciones que favorecen la producción de radicales libres que dañan al DNA en presencia de la proteína recombinante. La presencia de un metal (Fe) y un reductor (DTT) favorece la producción de  $OH\cdot$  como resultado de la reacción de Fenton, que origina daño al DNA, el cual puede observarse mediante análisis electroforético (Fig. 104).



**Figura 104.- Interacción-protección de la AtSrx y sus mutantes al DNA plasmídico.** Electroforesis en gel de agarosa del plásmido tras incubación *in vitro* en condiciones que favorecen la reacción de Fenton, en presencia de AtSrx “wild type” (WT) o sus mutantes R28Q, K40Q, C72S o E76A. Tras tinción con bromuro de etidio, se observaron las formas plasmídicas lineal, circular y superenrollada.

Como se puede observar, la presencia de distintas concentraciones de AtSrx “wild type” en la reacción, no previene el daño a DNA, ya que se observa la forma lineal y circular del plásmido. Los mutantes R28Q-AtSrx y K40Q-AtSrx tampoco protegen del daño a DNA debido a que aparece la forma lineal plasmídica. En cambio, con los mutantes C72S-AtSrx y E76A-AtSrx se observa una protección del daño sobre el DNA plasmídico al encontrarse en la

forma lineal y superenrollada, tal y como sucede en los controles en ausencia de Fe y/o DTT, donde no tiene lugar la generación de ROS por medio de la reacción de Fenton.

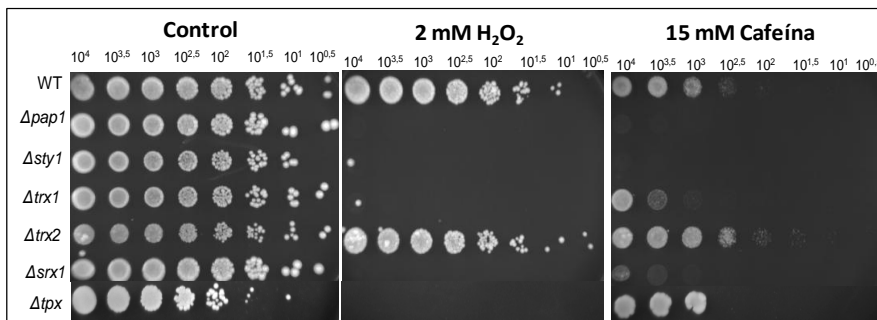
## **25.- Estudio del sistema Prx-Srx en levaduras**

El empleo de las levaduras de fisión como modelo es una herramienta muy útil para estudiar el sistema Prx / Srx y las cascadas de señalización en eucariotas, así como su implicación en respuesta a estrés oxidativo.

### **25.1.- Respuesta al estrés del sistema Prx / Srx**

En estudios de viabilidad de cepas de *S. pombe* que contienen deleciones en genes implicados en la eliminación de ROS, se estudió la importancia en situaciones de estrés oxidativo. Para ello, se analizó mediante crecimiento de diluciones en “spots” en placa, la sensibilidad de estas cepas al peróxido de hidrógeno y a la cafeína. La cafeína es una droga tóxica de efectos pleiotrópicos celulares y mecanismo de acción desconocido, y entre sus efectos está la producción de ROS.

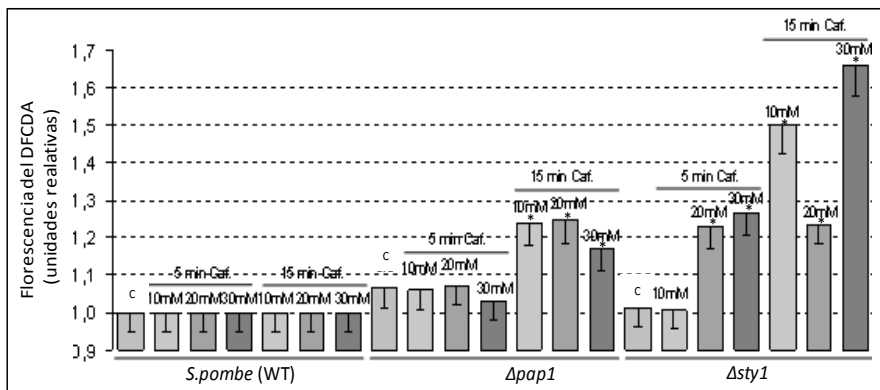
Mediante crecimiento en placa, en medio rico con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM o cafeína 15 mM, de diluciones seriadas de cepas con deleciones en los genes de *S. pombe* que codifican para Pap1, Sty1, Trx1 y 2, Srx1 y Tpx, se estudió su sensibilidad a estrés oxidativo en comparación con la “wild type” (WT) (Fig. 105).



**Figura 105.- Estudio de viabilidad a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína en cepas de *S. pombe* con deleciones del sistema Prx/Srx/Trx. Diluciones seriadas en placas de medio rico (YE5S) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM ó cafeína 15 mM con cepas delecionadas en pap1, sty1, trx1, trx2, srx1 y tpx. Como control, se utilizó la cepa silvestre (WT).**

En comparación con la cepa salvaje (WT), las cepas que no poseen el factor de transcripción Pap1 y la MAPK Sty1, involucradas en la respuesta a estrés en levadura, muestran una gran sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína. La cepa con delección en la tioredoxina citosólica ( $\Delta trx1$ ) y la sulfirredoxina ( $\Delta srx1$ ) y peroxirredoxina ( $\Delta tpx$ ), son sensibles a ambos tratamientos por su sensibilidad a estrés oxidativo, mientras que la  $\Delta trx2$  no presenta sensibilidad. La cepa  $\Delta tpx$  crece con dificultad en condiciones aeróbicas.

La producción de ROS como consecuencia del estrés por cafeína se determinó mediante cuantificación en FACS por fluorescencia con DFCD. Usando como control la cepa silvestre (WT), que fue tratada con cafeína junto a las cepas  $\Delta pap1$  y  $\Delta srx1$  durante 5 y 15 min., se cuantificaron los niveles de ROS (Fig. 106).

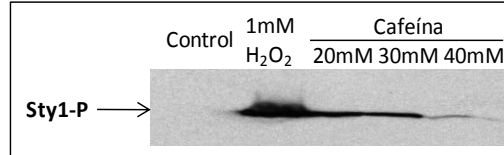


**Figura 106.- Medida de los niveles de ROS producido en WT,  $\Delta pap1$  y  $\Delta srx1$  tras tratamiento con cafeína.** Determinación de fluorescencia con DFCD tras tratamiento de 5 ó 15 min. Con cafeína 10, 20 ó 30 mM en medio rico (YE5S) líquido. Como controles (c), se utilizaron las cepas sin tratamiento con cafeína. Los asteriscos señalan los valores estadísticamente significativos de los valores medios  $\pm$ SD representados.

La gráfica muestra el incremento significativo de ROS en  $\Delta pap1$  tras 15 min. de tratamiento con cafeína, y en la  $\Delta srx1$  con cafeína 20 y 30 mM durante 5 minutos. Además, se observan unos niveles basales (control) elevados de ROS en la cepa con delección en Pap1. Sin embargo, en la cepa silvestre (WT) no se incrementan los niveles de producción de ROS como consecuencia del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de cafeína.

### 25.1.1.- Activación de Sty1

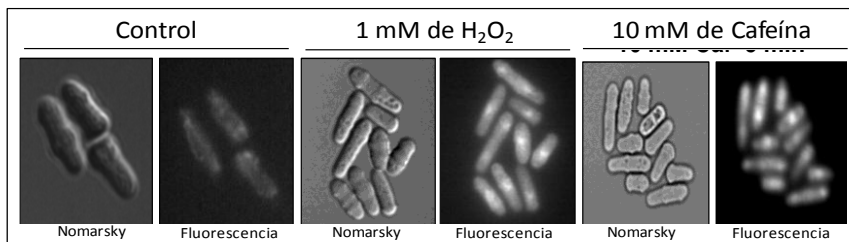
La activación por estrés oxidativo de la MAPK Sty1 por fosforilación puede estudiarse mediante Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la kinasa fosforilada de extractos de levadura tratados durante 5 min. con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o cafeína (Fig. 107).



**Figura 107.- Activación de Sty1 por estrés oxidativo.** Western blot de extractos de levadura tratada 5 min. con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o cafeína, utilizando el anticuerpo específico anti-p38 para estudiar la fosforilación de Sty1.

La activación de la MAPK Sty1 por fosforilación es máxima a 1 mM de peróxido de hidrógeno, mientras que dicha fosforilación se produce a concentraciones de cafeína 20-30 mM, y sin embargo a concentraciones mayores disminuye su activación.

La activación de Sty1 produce su transporte al núcleo para activar factores de transcripción como Atf1, que activa la transcripción de genes para responder a la situación de estrés, como la transcripción de la Srx1. Su localización nuclear se estudia en cepas de *S. pombe* con la construcción GFP-Sty1 (EHH5) por microscopía de fluorescencia, sometidas a tratamiento con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10 mM de cafeína (Fig. 108).

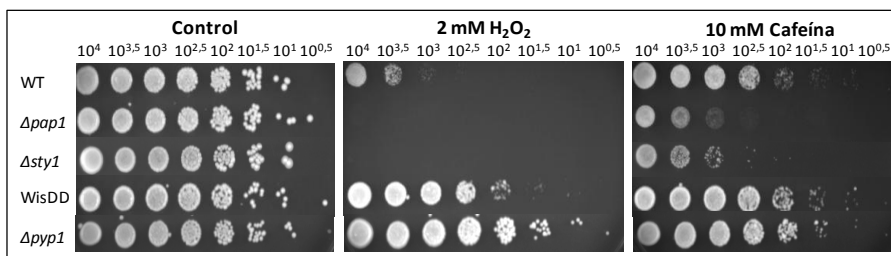


**Figura 108.- Transporte nuclear de Sty1 por estrés oxidativo.** Fluorescencia de GFP-Sty1 de la cepa EHH5 tras 5 min. de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM ó cafeína 10 mM .



El transporte de Sty1 al núcleo se observó tras un estrés de 5 min. en medio líquido con  $H_2O_2$  1 mM o con cafeína 10 mM, donde se produce la fluorescencia en la zona central de la levadura de fisión.

La construcción de cepas que contienen una activación basal de Sty1 por mutación de una kinasa de la ruta de activación (WisDD) o de una cepa que contiene deleccionado el gen de la fosfatasa responsable de la inactivación de Sty1 ( $\Delta Pyp1$ ), hacen posible el estudio del papel de la activación de Sty1, responsable de la activación del factor de transcripción de la Srx1, en la resistencia al estrés oxidativo (Fig. 109).

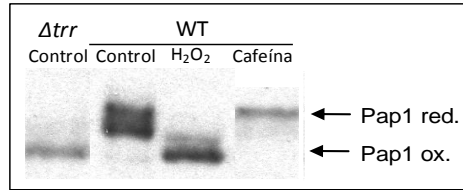


**Figura 109.- Estudio de viabilidad a estrés por  $H_2O_2$  y cafeína en cepas de *S. pombe* con sobreactivación de Sty1.** Diluciones seriadas en placas de medio rico (YE5S) con  $H_2O_2$  2 mM ó cafeína 15 mM con cepas deleccionadas en *pap1*, *sty1* y *pyp1*, y con mutación en *Wis* (*WisDD*). Como control, se utiliza la cepa silvestre (WT).

Como se observa en la figura 109, la sobreactivación de Sty1, mediante la mutación de Wis (*WisDD*) o la deleción de Pyp1 ( $\Delta pyp1$ ) confiere una mayor resistencia a estas cepas en condiciones de crecimiento en placa con medio rico (YE5S) conteniendo  $H_2O_2$  y cafeína, mientras que las deleciones en Pap1 y Sty1 presentan mayor sensibilidad al estrés oxidativo que la cepa silvestre (WT).

### 25.1.2.- Activación de Pap1

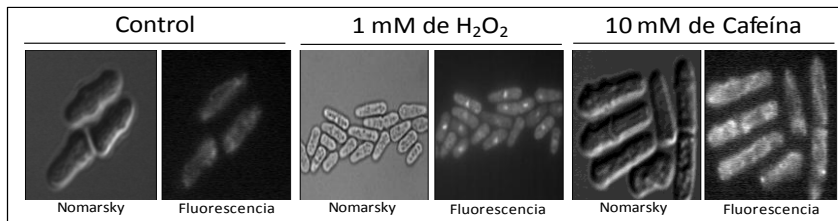
Para estudiar el papel del factor de transcripción Pap1 de *S. pombe*, se trataron las levaduras con  $H_2O_2$  y cafeína, y se analizó, mediante Western blot de sus extractos, la activación por oxidación de esta proteína (Fig. 110), utilizando como control la cepa que contiene deleccionado el gen que codifica la tiorredoxin reductasa (*Trr*), la cual posee una activación basal de Pap1.



**Figura 110.- Activación de Pap1 por estrés oxidativo.** Western blot de extractos de levadura con o sin tratamiento de 5 min. con  $H_2O_2$  0.2 mM ó cafeína 10 mM, utilizando el anticuerpo específico frente Pap1 para estudiar su activación por oxidación. Como control, se utiliza la cepa  $\Delta trr$ .

La oxidación de Pap1 se produce mediante la formación de puentes disulfuro intramoleculares, que permiten visualizar la banda correspondiente a la proteína, detectada mediante su anticuerpo específico, algo más baja, como ocurre con la  $\Delta trr$ , que la banda de Pap1 oxidada que se observa en la cepa “wild type” sin tratamiento de estrés (WT control). El tratamiento con dosis bajas de  $H_2O_2$  (0.2 mM) produce la activación de Pap1 por oxidación. En cambio, el tratamiento con cafeína no produce la oxidación de este factor de transcripción.

La activación de Pap1 por oxidación, produce el transporte al núcleo de dicho factor de transcripción para activar la expresión de proteínas, tales como Tpx (Prx de *S. pombe*). Dicho transporte puede visualizarse mediante microscopía de fluorescencia de la cepa que contiene la construcción GFP-Pap1 (EHH14) y estudiar su localización tras el estrés oxidativo por  $H_2O_2$  ó cafeína (Fig. 111).

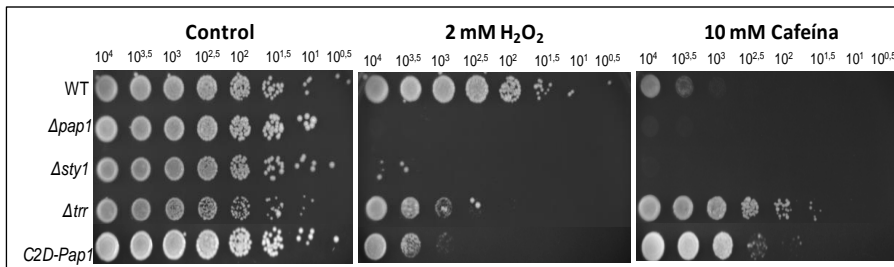


**Figura 111.- Transporte nuclear de Pap1 por estrés oxidativo.** Fluorescencia de GFP-Pap1 de la cepa EHH14 tras 5 min. de tratamiento con  $H_2O_2$  0.2 mM ó cafeína 10 mM .

La localización de Pap1 en el núcleo se produce por el tratamiento de bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, observándose la fluorescencia en núcleo tras 5 min. de tratamiento con  $H_2O_2$  0.2 mM. En cambio, tras 5 min.

de tratamiento con cafeína 10 mM, no se observó la presencia de Pap1 en el núcleo.

Se estudió la resistencia de cepas de *S. pombe* con sobreactivación basal de Pap1, para observar su comportamiento al estrés oxidativo al crecer en medio rico (YE5S) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína (Fig. 112).



**Figura 112.- Estudio de viabilidad a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína en cepas de *S. pombe* con sobreactivación de Pap1.** Diluciones seriadas en placas de medio rico (YE5S) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM ó cafeína 10 mM con cepas delecionadas en *pap1*, *sty1* y *trr*, y con mutación en *Pap1* (C2D-Pap1). Como control, se utiliza la cepa silvestre (WT).

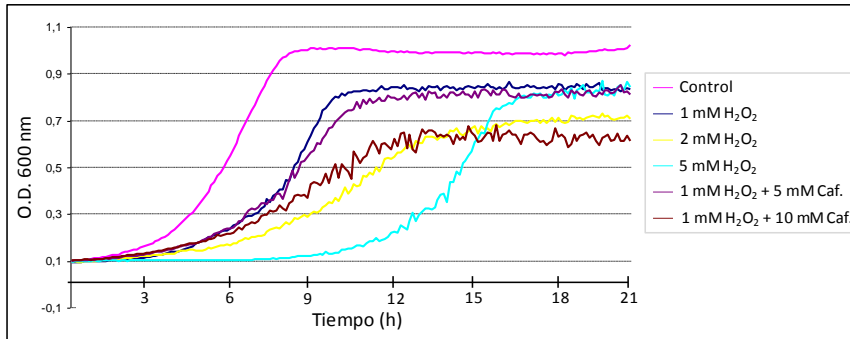
La activación de Pap1 basal localizado en el núcleo, ocurre en la cepa que contiene la deleción del gen de la tiorredoxina reductasa ( $\Delta trr1$ ) y en el mutante de Pap1 que contiene un cambio aminoacídico en la región de exporte nuclear (C2D-Pap1). Estas cepas mostraron una resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y a cafeína mayor que la cepa silvestre (WT). Sin embargo, la cepa  $\Delta trr1$ , debido a que posee el sistema redox de la célula deteriorado, no manifestaron resistencia a peróxido de hidrógeno.

## 25.2.- Influencia del estrés oxidativo en el crecimiento y muerte celular de *S. pombe*

Para estudiar cómo se afectan las cepas que contiene deleciones en genes que codifican proteínas del sistema Prx / Srx bajo condiciones de estrés oxidativo, causado por agentes oxidantes o drogas, se analizó la influencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o cafeína en el crecimiento y reproducción de dichos mutantes.

### 25.2.1.- Curvas de crecimiento

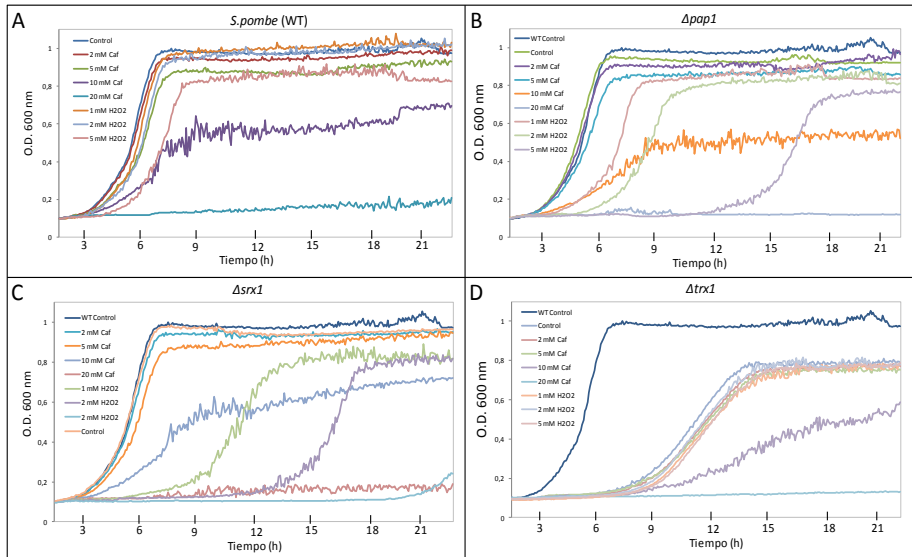
Mediante la representación gráfica de la curva de crecimiento de la cepa salvaje de *S. pombe* (WT) en cultivo de medio rico (YE5S) líquido, se estudió cómo le afecta la presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y/o cafeína (Fig. 113).



**Figura 113.-** Curva de crecimiento de *S. pombe* “wild type” en condiciones de estrés oxidativo. Representación de la D.O. a 600 nm durante el tiempo de crecimiento en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y/o cafeína.

En la gráfica se observa un retraso en el crecimiento de la levadura en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se potencia al adicionar cafeína al medio. El inicio de la división con peróxido de hidrógeno es algo tardío, y en combinación con cafeína se retrasa el ciclo celular, o lo que es lo mismo, se alarga el tiempo de división. Además, se observó una disminución de la máxima D.O. a 600 nm y una menor pendiente en la curva de crecimiento.

En la figura 114, se comparan las curvas de crecimiento de las cepas delecionadas en los genes que codifican Pap1, Srx1 y Trx1, con las de la cepa silvestre de *S. pombe* (WT), al crecer en medio rico (YE5S) con diferentes concentraciones de cafeína o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 110).

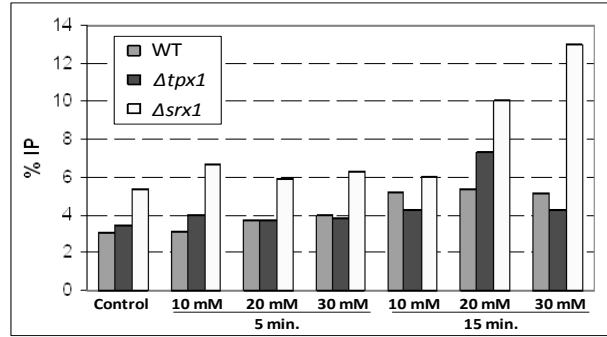


**Figura 114.-** Curvas de crecimiento de cepas de *S. pombe* tratadas con cafeína o  $H_2O_2$ . A. Cepa silvestre de *S. pombe* (WT). B.  $\Delta pap1$ . C.  $\Delta srx1$ . D.  $\Delta trx1$ .

La cepa  $\Delta pap1$  (Fig. 114.B) presentó un crecimiento celular afectado en condiciones de estrés oxidativo, debido a que se observa un enlentecimiento con  $H_2O_2$  y una menor tasa de división en presencia de cafeína, en comparación con la cepa silvestre de *S. pombe* (WT) (Fig. 114.A). La cepa que posee deleciónado el gen que codifica la *Srx1* (Fig. 114.C) fue más sensible a altas concentraciones de  $H_2O_2$  y cafeína, teniendo un importante retraso en su crecimiento, e incluso, llegando a tener inhibido su crecimiento a las 24 h de tratamiento con cafeína 20 mM. La  $\Delta trx1$  (Fig. 114.D) presenta un retardo en el inicio de la división celular similar para los tratamientos ensayados.

#### 24.2.1.- Muerte celular

Para conocer el papel de *Pap1* y *Sty1* en relación con la defensa de la célula frente a tratamiento por una droga generadora de ROS, se estudió la muerte celular en FACS de las cepas de *S. pombe* deleciónadas en dichos genes bajo tratamiento con cafeína (Fig. 115).



**Figura 115.- Papel de Tpx y Srx1 en la muerte celular por cafeína en *S. pombe*.** Respuesta de la cepa WT,  $\Delta tpx1$  y  $\Delta srx1$  al tratamiento con cafeína 10, 20 ó 30 mM durante 5 ó 15 min. Se representa el valor medio de 3 experimentos independientes.

El estudio de la muerte celular de las cepas  $\Delta tpx$  y  $\Delta srx1$  tratadas con cafeína a diferentes concentraciones y tiempos, manifestó la sensibilidad de estas cepas delecionadas al tratamiento de la droga, debido a que se observa una mayor proporción de células muertas. Los valores de muerte celular no se ven incrementados tras 5 min. de tratamiento. En cambio, tras 15 min., en  $\Delta tpx1$  con cafeína 20 mM y en  $\Delta srx1$  con 30 mM, se produce un incremento de la muerte de estas células significativo, llegando a duplicarse la tasa de mortalidad en esta última.

## **DISCUSIÓN**





En los últimos años, desde su descubrimiento en levadura (Biteau *et al.*, 2003), la sulfirredoxina (Srx) ha generado una especial atención al ser una enzima capaz de reducir la forma sulfínica de algunas Prxs típicas, supuestamente inactivas de forma irreversible. Su presencia exclusiva en eucariotas y la posibilidad de estar implicada en importantes patologías humanas, hace que su caracterización tenga una gran relevancia.

En nuestro laboratorio, se ha venido trabajando, en los últimos años, en las peroxirredoxinas (Prxs) vegetales, concretamente en la 2-Cys Prx cloroplastídica, la Prx II citosólica y la Prx IIF mitocondrial. Estas enzimas han sido ampliamente caracterizadas desde un punto de vista bioquímico y molecular, describiendo su importancia, en vegetales superiores, en la eliminación de ROS. Clásicamente se ha trabajado en *Pisum sativum* (guisante) como planta modelo, por su fácil manejo y su importancia agroeconómica. En tesis anteriores en nuestro grupo, ha sido descrito el sistema Prx/Trx del cloroplasto y mitocondria, realizando estudios sobre actividad, estructura, oligomerización y regulación de estas enzimas (Bernier-Villamor *et al.*, 2004; Barranco-Medina *et al.*, 2006, 2007, 2008, 2009; Martí *et al.*, 2009).

La importancia del sistema antioxidante formado por la Prx y Srx, unido a su novedad, hizo que nos implicáramos en el estudio bioquímico y molecular del sistema, tanto en vegetales clásicos (guisante), como en organismo modelo (*Arabidopsis thaliana*), así como en un eucariota unicelular (levadura, *S. pombe*). De esta manera, mediante técnicas de biología molecular, proteómica, bioquímica, termodinámica y de biología celular, se ha desarrollado un amplio estudio del sistema Prx/Srx.

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral supone el primer estudio sobre la caracterización sistemática de una Srx de plantas. Se ha desarrollado un nuevo método para la determinación de su actividad, se han investigado nuevas Prxs diana que, en forma de ácido sulfínico, puedan ser reducidas por la Srx de manera ATP dependiente y se ha estudiado su mecanismo de acción y regulación.

A pesar del avance en el conocimiento científico del sistema Prx/Srx en los últimos años, son muchos aspectos los que aún quedan por investigar para conocer en profundidad el papel biológico de la Srx en eucariotas, e incluso llegar a determinar su posible potencial como agente terapéutico (Findlay *et al.*, 2005)

## **1.- Aislamiento del cDNA que codifica la PsSrx y análisis de la secuencia**

La disponibilidad en las bases de datos de secuencias correspondientes de la Srx de diversos organismos, así como la presencia de dominios peptídicos altamente conservados en estas secuencias, nos permitió el diseño de oligonucleótidos heterólogos para la obtención del cDNA que codifica la Srx de *P. sativum* mediante PCR. Se obtuvo inicialmente parte de esta secuencia, lo que permitió el diseño de nuevos oligonucleótidos homólogos para la obtención de los extremos 5' y 3' de dicha secuencia, mediante 5'-RACE y PCR respectivamente. La secuenciación de los productos obtenidos, reveló la existencia de una pauta abierta de lectura contenida en el mRNA de guisante que codificaba una Srx (PsSrx; número de acceso GU223224).

La pauta abierta de lectura del gen *PsSrx* con 399 pb codifica una proteína de 133 aa que mostraba una identidad nucleotídica del 90% con la Srx de *Arabidopsis thaliana* (*AtSrx*). Esta elevada identidad, similar a nivel aminoacídico, desvela un alto nivel de conservación entre las Srxs vegetales. La proteína contiene en su extremo amino (NH-terminal) un péptido señal de 26 aminoácidos, que al ser escindido da lugar a la obtención de una proteína madura de 107 aa con un punto isoelectrónico teórico de 9.86 y una masa molecular de 14538 Da, similar a la *AtSrx* (Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

El péptido señal de la PsSrx presenta las características típicas de los péptidos de importe dual a cloroplastos y mitocondrias (Pujol *et al.*, 2007; Mitschke *et al.*, 2009), siendo ricos en aminoácidos polares como serina (23%) y deficientes en aminoácidos ácidos como el ácido glutámico (0%). Mediante predicción de localización subcelular, los programas bioinformáticos proporcionaron valores alrededor del 50% para el importe de la PsSrx naciente al cloroplasto y mitocondria, mientras que el análisis del péptido señal de la *AtSrx* dio una probabilidad del 55% y 85% para importe a cloroplasto y mitocondria, respectivamente. Mediante predicción dual con el programa MultiLoc/TargetLoc, se obtuvieron unos valores del 97% y 70% de importe dual cloroplasto-mitocondria para la PsSrx y *AtSrx*, respectivamente.

Las Srxs presentan un elevado grado de homología debido a que se encuentran muy conservadas. Sólo están presentes en eucariotas, donde poseen un centro activo formado por un péptido conservado (FG/SCHRY) en la Srx de plantas (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007).

La PsSrx, al igual que la AtSrx, presenta una cisteína conservada dentro de su centro catalítico (Cys 72) responsable de su actividad, además de otra cisteína no catalítica (Cys 88) que no está presente en la sulfiredoxina humana (hSrx). Sin embargo, estas dos cisteínas pueden estar implicadas en la formación de la Srx oxidada, tal y como sucede en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), donde la Srx, tras reducir la forma sulfínica de la Prx, forma un puente disulfuro intramolecular entre la cisteína 48 y la cisteína 84, que puede ser reducido por la Trx (Roussel *et al.*, 2009).

Mediante la cisteína catalítica, la Srx vegetal puede formar un puente disulfuro intermolecular que da lugar a una forma oxidada de la enzima en su estado dimérico, tal y como se observa tras análisis electroforético (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras (Fig. 34).

## **2.- Obtención de PsSrx, AtSrx y sus mutantes recombinantes**

Existen numerosos sistemas de expresión en *E. coli* que permiten obtener unos importantes niveles de expresión de proteína recombinante a partir del gen de interés. Los sistemas de expresión basados en la transcripción por parte de la enzima T7-RNA polimerasa son los más usados debido a los buenos resultados de expresión que producen.

Utilizando el sistema pET (Studier y Moffatt, 1986), la AtSrx madura y naciente (con péptido señal en el extremo amino), así como la PsSrx y las proteínas mutantes de *A. thaliana* C72S, R28Q, K40Q, E76A y R28Q/E76A, alcanzaron unos niveles de expresión entre el 40-50% del total de proteínas. En algunos casos, la sobreexpresión de proteínas recombinantes resulta tóxica para las bacterias y son englobadas en cuerpos de inclusión. Entre un 30% para la R28Q-AtSrx y un 70% en el caso de la K40Q-AtSrx, fueron englobadas en cuerpos de inclusión junto a chaperonas bacterianas, lo cual hizo necesario desarrollar un protocolo de extracción de proteína activa en condiciones desnaturizantes. Las condiciones de sobreexpresión fueron óptimas a 37°C durante 5 horas, conteniendo todas ellas una His-tag que aumentó los niveles de expresión y solubilidad.

La Srx obtenida resultó ser una proteína de baja estabilidad en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7.5), pudiendo conservarse durante unos meses a 4°C. La presencia de alguno de sus substratos (ATP o cationes bivalentes) o de tampón fosfato, permite estabilizar la proteína (Jönsson *et al.*, 2008b). Sin embargo,

estas condiciones no son óptimas para la determinación de actividades enzimáticas o cristalización.

El protocolo de purificación desarrollado consta de dos pasos cromatográficos basados en una cromatografía de afinidad en columna de níquel y en una cromatografía de intercambio iónico en columna MonoQ. El primero de los pasos de purificación aprovecha el diseño de una cola de polihistidinas en dichas proteínas, con la que se eliminan gran parte de impurezas. Para obtener una elevada pureza, se realizó la segunda de las etapas, tras ser dializada la muestra para eliminar las sales. La Srx eluyó de la columna de intercambio iónico, en la que quedó retenida, aproximadamente a una concentración de NaCl 0.2 M. La elevada hidrofobicidad de estas proteínas y su marcada inestabilidad, hizo que otros sistemas de purificación, como la cromatografía hidrofóbica, no fuesen adecuados.

El comportamiento de la Srx de *A. thaliana* y sus mutantes, así como el de la Srx de guisante, fue muy similar a la hora de la purificación, aunque no en lo que se refiere a su estabilidad. De entre las proteínas recombinantes obtenidas, la C72S-AtSrx fue la que presentó una mayor tendencia a precipitar. Este hecho ha llevado a otros grupos de investigación a no poder obtener la Srx recombinante purificada, siendo ésta la primera vez que se obtienen estas proteínas recombinantes en estado homogéneo (Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

Para la obtención de otras proteínas recombinantes necesarias para los ensayos *in vitro* (Prxs y Trxs vegetales), se han utilizando las construcciones previamente elaboradas en nuestro laboratorio, siguiendo los pasos desarrollados para la sobreexpresión y los diferentes protocolos puestos a punto para su purificación, tal y como se describe en las Tesis Doctorales de Bernier-Villamor (2004) y Barranco-Medina (2006).

### **3.- Análisis bioquímico de la Srx de plantas y sus mutantes**

Mediante determinación cromatográfica, la Srx de *A. thaliana* y de guisante presentan un tamaño molecular aproximado de 14 kDa y un radio de Stokes de 13.9 Å. Mediante análisis electroforético (SDS-PAGE), se observan dos bandas correspondientes a las formas monoméricas reducidas y oxidadas (formas predominantes), pudiendo presentar una forma oxidada dimerica de aproximadamente 28 kDa (Fig. 34).

El potencial redox determinado para la AtSrx y sus mutantes es muy similar, con valores muy electronegativos (-340 mV) debido a la presencia de la cisteína catalítica. Los valores de potencial redox descritos para la 2-Cys Prx (-315 mV) y Prx IIF (-309 mV) de guisante son menos electronegativos (Barranco-Medina *et al.*, 2008; Collin *et al.*, 2004), lo que indica la posibilidad de la actividad reductora de la Srx sobre estas proteínas.

La Srx de plantas presenta dos grupos -SH expuestos, correspondientes a las cisteínas 72 y 88. En cambio, el mutante E76A-AtSrx sólo presenta un grupo -SH expuesto, debido a un cambio conformacional producido en su estructura como consecuencia del cambio del ácido glutámico, el cual no está presente en la hSrx donde corresponde a la alanina 103. Según esto, la Srx de plantas y la hSrx podrían presentar un mecanismo de acción y una estructura diferente.

La actividad de la Srx ha sido determinada previamente mediante dos diferentes técnicas que han dado lugar al desarrollo de diferentes métodos. Una de ellas consiste en la detección y cuantificación del estado redox de la Prx mediante la reacción con el AMS que alquila selectivamente los grupos -SH (Biteau *et al.*, 2003), o mediante el análisis por Western blot utilizando anticuerpos específicos frente a la forma sobreoxidada de la Prx (Woo *et al.*, 2003b). Las otras técnicas utilizadas están basadas en la hidrólisis del ATP por la actividad ATPasa de la Srx. Jeong *et al.* (2006) han determinado dicha actividad mediante la determinación cromatográfica del fosfato liberado ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) utilizando ATP marcado radiactivamente y cuantificando en contador de centelleo líquido. Posteriormente, Roussel *et al.* (2008) acoplaron la hidrólisis del ATP al sistema de reciclado de la Trx, determinando la actividad Srx mediante monitorización de la oxidación del NADPH. Más recientemente, Kim *et al.* (2009) han desarrollado un método colorimétrico para la determinación del fosfato inorgánico utilizando el colorante verde malaquita.

Para la determinación de la actividad enzimática de la Srx, se han desarrollado dos nuevos métodos basados en la hidrólisis de ATP. Uno se basa en la oxidación del NADH, ligada a la formación del ADP, acoplando la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato y posteriormente a lactato en reacciones catalizadas por la piruvato kinasa y láctico deshidrogenasa respectivamente. El segundo método se basa en la formación de un fosfomolibdato entre el molibdato y el fosfato resultante de la hidrólisis del ATP. Con ambos métodos se obtuvieron resultados similares (Tabla 13), mostrando, además, el método colorimétrico una buena correlación con la

determinación de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx con anticuerpos específicos (Fig. 58). Adicionalmente se ha determinado la actividad Srx mediante el método cromatográfico desarrollado por Jönsson *et al.*, (2005).

La Srx de plantas, al igual que la Srx de mamíferos y humanos, da lugar a la reducción de la forma sulfínica de la Prx en un proceso lento y dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$ , en el que en presencia de reductor, la concentración final de  $P_i$  es igual a la concentración de la forma sulfínica de la Prx presente en la reacción. En cambio, en ausencia de un reductor, se produce un ciclo fútil en el que la liberación de  $P_i$  es mayor que la concentración de Prx-SO<sub>2</sub>H (Fig. 59).

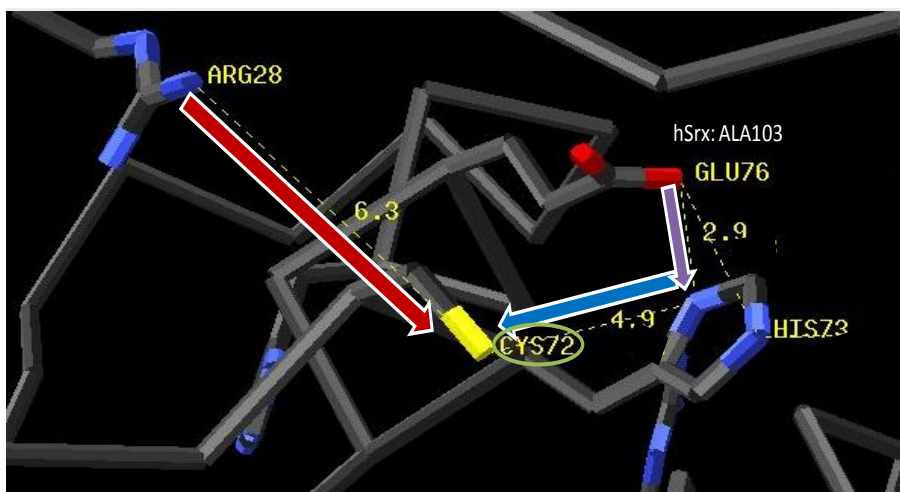
Para conocer la implicación, en el mecanismo de acción, de los aminoácidos conservados en la Srx se han obtenido cinco variantes por mutagénesis dirigida. El cambio de la cisteína 72 por serina (C72S-AtSrx) anuló la actividad, tal y como era de esperar, confirmando su papel crítico en la hidrólisis del ATP. El mismo resultado ha sido obtenido por Jönsson *et al.* (2005) para la Srx humana, hSrx (C99S) y Jeong *et al.* (2006) para la Srx de rata, rSrx (C98S). Sin embargo, el mutante E76A-AtSrx mantuvo la misma actividad que la proteína silvestre de *A. thaliana*, lo cual se podía prever, dado que este cambio supone la introducción de un aminoácido presente en la humana.

El mutante K40Q mantiene aproximadamente un 60% de la actividad de la AtSrx WT, debido a que el aminoácido mutado es uno de los implicados en la unión de la Srx al ATP (Jeong *et al.*, 2006). Por otro lado, la mutación de la arginina 28 por glutamina (R28Q-AtSrx) produjo un descenso de la actividad del 40% respecto a la de la AtSrx WT, mientras que este mismo residuo mutado en la hSrx (R51Q) llevó a la inactivación total de la enzima (Jeong *et al.*, 2006). Este hecho hace pensar en la posibilidad de una vía alternativa en la activación de la cisteína catalítica por parte de residuos cercanos presentes en la Srx de plantas y que no se encuentran en la hSrx.

La hipótesis de activación de la cisteína por medio de un ataque nucleofílico de la arginina, ha sido descrito en otras enzimas, tales como las peroxirredoxinas (Wood *et al.*, 2003a) o las metioninas sulfóxido reductasas (Lowther *et al.*, 2002). De hecho, los valores de predicción del  $pK_a$  por el servidor PROPKA (Li *et al.*, 2005) para la cisteína catalítica humana (Cys99) es de 4.98, formando un puente de hidrógeno con la arginina 51 y la serina 55, siendo los principales responsables de la elevada nucleofilia de la cisteína 99.

El modelo estructural originado de la AtSrx a partir de las estructuras existentes de la hSrx (PDB 1xw3 y 3cyi) con una desviación por RMS de 0.87 Å, permitió el análisis de los residuos involucrados en la activación de la cisteína 72 de la AtSrx. Se identifica a la arginina 28 como el principal responsable del bajo valor de  $pK_a$  para el modelo basado en la Srx humana que cuenta con un valor de  $pK_a$  muy alejado. El estudio de ambos modelos, reveló que la única diferencia era la posición del grupo -SH. Sorprendentemente, el modelo basado en el mutante Cys99S-hSrx mostró un comportamiento diferente, siendo la histidina 73 y la treonina 33 los dos residuos principales en la contribución al  $pK_a$ . Además, el grupo -SH de la cisteína catalítica en la AtSrx se encuentra dirigido hacia la histidina 73, la cual muestra un valor de  $pK_a$  de 7.22, alejado del valor estándar de la histidina, que es de 6.5, como consecuencia de la interacción con el ácido glutámico (E76) (Fig. 116).

Se realizó el análisis estructural en busca de residuos cercanos a la cisteína72, como es el caso de la histidina 73, la cual puede ser atacada nucleofílicamente por el ácido glutámico (E76) exclusivo de la Srx vegetal. La histidina 73 puede atacar a su vez a la cisteína catalítica. Esto constituye una posible vía de activación de la cisteína 72 de la Srx de plantas alternativa a la activación vía arginina 28 (Fig. 116). La ruta alternativa de activación vía par glutámico-histidina, explicaría la actividad residual del R28Q-AtSrx y la ausencia de la misma en la R51Q-hSrx (Jeong *et al.*, 2006).



**Figura 116.- Esquema sobre el modelo estructural de la AtSrx de la vía de activación secundaria de la cisteína catalítica vía glutámico-histidina.**

Con objeto de confirmar esta hipótesis, se obtuvo el doble mutante R28Q/E76A-AtSrx, que resultó completamente inactivo, confirmando de esta manera la hipótesis de la existencia de un mecanismo de activación alternativo en la Srx de *A. thaliana* (Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

El trío de activación catalítica descrito en la AtSrx, asumible en la PsSrx, de idéntica secuencia aminoacídica, y posible en todas las Srx vegetales, a diferencia de la hSrx, es un modelo de activación que está descrito en las cisteínas de peptidasas de picornavirus (picornains 2A y 3C). Sin embargo, las cistein proteasas realizan el ataque del sustrato mediante el par iónico tiolato-imidazol, siendo esencial para la actividad el componente ácido (Polgár, 2005).

Por otro lado, las mutaciones dirigidas de la cisteína 72 y del glutámico 76 de la Srx de *A. thaliana*, provocaron su interacción con el DNA, evitando el daño de este frente a ROS. La interacción del DNA con estas proteínas concretas, puede ser debido a la homología existente entre la proteína bacteriana de partición de cromosoma ParB y la C72S-AtSrx o E76A-AtSrx. La homología entre la hSrx y ParB ha sido descrita como una posible consecuencia evolutiva de la proteína bacteriana (Basu y Koonin, 2005). Las mutaciones de la cisteína catalítica y del ácido glutámico, involucrado en la activación de la vía alternativa, pueden dar lugar a cambios conformacionales y/o funcionales que la asemejen a su proteína ancestral. Esta hipótesis explicaría que mutantes de la Srx de plantas que carecen de actividad antioxidante, interaccionen con el DNA y tengan la capacidad de protegerlo frente al daño oxidativo.

Además de la actividad reductora de la forma sulfínica de determinadas Prxs para regenerar su actividad peroxidasa, la Srx de plantas, de forma similar a la humana, posee actividad eliminadora de glutatión. La glutatiónilación de las proteínas es una modificación post-traducciona reversible que juega un importante papel en procesos de regulación y señalización celular (Gallogly y Mieyal, 2007). En este caso, la glutatiónilación de la 2-Cys Prx podría estar involucrado en la protección frente a la sobreoxidación de su cisteína catalítica (Park *et al.*, 2009). La AtSrx elimina, en un proceso lento y no dependiente de ATP, dicha protección por eliminación de glutatión de la 2-Cys Prx.



#### **4.- Localización dual (cloroplastídica y mitocondrial) de la Srx de plantas**

La Srx de *A. thaliana* (AtSrx) ha sido descrita como una enzima cloroplastídica (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007), conteniendo en su extremo NH-terminal un péptido señal que la dirige a dicho orgánulo, en el que se encuentra la 2-Cys Prx, única proteína diana descrita hasta la fecha, capaz de ser reducida desde su forma sulfínica. Ambos grupos dedujeron que la Srx de plantas contiene un péptido señal de importe al cloroplasto y comprobaron, mediante la proteína de fusión GFP, la localización subcelular de la AtSrx. Para ello, realizaron la construcción de GFP-AtSrx y visualizaron, mediante microscopía confocal, su presencia en cloroplastos y no en mitocondrias.

El grupo chino del Dr. Wang, encontró que en células del mesófilo de hojas de *A. thaliana* transfectadas con las construcciones p35S-AtSrx-GFP y p35S-GFP, como control, se observaba fluorescencia verde exclusivamente en cloroplastos. Posteriormente, el grupo francés del Dr. Toledano, confirmó que la AtSrx, fusionada a GFP e introducida bajo la regulación de un promotor 35S en plantas de *Nicotiana tabacum*, se encontraba presente en cloroplastos de hoja colocalizando con la autofluorescencia de la clorofila. Sin embargo, no encontraron la enzima en mitocondrias de hoja, donde utilizaron como control la construcción del complejo I de la NADH deshidrogenasa mitocondrial fusionada a GFP.

A pesar de la exclusiva localización plastídica descrita para la AtSrx, la localización en mitondrias de mamíferos en respuesta al estrés oxidativo (Noh *et al.*, 2009) y la alta probabilidad, mediante programas de análisis informático, de localización dual, cloroplastídica y mitocondrial, nos estimularon a investigar la localización intracelular de PSrx y AtSrx en detalle.

El hecho de que los resultados previos de otros grupos con GFP hayan resultado negativos, no descarta la posibilidad de que se pueda encontrar en la mitocondria de plantas, donde se producen altos niveles de ROS que pueden ocasionar la sobreoxidación de la Prx IIF ya que, aunque las Prxs atípicas mitocondriales, son más resistentes, pueden ser inactivadas por sobreoxidación (Cox *et al.*, 2009). Además, la GFP es una proteína de fusión de aproximadamente 27 kDa, bastante más grande que la proteína de importe, la Srx, de unos 14 kDa. Por tanto, la fusión de GFP a la AtSrx puede modificar el importe de esta proteína dentro de la mitocondria y hacer que su destino sea exclusivamente cloroplastídico.

La localización subcelular de la Srx y 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H se estudió primeramente mediante inmunocitoquímica, en plantas de guisante, utilizando los anticuerpos específicos frente a ellas (Fig. 40, 43). Dentro de la célula completa, pudimos observar la presencia de PsSrx marcada con partículas de oro coloidal dentro de cloroplastos y mitocondrias. La baja densidad de marcaje no fue sorprendente, teniendo en cuenta la baja concentración de Srx previamente encontrada en cloroplastos (2 ng/μg proteína) (Iglesias-Baena *et al.*, 2010), siendo estos niveles similares a los de su diana cloroplastídica 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H y a los de la Srx en mitocondrias. Además, hay que tener en cuenta que hemos utilizado plantas jóvenes no estresadas y la Srx se expresa principalmente en plantas estresadas y senescentes ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)). Nuestro objetivo era demostrar la presencia de Srx en mitocondria de plantas bajo condiciones fisiológicas, en contraste a la Srx humana (Noh *et al.*, 2009).

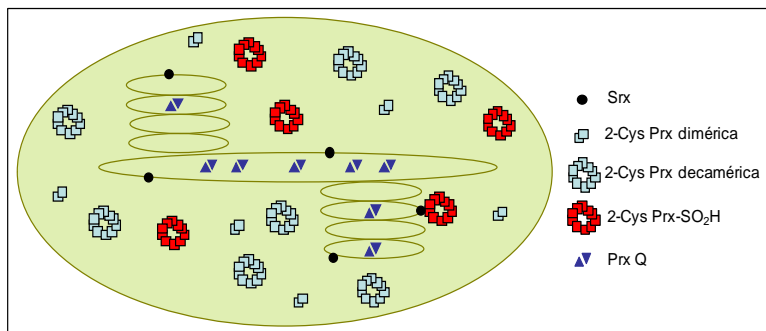
La presencia de Srx en mitocondria, además de cloroplastos, se estudió también mediante aislamientos de dichos orgánulos de hojas de guisante y de *A. thaliana*, y analizando su presencia por Western blot.

Teniendo en cuenta, como hemos visto antes, que la técnica de GFP podía tener problemas con el importe de la proteína a mitocondrias, decidimos utilizar el ensayo de importe descrito por Rudhe *et al.* (2002), que es específico para importe dual *in vitro*. La eficiencia de este método ha sido corroborada por comparación con otros métodos (Pavlov *et al.*, 2007). Después del importe la Srx se detectaba en cloroplastos y mitocondrias con una masa molecular de alrededor de 2 kDa menos que la preforma, indicando la separación del péptido de tránsito (Fig. 49). Además, la gran similitud de la masa molecular de la proteína madura procesada en cloroplastos y mitocondrias indica un sitio de corte similar en ambos orgánulos. Con estos resultados aportamos una evidencia adicional de que la Srx contiene un péptido señal dual que dirige la enzima a cloroplastos, así como a mitocondrias, con una preferencia similar.

Los resultados del análisis histoquímico, detección inmunoquímica de la Srx en mitocondrias aisladas y el importe de la proteína recombinante marcada con orgánulos aislados confirman la localización dual de la Srx de plantas en condiciones fisiológicas. La presencia de la Srx en mitocondrias, un lugar de importante producción de ROS, podría jugar un papel importante en la regeneración de la forma sulfínica de la Prx IIF mitocondrial.

Una vez confirmada la presencia de la Srx en cloroplastos y mitocondrias, se abordó el estudio de su localización intraorganular. Mediante fraccionamiento por choque osmótico de cloroplastos aislados, se consiguió la

separación del estroma y tilacoides, localizando la Srx de *A. thaliana* y guisante en la fracción membranosa asociada a tilacoides. Sin embargo, la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, por Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la misma, se encontró en la fracción soluble del estroma, a diferencia de lo descrito por König *et al.* (2002) que describieron la localización de los oligómeros de la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx de *A. thaliana* en las membranas tilacoidales. Con estos resultados especulamos que la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, que forma decámeros (Bernier-Villamor *et al.*, 2004; Barranco-Medina *et al.*, 2009) en el estroma, puede interactuar con la Srx, tilacoidal (Fig. 117). La Srx posee regiones hidrofóbicas que podrían formar parte de dominios transmembrana. De esta forma la enzima podría reducir las formas sobreoxidadas de la Prx estromática (2-Cys Prx), así como, de la Prx Q, de localización luminal (Fig. 117).



**Figura 117.- Esquema de localización intracloroplastídica de la Srx, 2-Cys Prx dimérica, decamérica y sulfínica, y de la Prx Q.**

Los estudios de localización intraorganular en mitocondrias han concluido que la Srx se encuentra, al igual que la Prx IIF (Finkemeier *et al.*, 2005; Barranco-Medina *et al.*, 2007), en la matriz mitocondrial, sugiriendo que esta Prx sobreoxidada podría ser reducida por la Srx.

## **5.- Proteínas diana de la Srx de plantas**

La sulfirredoxina es una enzima capaz de reducir la forma sulfínica inactiva de las 2-Cys Prxs (Woo *et al.*, 2005), que incluyen las hPrxs I-IV y la 2-Cys Prx cloroplastídica de plantas. Ya que la producción de ROS en vegetales es muy elevada, tanto en cloroplastos como en mitocondrias, las

peroxirredoxinas atípicas de ambos orgánulos son también susceptibles de sobreoxidación en determinadas condiciones. De hecho, hemos comprobado la formación *in vitro*, bajo condiciones oxidantes, de la Prx Q-SO<sub>2</sub>H, Prx IIE-SO<sub>2</sub>H y Prx IIF-SO<sub>2</sub>H, con pérdida de su actividad peroxidasa.

Al igual que en mamíferos, se pensaba que la Srx de plantas era específica de la 2-Cys Prx. Sin embargo, hemos visto que es capaz de reducir, en el cloroplasto, la forma sulfínica de la Prx Q, presentando una cinética de reacción y una afinidad similar. En cambio, la forma sulfínica de la Prx IIE cloroplastídica es irreversible, ya que la Srx no la reduce *in vitro*. La actividad fisiológica de la Srx sobre la Prx Q puede explicarse, únicamente, localizando a la Srx incorporada en la membrana tilacoidal, pudiendo presentar, además de dominios transmembrana, su centro activo expuesto hacia la cara estromática para actuar sobre la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, o expuesto hacia la cara lumínica para reducir la forma sulfínica de la Prx Q (Fig. 117).

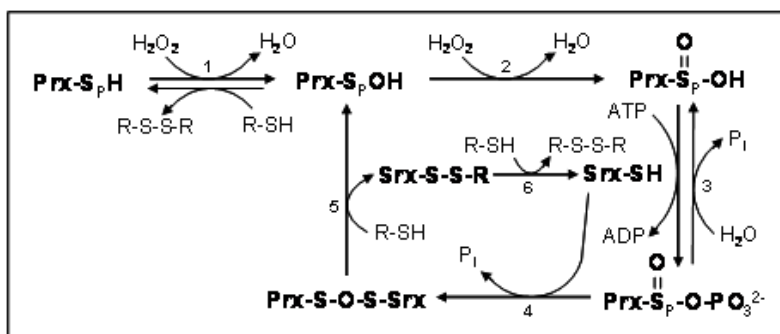
Pero la Prx Q no es la única peroxirredoxina atípica capaz de ser reducida por la Srx, ya que en mitocondria la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H es capaz de ser reducida de manera ATP dependiente por la Srx. Esto tiene sentido fisiológico después de haber comprobado que la Srx de plantas se encuentra en las mitocondrias vegetales, incluso en condiciones fisiológicas, debido a un péptido señal dual.

De forma similar, la Srx de plantas es capaz de reducir la forma sulfínica de la hPrx V mitocondrial, en contra a los resultados obtenidos por Woo *et al.* (2005) que observaron, mediante análisis bidimensional, que la hSrx no reducía la forma sobreoxidada de esta Prx mitocondrial. Además, estos resultados apuntan a un posible mecanismo de acción diferente entre la Srx humana y la de vegetales.

Por otra parte, los estudios realizados con la forma sulfínica de la Prx II citosólica de plantas han mostrado que no es reducida por Srx, lo cual no es sorprendente, teniendo en cuenta la localización intraorgánular de la Srx. Esto podría explicarse por la ausencia de aminoácidos en la secuencia de la Prx IIC que pueden ser cruciales en la interacción con la Srx.

El mecanismo general de la Srx puede ser esquematizado en la Fig. 118, donde la forma reducida de la peroxirredoxina (Prx-SH) es oxidada en su cisteína peroxidática (Cys-S<sub>p</sub>H) hasta la forma sulfénica (Prx-SOH) (etapa 1), la cual, en condiciones de elevado estrés oxidativo, puede sobreoxidarse (etapa

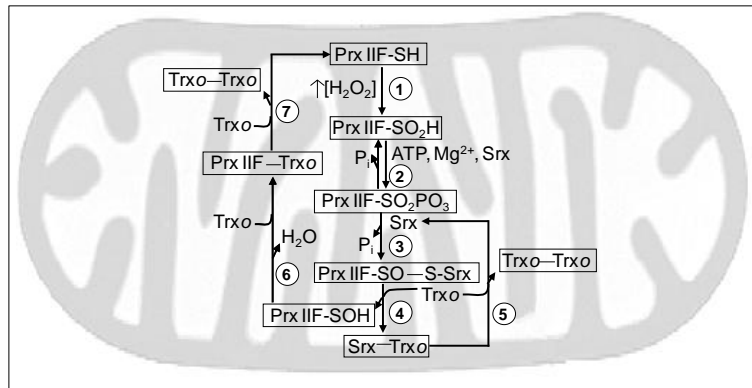
2) hasta la forma sulfínica (Prx-SO<sub>2</sub>H). Ésta, en un proceso catalizado por la Srx en el que se produce la hidrólisis del  $\gamma$ -fosfato del ATP, da lugar a un fosforil-éster inestable (Prx-SO<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) que puede revertir en ausencia de reductor, dando lugar a un ciclo fútil (etapa 3). La presencia de un agente reductor (R-SH), como Trx, GSH o DTT, hace progresar la reacción hacia la formación del complejo tiosulfinato (Prx-SO-S-Srx), con la liberación de P<sub>i</sub> (etapa 4), que es reducido para liberar Prx-Cys-SOH y Srx-S-S-R (etapa 5). Una posterior reducción forma Srx-SH (etapa 6), completando el ciclo catalítico de la Srx.



**Figura 118.- Esquema del ciclo catalítico de la Srx para la reducción de la forma sulfínica de la Prx. Basado en el esquema de Iglesias-Baena et al. (2010).**

La interacción entre la Srx y las Prxs, se produce específicamente con la forma sulfínica de estas y no es dependiente de ATP. En el ciclo catalítico de la Srx con las Prxs, la Trx preferente, como agente reductor, difiere dependiendo de la Prx diana, siendo la Trxf2 para la 2-Cys Prx o Trxm4 para la Prx Q (Fig. 81).

Para la reducción de la Prx IIF-SO<sub>2</sub>H, el reductor fisiológico, según hemos demostrado, es la Trxo mitocondrial. Mediante un mecanismo de acción similar al mostrado para la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H (Fig. 118), proponemos un modelo mitocondrial del sistema Prx / Srx basado en la formación de diferentes complejos intermediarios (Fig. 119). El complejo Prx IIF-Trxo fue puesto de manifiesto *in vitro* e *in situ*, con mitocondrias aisladas, por Barranco *et al.* (2008) y Martí *et al.* (2009) y la formación de los complejos Prx IIF-Srx y Srx-Trxo se demuestra, por primera vez, en este trabajo.



**Figura 119.- Modelo propuesto para el mecanismo de acción de la sulfiredoxina mitocondrial en el sistema formado por la Prx IIF, Srx y Trxo.**

En dicho proceso, en condiciones de elevado ROS, se produce la sobreoxidación de la Prx IIF (Prx IIF-SO<sub>2</sub>H) (etapa 1), y en una reacción reversible, dependiente de ATP y Mg<sup>2+</sup>, la Srx presente en mitocondria da lugar a un forforil-éster inestable (Prx IIF-SO<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) (etapa 2) que se convierte en tiosulfinato (Prx IIF-SO-S-Srx) y se libera fosfato inorgánico (etapa 3). En presencia de reductor (Trxo) se reduce el complejo y se libera la forma sulfénica de la Prx IIF (Prx IIF-SOH) y Srx-Trxo (etapa 4), que se reduce a Srx por la Trxo (etapa 5). Prx IIF-SOH es igualmente reducido por Trxo, liberando H<sub>2</sub>O y formando un complejo disulfuro Prx IIF-Trxo (etapa 6) que da lugar finalmente, mediante otra Trxo, a la forma activa (Prx IIF-SH y al complejo dimérico Trxo-Trxo (etapa 7).

La Srx de plantas posee unas constantes cinéticas similares para cada uno de sus diferentes sustratos. Es una enzima lenta y poco eficiente, pero a diferencia de la humana, posee un mayor inespecificidad de sustrato, llegando a ser activa con Prxs típicas y atípicas, presentes en distintos compartimentos celulares, e incluso de diferentes organismos.

## **6.- Regulación de la actividad peroxidasa/chaperona de la Prx por la Srx**

La sobreoxidación de las 2-Cys Prxs, en plantas, da lugar a la pérdida de su actividad peroxidasa de forma reversible. En cambio, esta inactivación conduce a la ganancia de actividad chaperona influenciada por su estado de

oligomerización (Aran *et al.*, 2009). En respuesta a condiciones de elevados niveles de ROS en la célula, se originan especies de alto peso molecular (HMW) que poseen la capacidad de prevenir el mal plegamiento o desplegamiento de proteínas bajo condiciones de estrés (Fig. 120).



**Figura 120.- Esquema general de regulación de la actividad peroxidasa y chaperona de la Prx por medio de RONS o de la Srx.**

Hemos observado que la forma sulfínica de la 2-Cys Prx cloroplastídica no presenta actividad peroxidasa, al igual que las formas sobreoxidadas de la Prx Q y Prx IIE de la misma localización celular. Esta inactivación de la actividad peroxidasa conlleva una ganancia de la actividad chaperona en el caso de la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H, que no se produce con la Prx Q-SO<sub>2</sub>H ni con la Prx IIE-SO<sub>2</sub>H. En cambio la Srx, capaz de reducir la forma sulfínica de la 2-Cys Prx y de la Prx Q, juega un papel importante en la actividad de estas Prxs recuperando la actividad peroxidasa y produciendo la pérdida de la actividad chaperona que presenta la 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H.

La presencia de actividad chaperona en cloroplastos, exclusiva de la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx, puede ser debida a que es la única que da lugar a la formación de especies de alto peso molecular, concretamente anillos decaméricos, que podrían favorecer el correcto plegamiento proteico en condiciones de estrés. La Srx se encuentra en mayor cantidad en el cloroplasto de plantas senescentes o sometidas a estrés, presentando una cinética lenta para regenerar la forma reducida de la 2-Cys Prx una vez realizada su función chaperona para el correcto plegamiento de proteínas. Posteriormente, estas enzimas antioxidantes tratan de eliminar los RONS producidos en el cloroplasto.

A nivel mitocondrial, la Prx IIF puede ser sobreoxidada a ácido sulfínico, cuya forma posee una ligera actividad chaperona debido a que tiene la capacidad de prevenir parcialmente el incorrecto plegamiento de proteínas.

Lo cual no es sorprendente, teniendo en cuenta que la Prx IIF se oligomeriza en su estado sobreoxidado para dar lugar a hexámeros (Barranco-Medina *et al.*, 2008). Los niveles elevados de RONS en la mitocondria producen, por tanto, la inactivación de la función peroxidasa de la Prx IIF originando la ganancia de una actividad chaperona regulada por la Srx, que devuelve la actividad peroxidasa a la enzima.

## **7.- Importancia biológica del sistema Prx/Srx en la resistencia eucariota al estrés oxidativo**

El papel del sistema antioxidante Prx/Srx en las células eucariotas no ha sido estudiado a fondo desde un punto de vista de resistencia a estrés oxidativo. Tan sólo se conoce la sobreexpresión de las Prxs bajo estrés fotooxidativo y los niveles basales de transcrito de la Srx en plantas (Rey *et al.*, 2007). Para profundizar en dicho estudio, se ha analizado la sensibilidad de líneas mutantes de plantas (*Arabidopsis thaliana*) y de levaduras (*S. pombe*) ante diferentes situaciones de estrés oxidativo.

Estudios realizados por Liu *et al.* (2006) demostraron una mayor susceptibilidad, a estrés por Paraquat, de las plantas “knock out” en Srx, que de las plantas “wild type”, mientras que Rey *et al.* (2007) observaron que este mutante mostraba menor daño oxidativo que la línea silvestre. Para clarificar este aspecto y profundizar en el papel de la sulfirredoxina en estrés oxidativo, se estudió la sensibilidad de este mutante a diferentes tipos de estrés oxidativo y en diferentes estadios de desarrollo de la planta. Nosotros observamos una mayor sensibilidad de las plantas que contenían inserciones en genes del sistema Prx/Srx frente a estrés por peróxido de hidrógeno, con un descenso de la  $F_v/F_m$ .

Las plantas “knock out” en Prxs (2-Cys Prx o Prx IIF) o Srx mostraron una mayor sensibilidad que las plantas “wild type” a la germinación en condiciones de estrés oxidativo (tanto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como por Paraquat). En esto destaca la línea  $\Delta$ Prx B, lo que indica que la 2-Cys Prx debe de tener un papel crucial de eliminación de ROS en el cloroplasto, además de una función chaperona y de señalización, que debe ser más importante que la función antioxidante de la Prx IIF en la mitocondria y la función sulfinico-reductasa de la Srx.



Bajo condiciones de estrés biótico y abiótico, los mutantes de *A. thaliana* mostraron una mayor sensibilidad al tener afectado el sistema Prx-Srx. Por tanto, el sistema formado por estas enzimas tiene gran importancia para la resistencia de las plantas al estrés oxidativo. Esto puede ser debido a que se altera la regulación de los RONS tanto en el cloroplasto como en la mitocondria.

En el estrés de tipo biótico, además de la producción de moderados niveles de RONS como consecuencia de la infección, los niveles de la forma sulfínica se ven incrementados. Se produce, en general, un aumento de la expresión de las enzimas del sistema Prx-Srx, tanto a nivel transcripcional como traduccional. Por ello, la ausencia de dichas enzimas en plantas “knock out” de *A. thaliana* produce un incremento de la sensibilidad de dichas líneas al estrés oxidativo de tipo abiótico, donde estas proteínas ejercen un papel importante para la defensa de la célula.

Por otro lado, las plantas de *A. thaliana* “knock out” en Srx, presentan mayor contenido de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx, Prx Q y Prx IIF, lo cual demuestra el papel fisiológico de la Srx en la reducción de la forma sobreoxidada de estas peroxirredoxinas cloroplastídicas y mitocondriales.

Para conocer el papel del sistema Prx-Srx al estrés oxidativo, se ha realizado un completo estudio de una colección de mutantes de *S. pombe* que contiene deleciones en genes implicados en dicho sistema o en su cascada de señalización. Se ha visto la importancia de Pap1 y de Sty1 en la resistencia a peróxido de hidrógeno y a cafeína. Esta última es una droga que causa, a elevadas concentraciones, la producción de ROS y daño celular, a diferentes niveles, en células eucariotas. Gracias a este amplio estudio, se ha llegado a conocer la implicación de los diferentes sistemas de levadura implicados en la resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cafeína, como son los sistemas de activación de estrés oxidativo dependientes de Pap1 y Sty1, las vías de integridad y calcineurina, morfología celular y remodelado de la cromatina. Pap1 es activado a concentraciones moderadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que Sty1 es activado a concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vivancos *et al.*, 2005). Pap1 y Sty1 son requeridos para la tolerancia normal de la célula a cafeína, y sin embargo tan sólo Sty1 es activado por esta droga (Calvo *et al.*, 2009). La sensibilidad del mutante carente de Pap1 a esta droga es debida al descenso de la expresión de la bomba que exporta la droga de la célula Hba2 (Fig. 121).

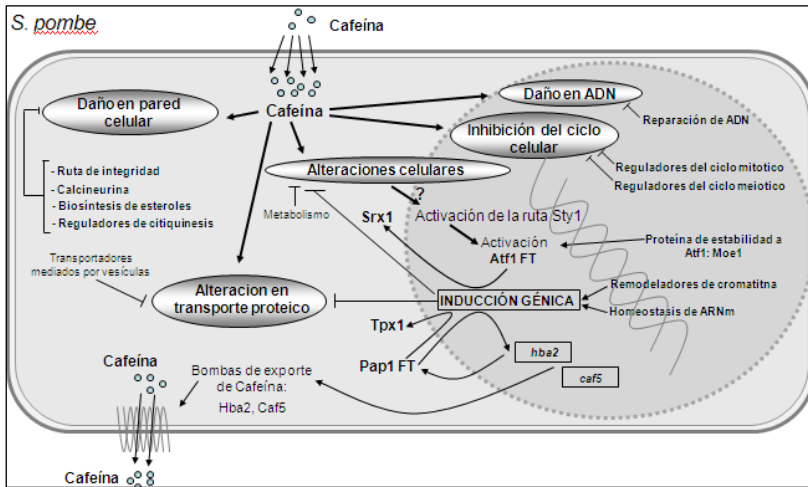


Figura 121.- Modelo propuesto de respuesta celular implicada en la respuesta a cafeína en *S. pombe*.

## 8.- Función señalizadora de la Prx-SO<sub>2</sub>H

Los RONS, además de tener un papel negativo en la célula, produciendo daño a macromoléculas, poseen una función positiva de señalización. Este papel señalizador no es exclusivo de los RONS, ya que indirectamente las macromoléculas a las que ha causado daño oxidativo, pueden ejercer dicho papel. La forma sulfínica de las Prxs, que son inactivas en su función peroxidasa y pueden presentar una función chaperona, pueden tener además una función señalizadora en la célula que es regulada por la Srx (Fig. 122).

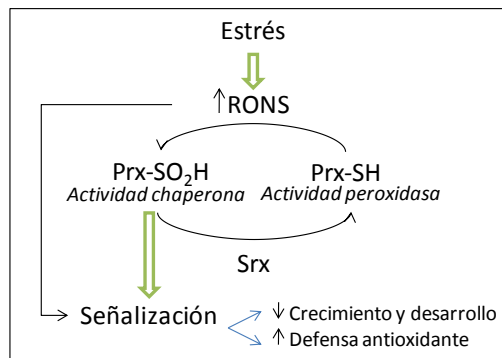


Figura 122.- Esquema del papel señalizador de la forma sulfínica de la Prx regulado por la Srx.

La sobreoxidación de las Prxs hasta la forma sulfónica se considera un proceso irreversible, debido a que ni la Srx, ni ninguna otra enzima conocida hasta la fecha, es capaz de reducirla para reactivarla. De hecho, estas Prxs-SO<sub>3</sub>H en humanos, han sido recientemente descritas como formas modificadas de estas enzimas cuyo destino final es la degradación de las mismas (Neumann *et al.*, 2009).

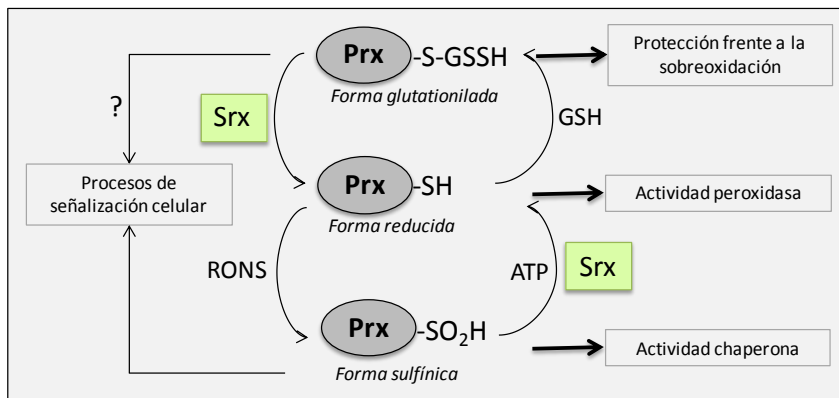
Las plantas de *A. thaliana* “knock out” en 2-Cys Prx mostraron un fenotipo, claramente marcado, en condiciones de crecimiento en ciclo largo, siendo plantas de mayor tamaño y desarrollo que las plantas silvestres. En cambio, las plantas de *A. thaliana* “knock out” en Srx mostraron el fenotipo contrario, siendo plantas de menor tamaño y desarrollo (Fig. 122). Esta es la primera variación fenotípica descrita para ambas líneas mutantes en plantas crecidas en fotoperiodo de ciclo largo. Sin embargo, bajo fotoperiodo de ciclo corto no se observaron diferencias fenotípicas entre ambas líneas mutantes y “wild type”.

Este fenotipo posiblemente se deba a los diferentes niveles de forma sulfónica de la 2-Cys Prx que presentan ambos mutantes de *A. thaliana*. Los elevados niveles de Prx-SO<sub>2</sub>H en el cloroplasto del  $\Delta$ Srx, hace que mediante una cascada no conocida de señalización, esta forma sobreoxidada de la peroxirredoxina, produzca un aumento en la expresión de proteínas del sistema antioxidante de la célula y, además, un descenso en el crecimiento y desarrollo de la célula vegetal (Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

El estímulo de la respuesta antioxidante por parte de la célula puede ser causado por una vía directa a través de los RONS, o mediante una vía indirecta a través de los niveles de forma sulfónica de la Prx. En levadura, ambos factores pueden dar lugar a la activación de factores de transcripción (Pap1 y Atf1) que serían responsables de activar la transcripción de las proteínas pertenecientes al sistema Prx-Srx.

La descripción, por primera vez, de diferencias fenotípicas en plantas “knock out” en 2-Cys Prx y en Srx, que son revertidas mediante ensayo de complementación con AtSrx, hace sugerir la hipótesis de que la forma sulfónica de la Prx pueda actuar a través de alguna cascada de señalización, que se encuentre interconectada con hormonas vegetales, como puede ser el etileno, para dar lugar a un efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta.

La sulfirredoxina está implicada en la eliminación de glutatión de la Prx glutationilada, desprotegiendo a esta frente a la inactivación de su actividad peroxidasa debido a su sobreoxidación hasta la forma sulfínica, la cual posee actividad chaperona (Lowther y Haynes, 2010). Dicha Prx-SO<sub>2</sub>H es reducida de forma ATP dependiente por la Srx para recuperar la actividad peroxidasa. La Srx, que interviene en la eliminación de las formas glutationiladas y sulfínicas de la Prx, está indirectamente involucrada en procesos de señalización celular en plantas (Fig. 123).



**Figura 123.- Esquema de los procesos de señalización y actividad en los que están implicados la Srx y la Prx.**

Los resultados obtenidos en esta Tesis, suponen la primera caracterización sistemática de la Srx de plantas mediante el desarrollo de un nuevo método de determinación de su actividad reductora de nuevas dianas, entre ellas Prxs atípicas. Este hecho, además de su importancia en la señalización celular, supone la no especificidad de la Srx con la Prxs típicas, e implica una vía alternativa en su mecanismo de acción diferente de la humana. Todo ello, abre nuevas puertas para profundizar en la investigación del sistema Prx / Srx.

## **CONCLUSIONES - CONCLUSIONS**



## **Conclusiones**

1.- Se ha llevado a cabo el aislamiento del cDNA que codifica la Srx de *Pisum sativum*. Su secuencia aminoacídica presenta una gran homología con la de otras especies vegetales y contiene un motivo conservado en organismos eucariotas.

2.- Se han sobreexpresado, mediante la utilización del sistema pET, la sulfirredoxina de guisante (PsSrx) y de *A. thaliana* (AtSrx), así como cinco proteínas mutantes de la AtSrx (R28Q, K40Q, C72S, E76A, R28Q/E76A) y se ha desarrollado un protocolo simplificado de purificación de dos etapas cromatográficas.

3.- Utilizando los anticuerpos policlonales específicos obtenidos frente a la Srx, se ha demostrado su localización dual en plantas, encontrándose en cloroplastos y mitocondrias en condiciones fisiológicas. La Srx se encuentra unida a membrana tilacoidal en cloroplastos y en forma soluble en la matriz mitocondrial.

4.- La Srx de plantas presenta dos cisteínas expuestas, accesibles al DTNB, una de ellas (cisteína 72) es responsable de su actividad reductasa y de las formas diméricas observadas por análisis electroforético y cromatográfico. Ambas cisteínas pueden formar enlaces por puentes disulfuro intramoleculares.

5.- Se ha desarrollado un nuevo método para la determinación de la actividad Srx basado en la cuantificación del fosfato inorgánico liberado como consecuencia de la hidrólisis del ATP en el proceso de reducción de la forma sulfínica de la Prx. Este proceso es catalizado en una reacción lenta y dependiente de la presencia de agente reductor.

6.- Estudios bioquímicos y de modelización molecular, han revelado un mecanismo de acción similar a otras Srxs. Sin embargo, la Srx de plantas tiene una vía secundaria de activación de la cisteína catalítica, por medio del par Glu-His, que no presenta la Srx humana.

7.- La Srx de plantas es capaz de regenerar la forma sobreoxidada de las Prxs cloroplásticas, 2-Cys Prx y Prx Q, y de la Prx IIF mitocondrial. Por primera vez se ha descrito la regeneración de la forma sobreoxidada de las Prxs atípicas. Además, se ha observado que la Srx reduce las Prxs humanas citosólica y mitocondrial, siendo la AtSrx capaz de regenerar la forma sobreoxidada de la hPrx V, siendo un proceso irreversible *in vivo*.

8.- Se ha determinado el papel de la Srx de plantas en la regulación de las actividades chaperona y eliminadora de glutatión de las Prxs.

9.- Se ha descrito el papel señalizador de la forma sulfínica de la 2-Cys Prx en líneas mutantes de *A. thaliana*. Estas plantas muestran diferencias fenotípicas en ausencia de Srx o 2-Cys Prx.

10.- La expresión de la Srx muestra una regulación positiva en condiciones de diferentes tipos de estrés oxidativo.

11.- Se ha estudiado la vía de activación en respuesta a estrés oxidativo en levadura (*S. pombe*), siendo importante la activación de Sty1 para su resistencia frente a peróxido de hidrógeno y cafeína.



## **Conclusions**

1.- The isolation of the cDNA that code for the Srx from *Pisum sativum* has been achieved. The deduced amino acid sequence is largely homologous to sequences of Srx for other plants, showing a conserved catalytic motive present in the enzyme of all eukaryotic organisms.

2.- Srx from pea (PsSrx) and *A. thaliana* (AtSrx), as well as five variants of AtSrx (R28Q, K40Q, C72S, E76A, R28Q/E76A), have been overexpressed as recombinant proteins using pET expression systems. We have developed a simple protocol for purification of Srx which include two chromatographic steps.

3.- Using the polyclonal specific antibodies against the Srx, we have demonstrated its dual localization into chloroplasts and mitochondria under physiological conditions. The Srx is attached to thylakoids membrane and soluble in the mitochondrial matrix.

4.- Srx has two external cysteins accessible to DTNB. One of them (Cys72) is responsible of its reductase activity and of the dimeric forms showed by electroforetic and chromatografic analysis. Both cysteins are involved in the formation of intramolecular disulfide bridges.

5.- We have developed a new method for the measured of the Srx activity based on the quantification of the inorganic phosphate released by the ATP hydrolysis during the reduction of the sulfinic form of Prx. This slow process depends on the presence of a reducing agent.

6.- Biochemical and molecular modeling studies have showed a similar action mechanism to other Srxs. However, plant Srx has a secondary way of activation of the catalytic cysteine, by the par Glu-His, which is not present in the human Srx.

7.- The plant Srx is able to retroreduce the overoxidized form of chloroplast 2-Cys Prx and Prx Q, and of mitochondrial Prx IIF. For the first time we have described the regeneration of the overoxidized form of atypical Prxs. Moreover, we have observed the retroreduction of the sulfinic form of cytosolic and mitochondrial human Prxs. The AtSrx is able to regenerate the overoxidized form of hPrx V, which is an irreversible process *in vivo*.

8.- We have determined the role of plant Srx in the regulation of the chaperone and deglutathionylation activity of Prxs.

9.- We have described the signaling role of the sulfinic form of 2-Cys Prx in mutant lines of *A. thaliana* plants. These plants show phenotypical differences in the absence of Srx or 2-Cys Prx.

10.- Srx was found to be upregulated under several stress conditions.

11.- We have studied the activation pathway in response to oxidative stress in yeast (*S. pombe*), being important the activation of Sty1 for its resistance against hydrogen peroxide and caffeine.

## **BIBLIOGRAFÍA - REFERENCES**



- Aalen RB, Opsahl-Festad HG, Linnestad C, Olsen OA.** 1994. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare L.*) seeds. *Plant J.* **5**: 385-396.
- Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F.** 2008. A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* **148**: 424-435.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.** 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- Aran M, Ferrero DS, Pagano E, Wolosiuk RA.** 2009. Typical 2-Cys peroxiredoxins modulation by covalent interactions and noncovalent interactions. *FEBS J.* **276**: 2478-2493.
- Asada K.** 1984. Chloroplast: Formation of active oxygen and its scavenging. *Meth. Enzymol.* **105**: 422-429.
- Asada K, Takahashi M.** 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition*, pp 227-287 (DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Asada K.** 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* **141**: 391-396.
- Baier M, Dietz KJ.** 1996a. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* **31**: 553-564.
- Baier M, Dietz KJ.** 1996b. The two-Cys peroxiredoxin BAS1: insight in a new family of plant peroxidases. En: *Plant peroxidases biochemistry and physiology*, eds. Obinger C, Burner U, Eberman R, Penel C, Greppin H. Wien: University of Agriculture pp. 204-209.
- Baier M, Dietz KJ.** 1999. Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence for transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol.* **119**: 1407-1414.
- Barranco-Medina S.** 2006. Caracterización bioquímica y molecular de una peroxiredoxina mitocondrial de *Pisum sativum*. *Tesis doctoral (Universidad de Granada)*.
- Barranco-Medina S, Krell T, Finkemeier I, Sevilla F, Lazaro JJ, Dietz KJ.** 2007. Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem.* **45**: 729-739.
- Barranco-Medina S, Krell T, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ, Dietz KJ.** 2008. Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation

of ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *J. Exp. Bot.* **59**: 3259-3269.

**Barranco-Medina S, Lázaro JJ, Dietz KJ.** 2009. The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Lett.* **583**: 1809-1816.

**Barranco-Medina S, López-Jaramillo FJ, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ.** 2006. Cloning, overexpression, purification and preliminary crystallographic studies of a mitochondrial type II peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *Acta Crystall F* **62**: 695-698.

**Basu MK, Koonin EV.** 2005. Evolution of eukaryotic cysteine sulfinic acid reductase, sulfiredoxin (Srx), from bacterial chromosome partitioning protein ParB. *Cell Cycle* **4**: 947-952.

**Bernier-Villamor L.** 2004. Caracterización bioquímica y molecular de la peroxirredoxina de 2 cisteínas de *Pisum sativum*. *Tesis doctoral (Universidad de Granada)*.

**Bernier-Villamor L, Navarro E, Sevilla F, Lázaro JJ.** 2004. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *J. Exp. Bot.* **55**: 2191-2199.

**Biteau B, Labarre J, Toledano MB.** 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**: 980-984.

**Blum H, Beier H, Gross HJ.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

**Bolwell GP, Buti VS, Davies DR, Zimmerlin A.** 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* **23**: 517-532.

**Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

**Bryk R, Griffin P, Nathan C.** 2000. Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**: 211-215.

**Buchanan BB.** 1991. Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in oxygenic photosynthesis - the ferredoxin thioredoxin system - perspective on. Its discovery, present status, and future-development. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**: 1-9.

**Buchanan BB, Balmer Y.** 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Ann. Rev. Plan. Biol.* **56**: 187-220.

**Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM.** 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **304**: 596-600.

**Buege JA, Aust SD.** 1972. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **52**: 302-310.

- Calvo IA, Gabrielli N, Iglesias-Baena I, García-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Sansó M, Zuin A, Pérez P, Ayté J, Hidalgo E.** 2009. Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PLoS One* **4**: e6619.
- Cesaratto L, Vascotto C, D'Ambrosio C, Scaloni A, Baccarani U, Damante G, Calligaris S, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Tell G.** 2005. Overoxidation of peroxiredoxins as an immediate and sensitive marker of oxidative stress in HepG2 cells and its application to the redox effects induced by ischemia/reperfusion in human liver. *Free Radical Res.* **39**: 255-268.
- Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG.** 1994a. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**: 27670-27678.
- Chae HZ, Kim I-H, Kim K, Rhee SG.** 1993. Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 16815-16821.
- Chae HZ, Robinson K, Poole LB Church G, Storz G, Rhee SG.** 1994b. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7017-7021.
- Chae L, Sudat S, Dudoit S, Zhu T, Luan S.** 2009. Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the Arabidopsis Receptor-Like Kinase gene family. *Molecular Plant.* **2**: 84-107.
- Chae HZ, Uhm TB, Rhee SG.** 1994c. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cystein 47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7022-7026.
- Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG.** 2002. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**: 25370-25376.
- Chang TS, Jeong W, Wooh HA, Lee SM, Park S, Rhee SG.** 2004. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J. Biol. Chem.* **279**: 50994-51001.
- Chen Jr. PS, Toribara TY, Wagner H.** 1956. Microdetermination in phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 1756-1758.
- Chevallet M, LWagner E, Luche S, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T.** 2003. Regeneration of Peroxiredoxins during recovery after oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**: 37146-37153.
- Chew O, Whelan J, Millar AH.** 2003. Molecular definition of the ascorbateglutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plant. *J. Biol. Chem.* **278**: 46869-46877.
- Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, Kang SW.** 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* **435**: 347-353.

**Choi YO, Cheong NE, Lee KO, Jung BG, Hong CH, Jheong JH, Chi YM, Kim K, Cho MJ, Lee SY.** 1999. Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of *Chinese cabbage* and its comparison to 2 Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**: 768-771.

**Choudhury SB, Lee JW, Davidson G, Yim YI, Bose K, Sharma ML, Kang SO, Cabelli DE, Maroney MJ.** 1999. Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in *Streptomyces seoulensis* superoxide dismutase. *Biochem.* **38**: 3744-3752.

**Claiborne A, Yeh JI, Mallett TC, Luba J, Crane EJ 3rd, Charrier V, Parsonage D.** 1999. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **23**: 15407-15416.

**Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M.** 2003. The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insight into specificity. *J. Biol. Chem.* **278**: 23747-23752.

**Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E.** 2004. Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new  $\gamma$ -type. *Plant Physiol.* **136**: 4088-4095.

**Corpas FJ, Gómez M, Hernández JA, Del Río LA.** 1993. Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from two *Pisum sativum* L. cultivars with different sensitivity to sodium chloride. *J. Plant. Physiol.* **141**: 160-165.

**Cox AG, Pearson AG, Pullar JM, Jönsson TJ, Lowther WT, Winterbourn CC, Hampton MB.** 2009. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hiperoxidation than the cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem. J.* **421**: 51-58.

**Dat J, Vandenabeele E, Vranová M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusagem F.** 2000. Dual action of the active oxigen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 779-795

**de Dios Barajas-López J, Serrato AJ, Olmedilla A, Chueca A, Sahrawy M.** 2007. Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in nonphotosyntetic organs. *Plant Physiol.* **145**: 946-960.

**del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, Palma JM.** 2009. Peroxisomes as a cellular source of ROS signal molecules. *En: Reactive oxygen species in plant signaling*, pp 95-111 (del Río LA, Puppo A, eds.), Springer Heidelberg, Germany.

**del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging and role in redox signalling. *Plant Physiol.* **141**: 330-335.

**Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB.** 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in genen activation. *Cell* **111**: 471-481.



- Dietz KJ.** 2003. Plant peroxiredoxins. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**: 93-107.
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SB, Baier M, Finkemeier I.** 2006. The function of peroxiredoxin in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* **57**: 1697-1709.
- Eklund H, Gleason FK, Holmgren A.** 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins-struct. Funct. Genet.* **11**: 13-28.
- Evrard C, Capron A, Marchand C, Clippe A, Wattiez R, Rousimillion P, Knoops B, Declercq JP.** 2004. Crystal structure of C47S mutant of human peroxiredoxin 5. *Chem. Crystallogr.* **34**: 553-558.
- Fernández-García N, Martí MC, Jiménez A, Sevilla F, Olmos E.** 2009. Sub-cellular distribution of glutathione in an Arabidopsis mutant (*vtc1*) deficient in ascorbate. *J. Plant Physiol.* **166**: 2004-2012.
- Findlay VJ, Tapiero H, Townsend DM.** 2005. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed. Pharmacother.* **59**: 374-379.
- Findlay VJ, Townsend DM, Morris TE, Fraser JP, He L, Tew KD.** 2006. A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res.* **66**: 6800-6806.
- Finkel T, Holbrook NJ.** 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
- Finkemeier I, Goodman M, Lankamayer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ.** 2005. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *Biol. Chem.* **280**: 12168-12180.
- Foyer CH, Noctor G.** 2000. Oxygen processing in pyotosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* **146**: 359-388.
- Foyer CH, Noctor G.** 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antiox. Redox Signal.* **11**: 861-905.
- Frew J, Jones P, Scholes G.** 1983. Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solution. *Anal. Chim. Acta* **155**: 130-150.
- Fridovich I.** 1998. Oxygen toxicity: A radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**: 1203-12309.
- Frohman MA.** 1993. Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol.* **218**: 340-356.
- Gallogly MM, Mieyal JJ.** 2007. Mechanism of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**: 381-391.

- Gama F, Bréhélin C, Gelhaye E, Meyer Y, Jacquot JP, Rey P, Rouhier N.** 2008. Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic PrxIII. *Physiol. Plant.* **133**: 599-610.
- Gaurinski JD, Benson DR.** 2004. Microtiter assay for glutamine synthetase activity using inorganic phosphate detection. *Anal. Biochem.* **327**: 114-118.
- Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP.** 2004. The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 265-271.
- Georgiou G, Masip L.** 2003. An overoxidation journey with a return ticket. *Science* **300**: 592-594.
- Gómez JM, Jiménez A, Olmos E, Sevilla F.** 2004. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *J. Exp. Bot.* **55**: 119-130.
- Grant JJ, Loake GJ.** 2000. Role of the reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**: 21-29.
- Hall A, Karplus PA, Poole LB.** 2009. Typical 2-Cys peroxiredoxins: structures, mechanisms and functions. *FEBS J.* **276**: 2469-2477.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press. 3<sup>rd</sup> ed.
- Hamann M, Zhang T, Hendrich S, Thomas JA.** 2002. Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. *Methods Enzymol.* **348**: 146-156.
- Hermoso R, Chueca A, Lázaro JJ, López-Gorgé J.** 1987. An immunological method for quantitative determination of photosynthetic fructose-1,6-biphosphatase in leaf crude extracts. *Photosynth. Res.* **14**: 269-278.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Ros A, Sevilla F.** 2001. Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* **127**: 817-831.
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, Del Rio LA, Sevilla F.** 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiol. Plantarum* **89**: 103-110.
- Herrero E, de la Torre-Ruiz MA.** 2007. Monothiol glutaredoxins a common domain for multiple functions. *Cell Mol. Life. Sci.* **64**: 1518-1530.
- Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz De Montellano PR.** 2000. The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 18801-18809.
- Hirasawa M, Schürann P, Jacquot JP, Manieri W, Jacquot P, Keryer E, Hartman FC, Knaff DB.** 1999. Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins,

ferredoxin: thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry* **38**: 5200-5205.

**Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L.** 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**: 347-361.

**Holmgren A.** 1979. Reduction of disulfides by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **254**: 9113-9119.

**Holmgren A.** 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 237-271.

**Horling F, König J, Dietz KJ.** 2002. Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 491-499.

**Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lázaro JJ.** 2010. Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J. Exp. Bot.* **6**: 1509-1521.

**Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Schell D.** 1997. Elicitorstimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4800-4805.

**Jacquot JP, Lancelin JM, Meyer Y.** 1997. Thioredoxins: Structure and function in plant cells. *New Phytol.* **136**: 543-570.

**Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY.** 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **117**: 625-635.

**Jeong W, Park SJ, Chang TS, Lee DY, Rhee GS.** 2006. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **281**: 14400-14407.

**Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F.** 1997a. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* **114**: 275-284.

**Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F.** 1997b. Ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves: Changes induced by leaf senescence. *Phyton-An. Rei Bot.* **37**: 101-107.

**Jiménez A, Hernández JA, Barceló AR, Sandalio LM, del Río LA, Sevilla F.** 1998. Mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *Physiol. Plant.* **104**: 687-692.

**Johnson TC, Cao RQ, Kung JE, Buchanan BB.** 1987. Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta* **171**: 321-331.

**Jönsson TJ, Lowther WT.** 2007. The peroxiredoxin repair proteins. *Subcellular Biochemistry* **44**: 115-141.

**Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Lowther WT.** 2008a. Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. *J. Biol. Chem.* **283**: 23846-23851.

**Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Poole LB, Lowther WT.** 2005. Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* **44**: 8634-8642.

**Jönsson TJ, Tsang AW, Lowther WT, Furdai CM.** 2008b. Identification of intact protein thiosulfinate intermediate in the reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **283**: 22890-22894.

**Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG.** 1998. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **273**: 6297-6302.

**Karplus PA, Hall A.** 2007. Structural survey of the peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* **44**: 41-60.

**Kim SY, Jang HH, Lee JR, Sung NR, Lee HB, Lee DH, Park DJ, Kang CH, Chung WS, Lim CO, Yun DJ, Kim WY, Lee KO, Lee SY.** 2009. Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. *Plant Science* **177**: 227-232.

**Kim K, Kim IH, Lee K-Y.** 1988. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixedfunction oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**: 4704-4711.

**Knoops B, Clippe A, Bogard C, Arsalane K, Wattiez R, Hermans C, Duconseille E, Falmagne P, Bernard A.** 1999. Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**: 30451-30458.

**Knox JP, Dodge AD.** 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**: 889-869.

**König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürman P, Dietz KJ.** 2002. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy photosynthetic electron flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 5738-5743.

**König J, Lotte K, Plessow R, Brockhinke A, Baier M, Dietz KJ.** 2003. Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **278**: 24409-24420.

**Kong W, Shiota S, Shi Y, Nakayama H, Nakayama K.** 2000. A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein (Bcp). *Biochem. J.* **351**: 107-114.

- Koo KH, Lee S, Jeong SY, Kim ET, Kim HJ, Kim K, Song K, Chae HZ.** 2002. Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 312-318.
- Kopnin PB, Agapova LS, Kopnin BP, Chumakov PM.** 2007. Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability. *Cancer Res.* **67**:4671-4678.
- Kornberg A, Pricer WE Jr.** 1951. Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* **193**: 481-495.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laloi M, Klein M, Riesmeier JW, Mullerrober B, Fleury C, Bouillaud F, Ricquier D.** 1997. A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature* **389**: 135-136.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y.** 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14144-14149.
- Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schottler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A, Weis E, Miginiac-Maslow M, Dietz KJ.** 2006. Prx Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *Plant J.* **45**: 968-981.
- Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ.** 2001. Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **276**: 29826-29832.
- Lee DY, Park SJ, Jeong W, Sung HJ, Oho T, Wu X, Rhee SG, Gruschus JM.** 2006. Mutagenesis and modeling of the peroxiredoxin (Prx) complex with the NMR structure of ATP-bound human sulfiredoxin implicate aspartate 187 of Prx I as the catalytic residue in ATP hydrolysis. *Biochemistry* **45**: 15301-15309.
- Lei K, Townsend DM, Tew KD.** 2008. Protein cysteine sulfinic acid reductase (sulfiredoxin) as a regulator of cell proliferation and drug response. *Oncogene* **27**: 4877-4887.
- Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M.** 2003. Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **543**: 87-92.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C.** 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative *Bursa orchestraes* the plant hypersensitive disease resistente response. *Cell* **79**: 583-593.
- Lewis ML, Miki K, Ueda T.** 2000. FePER1, a gene encoding an evolutionary conserved 1-Cys peroxiredoxin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), is expressed in a seedspecific manner and induced during seed germination. *Gene* **246**: 81-91.

**Li H, Robertson AD, Jensen JH.** 2005. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK<sub>a</sub> values. *Proteins* **61**: 704-721.

**Lim JC, Choi HI, Park YS, Nam HW, Woo HA, Kwon KS, Kim YS, Rhee SG, Kim K, Chae HZ.** 2008. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J. Biol. Chem.* **283**: 28873-28880.

**Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, Wang DW.** 2006. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Research* **16**: 287-296.

**Lowther WT, Haynes AC.** 2010. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. *Antiox. Redox Sign.* doi: 10.1089/ars.2010.3564.

**Lowther WT, Weissbach H, Etienne F, Brot N, Matthews BW.** 2002. The mirrored methionine sulphoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 348-352.

**Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ.** 2005. Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* **17**: 3111-31140.

**Martí MC, Olmos E, Calvete JJ, Díaz I, Barranco-Medina S, Whelan J, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A.** 2009. Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: Identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiol.* **150**: 646-657.

**Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP.** 2008. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**: 589-600.

**Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP.** 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**: 394-402.

**Mitschke J, Fuss J, Blum T, Höglund A, Reski R, Kohlbacher O, Rensing SA.** 2009. Prediction of dual protein targeting to plant organelles. *New Phytol.* **183**: 224-235.

**Mitsumoto A, Nakagawa Y, Takeuchi A, Okawa K, Iwamatsu A, Takanezawa Y.** 2001. Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic. Res.* **35**: 301-310.

**Mittler R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405-410.

**Moon JC, Hah YS, Kim WY, Jung BG, Jang HH, Lee JR, Kim SY, Lee YM, Jeon MG, Kim CW, Cho MJ, Lee SY.** 2005. Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **280**: 28775-28784.

- Morita S, Kaminaka H, Masamura T, Takana K.** 1999. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress, the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant Cell Physiol.* **40**: 417-422.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473.
- Neumann CA, Cao J, Manevich Y.** 2009. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* **8**: 4072-4078.
- Nogoceke E, Gommel DU, Kiess M, Kalisz HM, Flohe L.** 1997. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biol. Chem.* **378**: 827-836.
- Noh YH, Baek JY, Jeong W, Rhee SG, Chang TS.** 2009. Sulfiredoxin translocation into mitochondria plays a crucial role in reducing hyperoxidized peroxiredoxin III. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 8470-8477.
- Olmos E, Hernández JA, Sevilla F, Hellin E.** 1994. Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*. *J. Plant Physiol.* **144**: 594-595.
- Park JW, Mieyal JJ, Rhee SG, Chock PB.** 2009. Deglutathionylation of 2-Cys peroxiredoxin is specifically catalyzed by sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **284**: 23364-23374.
- Pavlov PF, Rudhe C, Bhushan S, Glaser E.** 2007. In vitro and in vivo protein import into plant mitochondria. *Methods Mol. Biol.* **372**: 297-314.
- Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ.** 2006. Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**: 2356-2368.
- Polgár L.** 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2161-2172.
- Poole LB.** 1996. Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* 2 Cysteine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction. *Biochemistry* **35**: 65-75.
- Poole LB.** The catalytic mechanism of peroxiredoxins. 2007. *Subcell. Biochem.* **44**: 61-81.
- Prasad TK.** 1997. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol.* **114**: 1369-1376.
- Pujol C, Maréchal-Drouard L, Duchêne AM.** 2007. How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J. Mol. Biol.* **369**: 356-367.

- Rey P, Becuwe N, Barrault MB, Rumeau D, Havaux M, Biteau B, Toledano MB.** 2007. The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. *Plant Journal* **49**: 505-514.
- Rey P, Cui n  S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot JP, Rouhier N, Broin M.** 2005. Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *Plant J.* **4**: 31-42.
- Rhee SG.** 2005. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 173-180.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K.** 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 1543-1552.
- Rhee SG, Jeong W, Chang TS, Woo HA.** 2007. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int. Suppl.* **106**: 3-8.
- Ritchter C, Schweizer M.** 1997. Oxidative stress in mitochondria. *En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, ed, Scandalios JG*, pp. 169-200, Cold spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Rodríguez Milla MA, Rodríguez Huete A, Gustafson JP.** 2003. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J.* **36**: 602-615.
- Rouhier N, Gelhaye E, Corbier C, Jacquot JP.** 2004. Active site mutagenesis and phospholipid hydroperoxide reductase activity in poplar type II peroxiredoxin. *Physiol. Plantarum* **120**: 57-62.
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP.** 2002. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**: 13609-13614.
- Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Fay E, Meyer Y, Jacquot JP.** 2001. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* **127**: 1299-1309.
- Rouhier N, Jacquot JP.** 2002. Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth. Res.* **74**: 259-268.
- Rouhier N, Vieira Dos Santos C, Tarrago L, Rey P.** 2006. Plant methionine sulfoxide reductase a and b multigenic families. *Photosynth. Res.* **89**: 247-262.
- Roussel X, Béchade G, Kriznik A, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, Rahuel-Clermont S.** 2008. Evidence for the formation of a covalent thiosulphinat intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *J. Biol. Chem.* **283**: 22371-22382.



- Roussel X, Kriznik A, Richard C, Rahuel-Clermont S, Branlant G.** 2009. Catalytic mechanism of sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* passes through an oxidized disulfide sulfiredoxin intermediate that is reduced by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **284**: 33048-33055.
- Rudhe C, Chew O, Whelan J, Glaser E.** 2002. A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* **30**: 213-220.
- Rüegsegger A, Brunold C.** 1993. Localization of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* **101**: 561-566.
- Sahrawy M, Hetch V, López-Jaramillo J, Chueca A, Chartier Y, Meyer Y.** 1996. Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J. Mol. Evol.* **42**: 422-431.
- Schröder E, Littlechild JA, Lebedev A.A, Errington N, Vagin AA, Isupov MN.** 2000. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* **8**: 605-615.
- Serrato AJ, Cejudo FJ.** 2003. Type-H Thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**: 392-399.
- Smet ID, VoB U, Jürgens G, Beeckman T.** 2009. Receptor-like kinases shape the plant. *Nature Cell Biology* **11**: 1166-1173.
- Smirnoff N.** 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* **125**: 27-58.
- Soriano FX, Papadia S, Bell KF, Hardingham GE.** 2009. Role of histone acetylation in the activity-dependent regulation of sulfiredoxin and sestrin 2. *Epigenetics* **4**: 152-158.
- Stacy RA, Nordeng TW, Cullianez-Macia FA, Aalen RB.** 1999. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER 1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J.* **19**: 1-8.
- Studier FW, Moffatt BA.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**: 113-130.
- Sturgeon BE, Sipe HJ, Barr DP, Corbett JT, Martinez JG, Mason RP.** 1998. The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbate. Implications for the radical sink hypothesis. *J. Biol. Chem.* **273**: 30116-30121.
- Thurman RG, Ley HG, Scholz R.** 1972. Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.* **25**: 420-430.
- Traverso JA, Vignols F, Cazalis R, Serrato AJ, Pulido P, Sahrawy M, Meyer Y, Cejudo FJ, Chueca A.** 2008. Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *J. Exp. Bot.* **59**:1267-1277.

- Trumper S, Follmann H, Haberlein Y.** 1994. A novel dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts homologous to plant trypsin inhibitor. *FEBS Lett.* **352**: 159-162.
- Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, Seizinger B, Kley N.** 1999. PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene* **18**: 127-137.
- Verdoucq L, Vignols F, Jacquot JP, Chartier Y, Meyer Y.** 1999. *In vivo* characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**: 19714-19722.
- Villalba JM, Córdoba F, Navas P.** 1995. Ascorbate and the plasma membrane: a new view of cell growth control. *En: Ascorbic acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology* 4, pp 57-81 (JR Haris ed.) Plenum press, New York.
- Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, Hidalgo E.** 2005. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 8875-8880.
- Vranova E, Inze D, Van Breusegem F.** 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **53**: 1227-1236.
- Wei Q, Jiang H, Matthews CP, Colburn NH.** 2008. Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19738-19743.
- Welling GW, Weijer WJ, van der Zee R, Welling-Wester S.** 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* **188**: 215-218.
- Wells WW, Xu DP.** 1994. Dehydroascorbate reduction. *J. Bioenerg. Biomemb.* **26**: 369-377.
- Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W.** 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* **1**: 207-228.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W.** 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J.* **16**: 4806-4816.
- Wisniewski JP, Cornille P, Agnel JP, Montillet JL.** 1999. The extension multigene family responds differentially to superoxide or hydrogen peroxide in tomato cell cultures. *FEBS Lett.* **447**: 264-268.
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG.** 2003a. Reversing the inactivation of peroxiredoxin caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**: 653-656.
- Woo HA, Bae SH, Park S, Rhee SG.** 2009. Sestrin 2 is not a reductase for cysteine sulfinic acid of peroxiredoxins. *Antioxid. Redox Signal* **11**: 739-745.

**Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG.** 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **280**: 3125-3128.

**Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG.** 2003b. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J. Biol. Chem.* **278**: 47361-47364.

**Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG.** 2010. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation for cell signaling. *Cell* **19**: 517-528.

**Wood ZA, Schröder E, Harris JL, Poole LB.** 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 32-40.

**Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, Rhee SG.** 2002. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J. Biol. Chem.* **277**: 38029-38036.

**Zhang B, Wang Y, Su Y.** 2009. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy. *Cancer Lett.* **286**: 154-160.



## **ANEXOS**



## **I.- Abreviaturas**





---

A	Absorbancia (densidad óptica)
aa	Aminoácido
ADP	Adenosín difosfato
Apx	Ascorbato peroxidasa
AMP	Adenosín monofosfato
AMS	4-acetamida-4'-maleimidilestilbeno-2,2'-ácido disulfónico
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin trifosfato
AtWT	Variedad silvestre de <i>A. thaliana</i>
Å	Amstrong
βME	B-mercapto etanol
cDNA	DNA complementario
Cys	Cisteína
C72S	Sulfirredoxina mutada en la cisteína
Δ	Incremento
ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio de entalpía
ΔS	Cambio de entropía
Da	Dalton
DAB	3,3'-diaminobencidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
dpi	Días post-inoculación
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilén diamina tetraacético
ELISA	Inmunoensayo enzimático en soporte sólido
E76A	Ácido Glutámico mutado a Alanina
Fd	Ferredoxina
FPLC	Cromatografía rápida de proteínas
Fv/Fm	Eficiencia fotosintética
gDNA	Ácidos desoxirribonucléico genómico
GFP	Proteína verde fluorescente
GSH	Glutati6n reducido
GSHR	Glutati6n reductasa
GSSG	Glutati6n oxidado
h	horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Per6xido de hidr6geno
IgG	Inmunoglobulina G

---

$k_{cat}$	Constante catalítica
kDa	kilodalton
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
KO	Knock-out
K40Q	Lisina mutada a Glutamina
LDH	Láctico deshidrogenasa
M	Molar
Mb	Membrana
MDHR	Monodehidroascorbato reductasa
min.	Minutos
mM	milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD(P)/NAD(P)H	Nicotinamín adenín dinucleótido (fosfato)
NF $\kappa$ B	Receptor nuclear $\kappa$ B
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con Tween
PBSTA	Tampón fosfato salino con Tween y albúmina
PBSA	Tampón fosfato salino con albúmina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén glicol
PEP	Fosfoenol piruvato
$P_i$	Fosfato inorgánico
pI	Punto isoelectrico
<i>P. sativum</i>	Guisante ( <i>Pisum sativum</i> )
PK	Piruvato kinasa
$pK_a$	-log de la fuerza de disociación de un ácido débil
Prx	Peroxirredoxina
p/v	Peso/volumen
PS	Fotosistema
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RONS	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
R28Q	Arginina mutada a Glutamina
R28Q/E76A	Doble mutante en Arginina a Glutamina y Ácido Glutámico a Alanina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con SDS
-SH	Grupo tiol

SOD	Superóxido dismutasa
-SOH	Ácido sulfénico
-SO <sub>2</sub> H	Ácido sulfínico
-SO <sub>3</sub> H	Ácido sulfónico
<i>S. pombe</i>	Schizosaccharomyces pombe
Srx	Sulfirredoxina
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TBHP	Tert-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tpx	Tiorredoxín peroxidasa
TR	Tiorredoxín reductasa
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Trx	Tiorredoxina
TSA	Antioxidante específico de tioles
UE	Unidad enzimática
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen



## **II.- Índice de figuras y tablas**



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

*Página*

### **Introducción**

<b>Fig. 1.-</b> Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la reducción del oxígeno a agua.	7
<b>Fig. 2.-</b> Esquema de la reacción de Fenton.	8
<b>Fig. 3.-</b> Regulación y respuesta celular a ROS.	10
<b>Fig. 4.-</b> Clasificación y mecanismo de las peroxirredoxinas.	17
<b>Fig. 5.-</b> Comparativa de localización subcelular de Prxs en arroz y <i>A. thaliana</i> .	18
<b>Fig. 6.-</b> Esquema del mecanismo de acción de las Trxs y sus sistemas FTR y NTR de regeneración.	22
<b>Fig. 7.-</b> Ciclo de sobreoxidación de las peroxirredoxinas.	25
<b>Fig. 8.-</b> Comparación entre los mecanismos de reacción propuestos de la Srx.	26
<b>Fig. 9.-</b> Ciclo catalítico de la Srx.	27
<b>Fig. 10.-</b> Estructura cristalina de la hSrx-ATP.	29
<b>Fig. 11.-</b> Modelo estructural propuesto del mecanismo de acción de la hSrx.	29
<b>Fig. 12.-</b> Modelo de activación de la cascada de señalización de Sty1 y Pap1 en respuesta a estrés oxidativo en <i>S. pombe</i> .	31

### **Material y métodos**

<b>Fig. 13.-</b> Esquema general de PCR.	57
<b>Fig. 14.-</b> Esquema general de mutagénesis dirigida.	59
<b>Fig. 15.-</b> Esquema general de qRT-PCR.	60
<b>Fig. 16.-</b> Reacción del DTNB con los grupos SH libres.	71
<b>Fig. 17.-</b> Esquema del método colorimétrico de cuantificación de $P_i$ .	77
<b>Fig. 18.-</b> Esquema del método espectrofotométrico de determinación de ADP.	78

**Resultados**

***Página***

<b>Fig. 19.-</b> Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las Srxs de <i>Arabidopsis thaliana</i> (número de acceso At1g31170), <i>Solanum lycopersicum</i> (número de acceso EST TC68871) y <i>Oryza sativa</i> (número de acceso AAZ52795).	83
<b>Fig. 20.-</b> Alineamiento de bases de las secuencias de Srxs vegetales descritas.	84
<b>Fig. 21.-</b> Electroforesis de AtSrx y PsSrx en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.	85
<b>Fig. 22.-</b> Secuencias de la sulfirredoxina de guisante (número de acceso GU223224.1).	85
<b>Fig. 23.-</b> Secuencias nucleotídica y aminoacídicas de la Srx de <i>A. thaliana</i> (AtSrx).	86
<b>Fig. 24.-</b> Secuencias nucleotídica y aminoacídicas de la Srx de guisante (PsSrx).	86
<b>Fig. 25.-</b> Secuencias aminoacídicas de las Srx de guisante (PsSrx) y <i>A. thaliana</i> (AtSrx).	87
<b>Fig. 26.-</b> Electroforesis de los productos obtenidos por PCR la Srx de <i>A. thaliana</i> (At) y de guisante (Ps).	89
<b>Fig. 27.-</b> Electroforesis de los productos obtenidos por mutagénesis dirigida de la AtSrx.	89
<b>Fig. 28.-</b> Construcciones plasmídicas de Srx/pETM-11.	90
<b>Fig. 29.-</b> Expresión de la AtSrx recombinante.	92
<b>Fig. 30.-</b> Cromatograma obtenido tras cromatografía de afinidad de la AtSrx por columna de níquel.	93
<b>Fig. 31.-</b> SDS-PAGE de las fracciones obtenidas tras cromatografía de afinidad de la AtSrx por columna de níquel.	93
<b>Fig. 32.-</b> Cromatograma obtenido tras cromatografía de intercambio iónico de la AtSrx por columna MonoQ.	94
<b>Fig. 33.-</b> SDS-PAGE de fracciones obtenidas tras cromatografía de intercambio iónico de la AtSrx en columna de MonoQ.	95



	<i>Página</i>
<b>Fig. 34.-</b> Purificación de la AtSrx recombinante.	95
<b>Fig. 35.-</b> Cromatograma obtenido tras análisis cromatográfico en columna de filtración molecular.	96
<b>Fig. 36.-</b> Calibración de la Superdex 200 con proteínas marcadoras.	97
<b>Fig. 37.-</b> Potenciales redox para la Srx y sus mutantes.	98
<b>Fig. 38.-</b> Antigenicidad de la nAtSrx basado en el análisis de predicción de Welling.	100
<b>Fig. 39.-</b> Título y especificidad del anticuerpo policlonal frente a la Srx.	101
<b>Fig. 40.-</b> Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la 2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H de cloroplastos de hojas de guisante.	102
<b>Fig. 41.-</b> Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la PsSrx de hojas de guisante.	102
<b>Fig. 42.-</b> Inmunomarcaje doble de cloroplastos de hojas de guisante.	103
<b>Fig. 43.-</b> Inmunomarcaje con oro coloidal de 30 nm de la PsSrx de hojas de guisante.	103
<b>Fig. 44.-</b> Localización en cloroplastos y mitocondrias de guisante y <i>A. thaliana</i> del sistema Prx-Srx mediante Western blot.	104
<b>Fig. 45.-</b> Cuantificación por Western blot del contenido de AtSrx en el cloroplasto.	105
<b>Fig. 46.-</b> Localización intracloroplastídica de la PsSrx.	106
<b>Fig. 47.-</b> Localización intracloroplastídica de la 2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H.	106
<b>Fig. 48.-</b> Localización sub-mitocondrial de la PsSrx.	107
<b>Fig. 49.-</b> Western blot del ensayo de importe dual de la nAtSrx a cloroplastos y mitocondrias de <i>A. thaliana</i> KO en Srx ( $\Delta$ Srx).	108
<b>Fig. 50.-</b> Actividad peroxidasa de las formas reducidas y sobreoxidadas de las Prxs.	109
<b>Fig. 51.-</b> Western blot de la 2-Cys Prx reducida y sobreoxidada.	109
<b>Fig. 52.-</b> Western blot de las formas sobreoxidadas de las Prxs de guisante tratadas con AMS.	110
<b>Fig. 53.-</b> Western blot de las formas reducida (Red), oxidada (Ox) y	111

sobreoxidada (Oox) de las Prxs de <i>A. thaliana</i> tratadas con AMS (+AMS) o sin AMS (-AMS).	<b>Página</b>
<b>Fig. 54.-</b> Actividad peroxidasa de las formas reducida y sobreoxidada de la Ps-2-Cys Prx y tras ser regenerada por la PsSrx tras 3 h de reacción.	111
<b>Fig. 55.-</b> Adición de citrato a diferentes tiempos para la determinación colorimétrica de P <sub>i</sub> .	112
<b>Fig. 56.-</b> Actividad enzimática de la AtSrx determinada mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado en ausencia de agente reductor.	113
<b>Fig. 57.-</b> Análisis en FPLC de ADP generado por la actividad de la Srx a los tiempos indicados.	115
<b>Fig. 58.-</b> Correlación entre la determinación de la actividad Srx mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado y mediante análisis de inmunoblot.	116
<b>Fig. 59.-</b> Actividad enzimática de la AtSrx determinada mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado en ausencia y presencia de agente reductor (GSH).	116
<b>Fig. 60.-</b> Actividad peroxidasa de las Prxs cloroplastídicas reducidas (Prxs-SH), sobreoxidadas (Prxs-SO <sub>2</sub> H) y sobreoxidadas incubadas con AtSrx “overnight”.	118
<b>Fig. 61.-</b> Análisis en FPLC de ADP generado por la actividad de la Srx tras 3 h de reacción.	119
<b>Fig. 62.-</b> Actividad enzimática de la AtSrx (1 μM) con AtPrx Q y AtPrx IIE cloroplastídicas, determinada mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado.	119
<b>Fig. 63.-</b> Actividad peroxidasa de las Prxs no cloroplastídicas PsPrx IIF y PsPrx IIC en sus formas reducidas, sobreoxidadas y tras ser incubadas con la PsSrx.	120
<b>Fig. 64.-</b> Análisis en FPLC de ADP generado por la actividad de la Srx con la Prx IIF.	121
<b>Fig. 65.-</b> Actividad enzimática de la PsSrx con la PsPrx IIF determinada mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado.	122
<b>Fig. 66.-</b> Actividad peroxidasa de las Prx I y V humanas en sus formas reducidas, sobreoxidadas y tras ser incubadas con la PsSrx.	122
<b>Fig. 67.-</b> Actividad enzimática de la PsSrx con la PsPrx IIF determinada	123

	<i><b>Página</b></i>
mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado.	
<b>Fig. 68.-</b> Actividad catalítica preferencial de la AtSrx con las Prxs cloroplastídicas At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H Vs AtPrx Q-SO <sub>2</sub> H, mediante análisis de imagen del Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx.	124
<b>Fig. 69.-</b> Actividad catalítica preferencial de la PsSrx con la Ps-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H Vs PsPrx IIF-SO <sub>2</sub> H y la hPrx I-SO <sub>2</sub> H Vs hPrx V-SO <sub>2</sub> H, mediante análisis de imagen del Western blot utilizando el anticuerpo específico frente a la forma sobreoxidada de la 2-Cys Prx.	125
<b>Fig. 70.-</b> Actividad Srx a diferentes pH mediante determinación del P <sub>i</sub> liberado tras 2 h de reacción.	125
<b>Fig. 71.-</b> Análisis en FPLC de ADP generado por la actividad de mutantes de la Srx tras 3 h de incubación.	126
<b>Fig. 72.-</b> Actividad enzimática de los mutantes de la AtSrx determinada mediante cuantificación del P <sub>i</sub> liberado.	127
<b>Fig. 73.-</b> Actividad chaperona de las Prxs y Srxs vegetales.	131
<b>Fig. 74.-</b> Actividad peroxidasa y chaperona de la At-2-Cys Prx reducida, sobreoxidada y tras retroreducción por la AtSrx.	132
<b>Fig. 75.-</b> Actividad deglutationizadora de la Srx frente a la 2-Cys Prx.	133
<b>Fig. 76.-</b> Caracterización de la interacción 2-Cys Prx / Srx mediante ensayo de “pull-down”.	134
<b>Fig. 77.-</b> Caracterización de la interacción Prx Q / Srx mediante ensayo de “pull-down”.	136
<b>Fig. 78.-</b> Caracterización de la interacción Prx IIF / Srx mediante ensayo de “pull-down”.	137
<b>Fig. 79.-</b> Caracterización de la interacción Srx / Trx <sub>o</sub> mediante Western blot.	139
<b>Fig. 80.-</b> Análisis electroforético de la interacción entre Prx IIF y Trx <sub>o</sub> mitocondrial de guisante.	140
<b>Fig. 81.-</b> Actividad Srx con la forma sulfínica de la 2-Cys Prx o la Prx Q usando diferentes agentes reductores fisiológicos cloroplastídicos.	141
<b>Fig. 82.-</b> Esquema genómico de las inserciones contenidas en las líneas	142

	<i>Página</i>
mutantes $\Delta$ PrxB, $\Delta$ Prx IIF y $\Delta$ Srx.	
<b>Fig. 83.-</b> Identificación de los mutantes de <i>A. thaliana</i> $\Delta$ PrxB, $\Delta$ Prx IIF y $\Delta$ Srx mediante PCR.	143
<b>Fig. 84.-</b> Diferencias fenotípicas en el crecimiento de los mutantes en Prxs y Srx de <i>A. thaliana</i> crecidos durante 15, 22 y 40 días en ciclo corto o ciclo largo.	144
<b>Fig. 85.-</b> Diferencias fenotípicas del $\Delta$ Srx y $\Delta$ Prx B y recuperación del fenotipo salvaje (AtWT) por complementación ( $\Delta$ Srx+Srx).	144
<b>Fig. 86.-</b> Caracterización de los mutantes de <i>A. thaliana</i> mediante estrés durante la germinación.	146
<b>Fig. 87.-</b> Respuesta del $\Delta$ Prx B y $\Delta$ Srx al tratamiento por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	147
<b>Fig. 88.-</b> Tinción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en hoja de mutantes de <i>A. thaliana</i> bajo tratamiento oxidativo.	147
<b>Fig. 89.-</b> Medidas de fluorescencia de hojas de mutantes tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	148
<b>Fig. 90.-</b> Parámetros de daño oxidativo en hojas de mutantes de <i>A. thaliana</i> tras 24 h de tratamiento con 20 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	149
<b>Fig. 91.-</b> Seguimiento de plantas de <i>A. thaliana</i> y mutantes inoculadas con bacterias.	150
<b>Fig. 92.-</b> Visualización de la eficiencia fotosintética de mutantes de <i>A. thaliana</i> sometidos a estrés biótico.	151
<b>Fig. 93.-</b> Inmunoanálisis de la Prx total y sobreoxidada de mutantes de <i>A. thaliana</i> sometidos a estrés biótico.	152
<b>Fig. 94.-</b> Parámetros de daño oxidativo en hojas de mutantes de <i>A. thaliana</i> tras 24 y 48 h inoculación con <i>Pseudomonas</i> .	153
<b>Fig. 95.-</b> Inmunoanálisis bidimensional de la 2-Cys Prx en extracto de hoja del mutante “knock out” en Srx.	154
<b>Fig. 96.-</b> Inmunoanálisis bidimensional de la Prx IIF en extracto de hoja del mutante “knock out” en Srx ( $\Delta$ Srx) en comparación con la AtSrx, en ausencia (-DTT) o presencia (+DTT) de agente reductor.	154
<b>Fig. 97.-</b> Inmunoanálisis bidimensional de la Prx Q sobreoxidada en extracto de hoja de <i>A. thaliana</i> en presencia de agentes reductores.	155

	<i>Página</i>
<b>Fig. 98.-</b> Estrés salino en plantas de guisante de 21 días.	156
<b>Fig. 99.-</b> Determinación del peróxido de hidrógeno en plantas de guisante sometidas a estrés salino.	157
<b>Fig. 100.-</b> Parámetros de daño oxidativo en plantas de guisante sometidas a estrés salino.	158
<b>Fig. 101.-</b> Niveles de expresión transcripcional del sistema Prx/Srx en plantas de guisante sometidas a estrés salino.	159
<b>Fig. 102.-</b> Niveles de expresión traduccional del sistema Prx/Srx en plantas de guisante sometidas a estrés salino.	160
<b>Fig. 103.-</b> Niveles de expresión transcripcional del sistema Prx/Srx en plantas de guisante sometidas a diferentes tipos de estrés oxidativo.	161
<b>Fig. 104.-</b> Interacción-protección de la AtSrx y sus mutantes al DNA plasmídico.	161
<b>Fig. 105.-</b> Estudio de viabilidad a estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y cafeína en cepas de <i>S.pombe</i> con deleciones del sistema Prx/Srx/Trx.	162
<b>Fig. 106.-</b> Medida de niveles de ROS producido en WT, $\Delta pap1$ y $\Delta srx1$ tras tratamiento con cafeína.	163
<b>Fig. 107.-</b> Activación de Sty1 por estrés oxidativo.	164
<b>Fig. 108.-</b> Transporte nuclear de Sty1 por estrés oxidativo.	164
<b>Fig. 109.-</b> Estudio de viabilidad a estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y cafeína en cepas de <i>S.pombe</i> con sobreactivación de Sty1.	165
<b>Fig. 110.-</b> Activación de Pap1 por estrés oxidativo.	166
<b>Fig. 111.-</b> Transporte nuclear de Pap1 por estrés oxidativo.	166
<b>Fig. 112.-</b> Estudio de viabilidad a estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y cafeína en cepas de <i>S.pombe</i> con sobreactivación de Pap1.	167
<b>Fig. 113.-</b> Curva de crecimiento de <i>S. pombe</i> “wild type” en condiciones de estrés oxidativo.	168
<b>Fig. 114.-</b> Curvas de crecimiento de cepas de <i>S. pombe</i> tratadas con cafeína o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .	169
<b>Fig. 115.-</b> Papel de Tpx y Srx1 en la muerte celular por cafeína en <i>S. pombe</i> .	170

**Discusión**

*Página*

<b>Fig. 116.-</b> Esquema sobre el modelo estructural de la AtSrx de la vía de activación secundaria de la cisteína catalítica vía glutámico-histidina.	179
<b>Fig. 117.-</b> Esquema de localización intracloroplastídica de la Srx, 2-Cys Prx dimérica, decamérica y sulfínica, y de la Prx Q.	183
<b>Fig. 118.-</b> Esquema del ciclo catalítico de la Srx para la reducción de la forma sulfínica de la Prx.	185
<b>Fig. 119.-</b> Modelo propuesto para el mecanismo de acción de la sulfirredoxina mitocondrial en el sistema formado por la Prx IIF, Srx y Trx $\alpha$ .	186
<b>Fig. 120.-</b> Esquema general de regulación de la actividad peroxidasa y chaperona de la Prx por medio de RONS o de la Srx.	187
<b>Fig. 121.-</b> Modelo propuesto de respuesta celular implicada en la respuesta a cafeína en <i>S. pombe</i> .	190
<b>Fig. 122.-</b> Esquema del papel señalizador de la forma sulfínica de la Prx regulado por la Srx.	190
<b>Fig. 123.-</b> Esquema de los procesos de señalización y actividad en los que están implicados la Srx y la Prx.	192

**ÍNDICE DE TABLAS*****Página*****Introducción**

<b>Tabla 1.-</b> Mecanismos y localización de ROS en plantas.	9
---	---

**Material y métodos**

<b>Tabla 2.-</b> Cepas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	39
<b>Tabla 3.-</b> Tratamiento de estrés salino en guisantes.	41
<b>Tabla 4.-</b> Medios de cultivo bacteriano.	48
<b>Tabla 5.-</b> Cepas de <i>S. pombe</i> utilizadas.	51
<b>Tabla 6.-</b> Vectores plasmídicos utilizados.	55
<b>Tabla 7.-</b> Oligonucleótidos diseñados.	56
<b>Tabla 8.-</b> Concentraciones y proporciones para mini-geles de poliacrilamida.	64
<b>Tabla 9.-</b> Anticuerpos primarios.	72

**Resultados**

<b>Tabla 10.-</b> Probabilidad de localización subcellular de las AtSrx y PsSrx según los programas bioinformáticos ChloroP, MitoProt y MultiLoc/TargerLoc.	87
<b>Tabla 11.-</b> Valores de masa y radio de Stokes de la AtSrx y C72S-AtSrx determinados mediante columna Superdex 200.	98
<b>Tabla 12.-</b> Determinación de los grupos tiol de la Srx de guisante y <i>A. thaliana</i> , y sus variantes R28Q, K40Q, C72S, E76A y doble mutante R28Q/E76A.	99
<b>Tabla 13.-</b> Actividad Srx mediante determinación de P <sub>i</sub> y de ADP generado.	114
<b>Tabla 14.-</b> Parámetros cinéticos de la Srx de <i>A. thaliana</i> y guisante con cada uno de sus substratos.	128

	<i><b>Página</b></i>
<b>Tabla 15.-</b> Parámetros cinéticos de la AtSrx y sus mutantes con cada uno de sus sustratos.	129
<b>Tabla 16.-</b> Valores de $pK_a$ , efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno de la hSrx.	129
<b>Tabla 17.-</b> Valores de $pK_a$ , efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno del modelo de estructura terciaria de la AtSrx basado en el 1xw3 del PDB.	130
<b>Tabla 18.-</b> Valores de $pK_a$ , efectos de desolvatación y puentes de hidrógeno del modelo de estructura terciaria de la AtSrx basado en el 3cyi del PDB.	130
<b>Tabla 19.-</b> Parámetros termodinámicos de la interacción 2-Cys Prx / Srx.	135
<b>Tabla 20.-</b> Parámetros termodinámicos de la interacción Prx Q / Srx.	137
<b>Tabla 21.-</b> Parámetros termodinámicos de la interacción Prx IIF / Srx.	138
<b>Tabla 22.-</b> Parámetros termodinámicos de la interacción Srx / Trx.	140
<b>Tabla 23.-</b> Parámetros fenotípicos de los mutantes y transformada de <i>A. thaliana</i> .	145



### **III.- Publicaciones científicas – Scientific publications**



2009. *PLoS One* 4. e6619.

# Genome-Wide Screen of Genes Required for Caffeine Tolerance in Fission Yeast

Isabel A. Calvo<sup>1</sup>\*, Natalia Gabrielli<sup>1</sup>\*, Iván Iglesias-Baena<sup>1</sup>\*, Sarela García-Santamarina<sup>1</sup>, Kwang-Lae Hoe<sup>2</sup>, Dong Uk Kim<sup>2</sup>, Miriam Sansó<sup>1</sup>, Alice Zuin<sup>1</sup>, Pilar Pérez<sup>3</sup>, José Ayté<sup>1</sup>, Elena Hidalgo<sup>1</sup>\*

**1** Oxidative Stress and Cell Cycle Group, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, **2** Pombe Deletion Project, KRIBB, Yuseong-gu, Daejeon, Republic of Korea, **3** Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC, Salamanca, Spain

## Abstract

**Background:** An excess of caffeine is cytotoxic to all eukaryotic cell types. We aim to study how cells become tolerant to a toxic dose of this drug, and the relationship between caffeine and oxidative stress pathways.

**Methodology/Principal Findings:** We searched for *Schizosaccharomyces pombe* mutants with inhibited growth on caffeine-containing plates. We screened a collection of 2,700 haploid mutant cells, of which 98 were sensitive to caffeine. The genes mutated in these sensitive clones were involved in a number of cellular roles including the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Pap1 and Sty1 stress pathways, the integrity and calcineurin pathways, cell morphology and chromatin remodeling. We have investigated the role of the oxidative stress pathways in sensing and promoting survival to caffeine. The Pap1 and the Sty1 pathways are both required for normal tolerance to caffeine, but only the Sty1 pathway is activated by the drug. Cells lacking Pap1 are sensitive to caffeine due to the decreased expression of the efflux pump Hba2. Indeed, *hba2* cells are sensitive to caffeine, and constitutive activation of the Pap1 pathway enhances resistance to caffeine in an Hba2-dependent manner.

**Conclusions/Significance:** With our caffeine-sensitive, genome-wide screen of an *S. pombe* deletion collection, we have demonstrated the importance of some oxidative stress pathway components on wild-type tolerance to the drug.

**Citation:** Calvo IA, Gabrielli N, Iglesias-Baena I, García-Santamarina S, Hoe K-L, et al. (2009) Genome-Wide Screen of Genes Required for Caffeine Tolerance in Fission Yeast. *PLoS ONE* 4(8): e6619. doi:10.1371/journal.pone.0006619

**Editor:** Marcelo Bonini, National Institutes of Health (NIH)/National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), United States of America

**Received:** April 17, 2009; **Accepted:** July 9, 2009; **Published:** August 12, 2009

**Copyright:** © 2009 Calvo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Dirección General de Investigación de Spain Grant BFU2006-02610, and by the Spanish program Consolider-Ingenio 2010 Grant CSD 2007-0020, to E.H. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: elena.hidalgo@upf.edu

□ Current address: Department of Biochemistry, Cell and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain

● These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The methylxanthine derivative caffeine is an analogue of purine bases which has been involved in a variety of cellular processes in eukaryotic cells, including mammals, plants and fungi. Caffeine has shown a wide array of pharmacological and biological effects that interfere with DNA repair and recombination pathways, delay cell cycle progression and modulate intracellular calcium homeostasis. However, the manner in which caffeine triggers these pleiotropic effects is still largely unknown. Many groups have used genetically tractable organisms to study the biological and toxic effects of caffeine. Thus, in *Saccharomyces cerevisiae*, caffeine has been reported to affect cell cycle progression [1,2] and cell morphology and integrity [3]. In *Schizosaccharomyces pombe*, caffeine has been demonstrated to inhibit repair mechanisms [4,5], and to interfere with both meiotic [6] and UV-induced mitotic [7] recombination. Furthermore, caffeine is known to be an inhibitor of cAMP phosphodiesterase in different eukaryotic cell types [8].

Most of the reports which use unicellular eukaryotes to unravel the effects of caffeine are based on the isolation of strains which display enhanced resistance to cytotoxic levels of the drug, either by a chromosomal mutation [9,10] or by over-expression from a

multicopy plasmid [11]. In order to become tolerant to a toxic drug, over-expression or modification of a target molecule would allow cells to withstand a higher concentration. Also, amplification of repair or scavenger activities could improve survival. Finally, cells with altered import (reduced) or export (increased) of the drug would display higher tolerance to caffeine.

In *S. pombe*, the Sipiczki laboratory isolated a number of caffeine-resistant mutants which defined single loci. Thus, the *caf1-21*, *caf2-3*, *caf3-89*, *caf4-83* and *caf5* mutants displayed pleiotropic, albeit slightly different, phenotypes to the cells: caffeine resistance, increased sensitivity to UV-irradiation, a reduction in fertility, lengthening of the cell cycle and some morphological aberrations [10]. These common features suggested that all the *caf* genes had related functions and define a single caffeine-responsive "tolerance" pathway. Indeed, all five mutations have finally been reported to be connected to the Pap1 pathway. Pap1 is an AP1-like transcription factor with cytosolic localization prior to stress; moderate doses of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) trigger oxidation of Pap1 and its fast accumulation in the nucleus, with the concomitant activation of an adaptive antioxidant response [12,13]. Further studies enabled the identification of the genes which were altered in the *caf* mutants [11,14]. Thus,

*caf2-3* carries a loss-of-function mutation at *crm1*; Crm1 is the nuclear exporter of Pap1, and the defective *caf2-3* allele leads to constitutive nuclear localization of Pap1 [9,14]. Hba1 is a cofactor of the Crm1-mediated export of Pap1, and the *caf1-21* mutation contains an early stop codon in the open-reading frame [15]. *caf3-89* has a gain-of-function of the *pap1* gene: the encoded Pap1 protein has constitutive nuclear localization [11]. *caf4-83* carries a loss of function mutation at *trr1*; the lack of the thioredoxin reductase Trr1 leads to the constitutive oxidation and therefore nuclear localization of Pap1 [13]. Lastly, over-expression of the *caf5* locus mutation has been described to enhance the protein levels of an ABC transporter, Caf5 [11]; the expression of this transporter is dependent on Pap1 [16].

Using microbes as model systems, several groups have isolated genes related to oxidative stress pathways in the search for mutants with increased resistance to unrelated drugs (multidrug resistant phenotype). This could be due to a natural induction of the stress pathway by the drugs, since they could trigger reactive oxygen species production. Alternatively, many oxidative stress regulons include ATP-binding cassette (ABC)-family transporters among the genes induced upon stress, which may act as efflux pumps to extrude the drugs from the intracellular compartment. In *S. pombe*, there are two alternative oxidative stress pathways; the Pap1-dependent one responds to moderate concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the MAP kinase Sty1 pathway becomes activated not only upon toxic doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but also in response to heat shock, osmotic stress and other situations which compromise cell viability (for a review, see [17]). Only over-expression of the Pap1, but not Sty1, pathway has arisen as beneficial in overcoming high doses of caffeine [9,10].

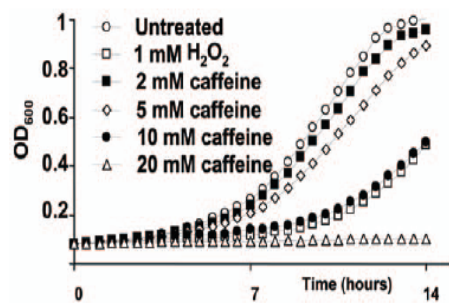
We decided to initiate an alternative approach to gain insights into the molecular targets of caffeine, and to study in depth its relationship with oxidative stress pathways. We searched for mutants from *S. pombe* with inhibited growth on caffeine-containing agar plates, using a deletion collection of about 2,700 haploid mutant cells, of which 98 were sensitive to the drug. The genes mutated in these sensitive clones were involved in a number of cellular roles including the stress, the integrity and the calcineurin pathways. Also, genes involved in the establishment of cell morphology, chromatin remodeling and protein traffic were identified as essential to maintain a wild-type tolerance to caffeine. We confirmed the sensitivity of most clones by sequential dilutions on solid plates, and investigated the role of the Pap1 and Sty1 stress pathways with regard to caffeine toxicity.

## Results

### Genome-wide screen of caffeine-sensitive mutants

Different concentrations of caffeine in liquid media can either partially or completely inhibit the growth of *S. pombe*, in a similar way as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> does (Figure 1) [18]. A comparable cytotoxic effect can be observed when caffeine is added to solid plates. In order to paint a global picture of the cellular mechanisms used by *S. pombe* to cope with toxic doses of caffeine, we carried out a genome-wide isolation of mutants displaying growth defects in the presence of 10 mM caffeine. We spread a collection of about 2,700 haploid mutants, and searched for cells with impaired growth on YE plates containing the drug. We obtained 98 putative isolates. The sensitivity to caffeine of 59 of those strains was confirmed by sequential spotting (see below).

With our screen, a number of mutants were isolated whose sensitivity to caffeine had already been established, but many other were new. We grouped the mutants by functional categories, and analyzed each one of them by sequential spots on solid plates



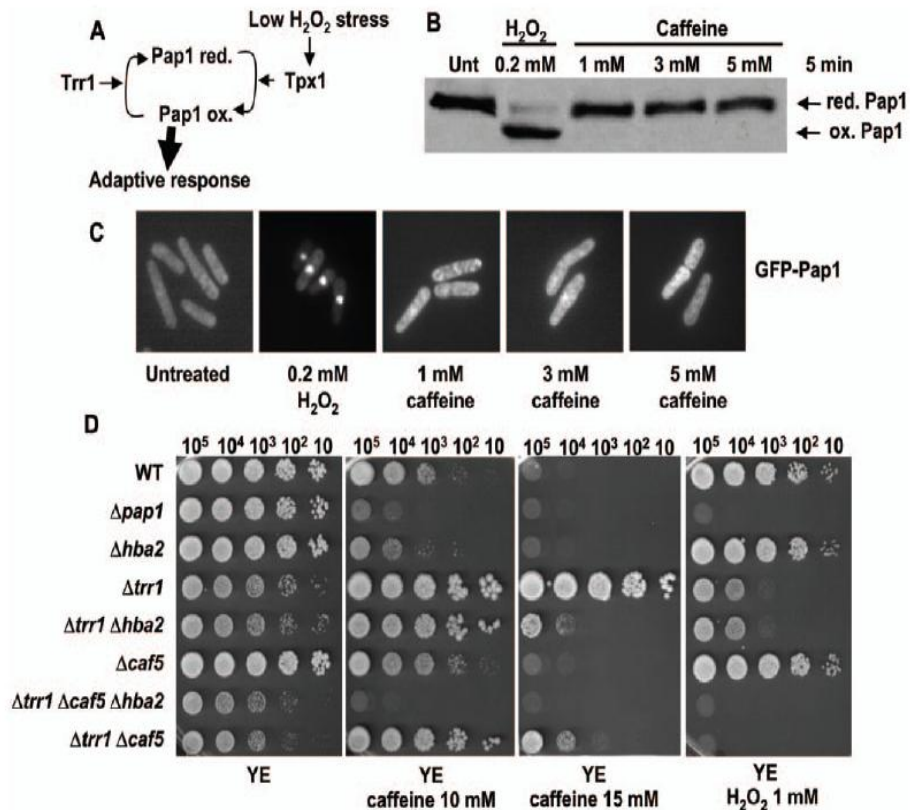
**Figure 1. Growth curves of wild-type *S. pombe* in the presence or absence of caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Log-phase cultures at an OD<sub>600</sub> of 0.1 of the wild-type strain 972 were treated or not with the indicated concentrations of caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and grown into microculture wells. Growth was monitored by measuring OD<sub>600</sub> every 10 min at 30° for 14 h. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g001

containing caffeine (see Materials and Methods). Since most mutations enhancing resistance to the drug had been described as leading to constitutive activation of the oxidative stress-dependent Pap1 pathway (see Introduction), we also plated our putative caffeine-sensitive strains in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing plates. Only those mutants confirmed to be sensitive to caffeine by sequential spotting are shown in Supplementary Table S1. We have also included in this table some *S. pombe* mutants that were not positive in the initial screen (either because the genome-wide plating was less sensitive than the sequential spots, or because those particular mutants were not present in the deletion collection), but were subsequently checked (and came up as positives) in the spot assays. Among the strains isolated in the initial screen, both *Δsty1* and *Δpap1* cells displayed a strong sensitive phenotype, and were used thereafter, together with a wild-type strain, as controls in all the spot assays we performed.

### Involvement of the Pap1 pathway in cellular tolerance to caffeine

Deletion of the gene coding for the Pap1 transcription factor rendered cells sensitive to caffeine (Figure 2D). Pap1, which becomes oxidized by moderate doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and thereafter accumulates at the nucleus to trigger an anti-oxidant gene response (Figure 2A) [13], did not become oxidized (Figure 2B) nor did it accumulate at the nucleus (Figure 2C) by any dose of caffeine we tested. Thus, the *pap1* gene is essential for normal tolerance to caffeine, and other proteins related to the pathway, such as the Pap1-regulated Srx1 and Trx1, are essential as well (Supplementary Figure S1). Conversely, activation of the pathway, e.g. by deletion of the thioredoxin reductase Trr1, enhances the resistance to caffeine (Figure 2D), as described earlier [14].

Since AP1-like transcription factors have been described to promote caffeine resistance by up-regulating efflux pumps [19], we analyzed whether lack of the ABC-transporter Hba2/Bfi1 and/or Caf5, whose genes are under the control of the transcription factor Pap1 [20], would abolish the caffeine-resistant phenotype of *Δtrr1* cells. Indeed, *Δtrr1* cells lacking both *hba2* and *caf5* genes were very sensitive to caffeine (Figure 2D). In fact, cells lacking Hba2 were almost as sensitive to caffeine as *Δpap1* cells (Figure 2D), indicating that Hba2 is the major caffeine exporter in *S. pombe*. It has been reported, and we have confirmed it by Northern blot analysis (data not shown), that *hba2* basal transcription is 3-fold lower in *Δpap1* than in wild-type cells [20], which explains the sensitivity to caffeine of cells lacking Pap1.



**Figure 2. Pap1 is not activated by caffeine, but is required for normal tolerance to caffeine.** (A) Scheme of the physiological activation of the transcription factor Pap1 by extracellular peroxides. The role of Tpx1 and Trr1 in activation and inactivation, respectively, of Pap1 are indicated. (B) Pap1 is not oxidized by caffeine *in vivo*. Wild-type strain 972 was grown in minimal media and treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or caffeine at the indicated concentrations, during 5 minutes. The redox state of Pap1 was analyzed by Western blot after non-reducing electrophoresis. Reduced/inactive (red.Pap1) and oxidized/active (ox.Pap1) Pap1 forms are indicated with arrows. (C) Pap1 is not accumulated in the nucleus upon caffeine treatment. The cellular distribution of GFP-Pap1 was determined by fluorescence microscopy in strain EHH14, treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or caffeine at the indicated concentrations, during 5 minutes. (D) Survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure in YE media plates of strains deleted on components of the Pap1 pathway. Strains 972 (WT), AV25 ( $\Delta pap1$ ), NG28 ( $\Delta hba2$ ), NG24 ( $\Delta trr1$ ), NG42 ( $\Delta trr1 \Delta hba2$ ), NG29 ( $\Delta caf5$ ), NG37 ( $\Delta trr1 \Delta caf5 \Delta hba2$ ), and NG39 ( $\Delta trr1 \Delta caf5$ ) were grown in liquid YE media, and the indicated number of cells were spotted onto plates with or without caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the indicated concentrations. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g002

#### Activation of the MAP kinase Sty1 stress pathway by caffeine

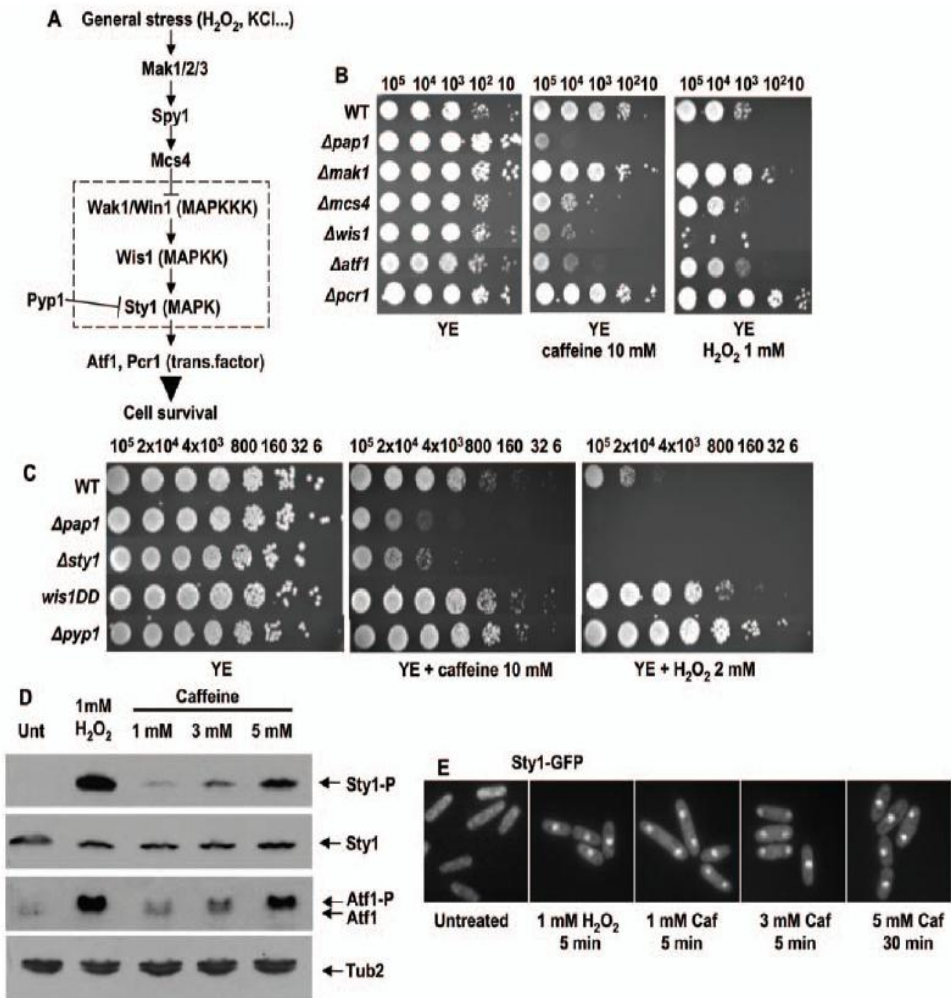
Components of the general stress pathway, centered on the MAP kinase Sty1 (Figure 3A), were sensitive to caffeine and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3B). Ptr1, a b-ZIP transcription factor known to heterodimerize with Atf1 to induce the Sty1-dependent gene response, is dispensable for the cellular response to caffeine (Figure 3B), as described above for other stresses [21]. It is worth pointing out that the screens performed by others to isolate genes whose mutations increased resistance to multidrugs had never brought up components of the Sty1 pathway. Consistently, we tested that constitutive activation of the pathway, either by expression of a constitutively activated MAP kinase Wis1DD or by deletion of the MAP kinase phosphatase Pyp1, enhanced resistance to toxic doses of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but did not increase or just slightly improved the tolerance to caffeine (Figure 3C).

The Sty1 pathway is activated in response to a whole variety of stress signals (for a review, see [17]). We determined that caffeine

also induced phosphorylation of the Sty1 MAP kinase (Figure 3D), which triggered a rapid translocation of Sty1-GFP from the cytosol to the nucleus (Figure 3E) and the phosphorylation and accumulation of its main substrate, the transcription factor Atf1 (Figure 3D). Therefore, caffeine activates the main global anti-stress response pathway known to be required for survival upon compromised environmental situations.

Once established that both stress pathways, Pap1 and Sty1, are essential to maintain normal sensitivity to caffeine, we centered our attention on three genes isolated in our screen which regulate protein levels, and which may therefore exert their effects through regulation of Pap1, Sty1 or its main transcription factor, Atf1: *moe1* (may regulate translation or protein stability) [22,23], *csn1* (involved in the signalosome) [24] and *pag3* (F-box protein, may specifically regulate protein levels) [25]. As shown in figure 4A, only deletion of *moe1* confers sensitivity to both caffeine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Concomitantly, only cells lacking Moel1 have altered levels of Atf1,





**Figure 3. Sty1 is activated by caffeine, and is required for normal tolerance to caffeine.** (A) Scheme of the activation of the MAP kinase Sty1 by extracellular stressors. Other upstream and downstream components of the pathway are indicated. (B, C) Survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of strains harboring mutations in components of the Sty1 pathway. We analyzed by sequential spotting (as described in Figure 2D) the survival of strains 972 (WT), AV25 (*Δpap1*), AV15 (*Δatf1*), KS2088 (*wis1DD*), and the deletion collection strains *Δmak1*, *Δmcs4*, *Δwis1*, *Δpcr1*, and *Δpyp1*. (D) Sty1 is phosphorylated and Atf1 is activated in response to caffeine. The levels of Sty1 phosphorylation (Sty1-P) in the wild-type strain 972 grown in minimal medium, which had been treated or not with caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, were determined by Western blot analysis using anti-phosphorylated p38 antibody. The same blots were hybridized with polyclonal anti-Atf1. The slower-migrating phosphorylated (Atf1-P) and the non-phosphorylated (Atf1) forms are indicated with arrows. Polyclonal antibodies against Sty1 and tubulin (Tub2) were used as loading controls. (E) Sty1-GFP is accumulated in the nucleus upon caffeine treatment. The cellular distribution of Sty1-GFP in the strain EHH5 grown in minimal medium, and treated or not with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or caffeine (Caf) for the times indicated was determined by fluorescence microscopy. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g003

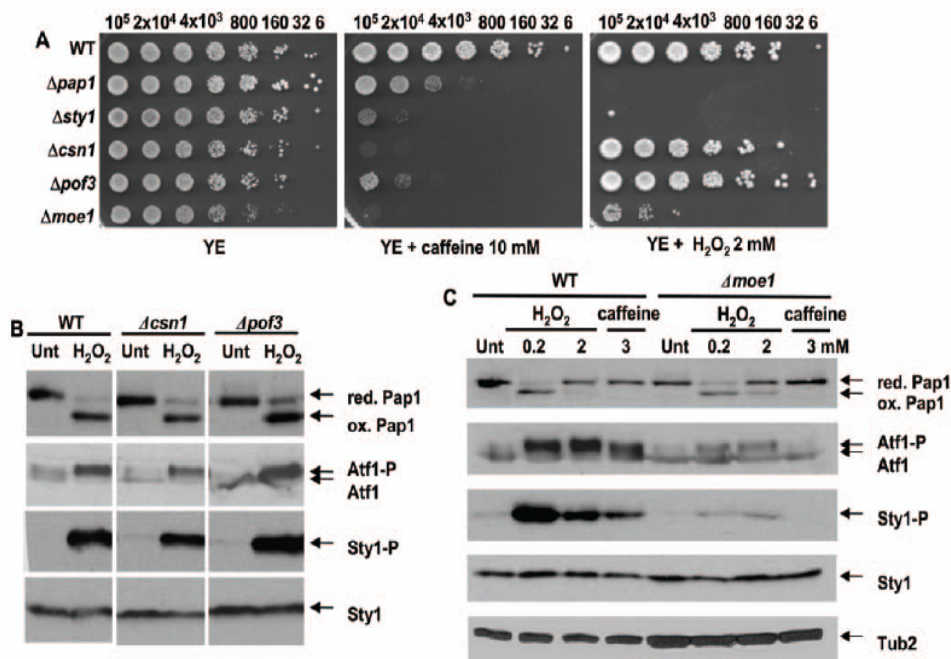
and display a deficient activation of Sty1 (Figure 4B and 4C). The participation of the Moel1-interacting partner Int6 in wild-type tolerance to caffeine and its relationship with Atf1 protein levels has been recently assessed [26,27]. Further work will be required to determine the role of Moel1 in Sty1 phosphorylation.

#### Other cellular processes

In our screen we isolated other mutations in genes coding for activities related to processes previously connected to caffeine, and that validates the results obtained. Thus, we found that several

strains carrying deletions in genes coding for proteins of the cell integrity pathway whose central component is the MAP kinase Pmk1 (Figure 5A) were sensitive to caffeine, as described earlier [28,29], but not to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 5B). Similarly, strains carrying deletions in genes involved in cell polarity, cell wall biosynthesis or cytokinesis, which are related to the cell integrity pathway, are also over-represented (Supplementary Figure S2).

A role for caffeine in the regulation of *S. cerevisiae* calcium homeostasis has been described earlier [30]. Mutations in components of the calcineurin pathway also led to caffeine



**Figure 4. Regulators of protein stability are required for normal tolerance to caffeine.** (A) Survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of strains harboring mutations in genes coding for regulators of protein homeostasis. We analyzed by sequential spotting as described in Fig. 2D the survival of strains 666 (WT), and the deletion collection strains  $\Delta pap1$ ,  $\Delta sty1$ ,  $\Delta csn1$ ,  $\Delta pof3$  and  $\Delta moe1$ . (B) Csn1 and Pof3 do not regulate the Pap1 or Sty1 pathways. Wild-type strain 666 (WT) and the deletion collection strains  $\Delta csn1$  and  $\Delta pof3$  were grown in minimal media. TCA extracts were prepared from treated (5 min 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or untreated (Unt) cultures, and the redox state of Pap1, and phosphorylation levels of Sty1 and Atf1 were determined as described in Fig. 2B and Fig. 3D. (C) Moe1 regulates Atf1 protein levels and Sty1 phosphorylation. Strains 666 (WT) and  $\Delta moe1$  were grown in minimal media, and were treated or not (Unt) for 5 min with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or caffeine at the indicated concentrations. TCA extracts and immunoblot assay was performed as described in B. Sty1 total protein (Sty1) and tubulin (Tub2) were used as loading controls. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g004

sensitivity in our screen (Figure 5C) suggesting that caffeine also inhibits extracellular Ca<sup>2+</sup> uptake in fission yeast.

Other cell functions linked to caffeine toxicity have been impaired recombination and DNA damaging [31]. In agreement with those studies, several deletions in genes coding for activities related to recombination and/or repair have been isolated in the screen, such as *rad3*, *ssb3*, *rad54* and *rad51* (Figure 6A). Similarly, intracellular protein traffic is one of the major functional categories, with many gene deletions conferring lower tolerance to caffeine (vacuole protein sorting, Golgi or ER function, etc.) (Supplementary Figure S3). Probably this traffic is required to eliminate the caffeine. On the other hand, a pathway traditionally linked to caffeine tolerance is the protein kinase A. However, the sensitivity to caffeine of *S. pombe* cells lacking Pka1 was only slightly higher, if any, of that of a wild-type strain (Supplementary Figure S4). Furthermore, strains bearing mutations in other components of the pathway did not display any growth inhibition by caffeine (Supplementary Figure S4).

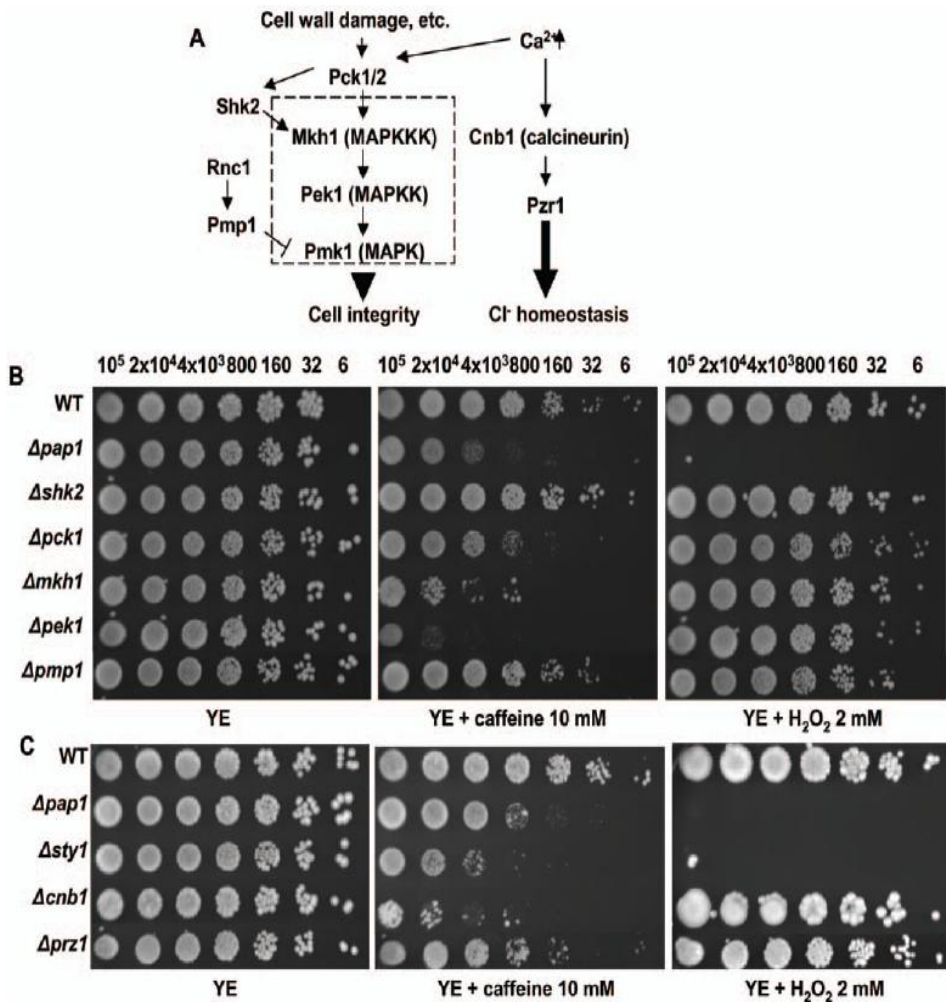
Other genes isolated in the screen and that therefore have functions related to the cell response to caffeine might be indirectly affecting pathways required to counteract the effects of caffeine or required to facilitate its degradation. Thus, general regulators of mRNA abundance, such as the chromatin remodeler *SPAC25A8.01c*, members of the Ccr4 complex, or the histone acetyl transferase Sin3 are present in this global list (Figure 6B). Several genes related to

general metabolic pathways also altered the tolerance to caffeine (Supplementary Figure S5), as well as genes known to regulate the meiotic or mitotic cell cycles (Supplementary Figure S6).

## Discussion

Caffeine, which elicits well-documented cytotoxic effects to eukaryotic cells, has been proposed to target and inactivate many cellular activities (Fig. 7). Several genetic approaches had been undertaken to identify those targets, frequently based on the isolation of caffeine-resistant microbial cells, and very often constitutive activation of oxidative stress pathways had been connected to caffeine tolerance. With our caffeine-sensitive, genome-wide screen of an *S. pombe* deletion collection, we have demonstrated the importance of some oxidative stress pathway components on wild-type tolerance to the drug. Furthermore, we have demonstrated with a parallel screen on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing plates that some, but not all, of the caffeine-sensitive mutants also display defects in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Thus, cells lacking components of the Pap1 and Sty1 pathways, the intracellular protein transport system, cell polarity machinery, DNA recombination/repair systems, and chromatin remodelling regulators are both sensitive to caffeine and to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Supplementary Table S1).

We do not, however, believe that any of the toxic effects of caffeine is mediated through direct generation of reactive oxygen species,

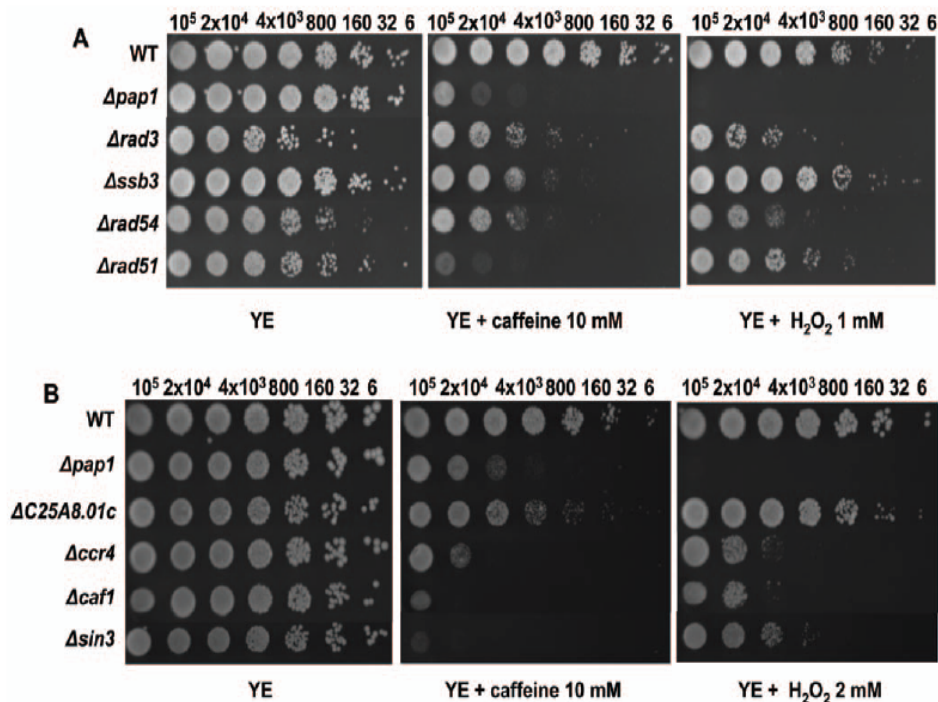


**Figure 5. The cell integrity and the calcineurin pathways are required for normal tolerance to caffeine.** (A) Scheme of the activation of the MAP kinase Pmk1 by cell wall damage. Other upstream and downstream components of the pathway are indicated. The calcineurin components are also indicated. (B, C) Survival to caffeine or  $H_2O_2$  exposure at the indicated concentrations of strains harboring mutations in genes coding for components of the Pmk1 (B) or Cnb1 (C) pathways. Survival of the deletion collection strains 666 (WT),  $\Delta pap1$ ,  $\Delta shk2$ ,  $\Delta pck1$ ,  $\Delta mkh1$ ,  $\Delta pek1$ ,  $\Delta pmp1$ ,  $\Delta sty1$ ,  $\Delta cnb1$  and  $\Delta prz1$  was analyzed by sequential spotting, as described in Fig. 2D. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g005

since the sensitive Pap1 pathway is not induced at any concentration of the drug (we have tested caffeine concentrations ranging from 0.05 to 30 mM, and none of them activate Pap1; data not shown). The global stress response pathway, centered on the MAP kinase Sty1, does become activated by caffeine. However, this pathway is not only triggered by  $H_2O_2$ , but also by any type of environmental stress which compromises cell viability, and caffeine does so. Up-regulation of the Sty1 pathway had never been isolated as a genetic component of resistance to caffeine, and that is consistent with our results: inactivation of the pathway by the deletion of some components increases sensitivity to the drug, but hyper-activation of the pathway through the lack of the Sty1 phosphatase Pyp1, or through expression of a constitutively active Wis1 kinase, does not significantly enhance the tolerance to caffeine.

In contrast, lack of Pap1 triggers sensitivity and up-regulation of Pap1 induces resistance to caffeine. We show here that such an effect is mainly due to a downstream target of Pap1, the gene coding for the efflux pump Hba2. The development of multidrug resistance in microorganisms may be due to a number of mechanisms. The most documented one is enhanced extrusion of drugs mediated by efflux pump proteins belonging to either the ABC (ATP-binding cassette) or MFS (major facilitator) superfamilies; these efflux pumps are able to extrude structurally diverse compounds. The abundance of the drug transporters and their wider specificity suggest that they may not be exclusively drug exporters in microbes and may have other cellular functions. In some cases, their expression levels are regulated by environmental signals; that is the case of the oxidative-stress dependent *acrAB*





**Figure 6. Several regulators of chromatin remodeling (A) and DNA repair/recombination pathways (B) are required for normal tolerance to caffeine.** We analyzed by sequential spotting as described in Fig. 2D the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Arad3*, *Aassb3*, *Arad54*, *Arad51*, *AC25A8.01c*, *Accr4*, *Acaf1* and *Asin3*. doi:10.1371/journal.pone.0006619.g006

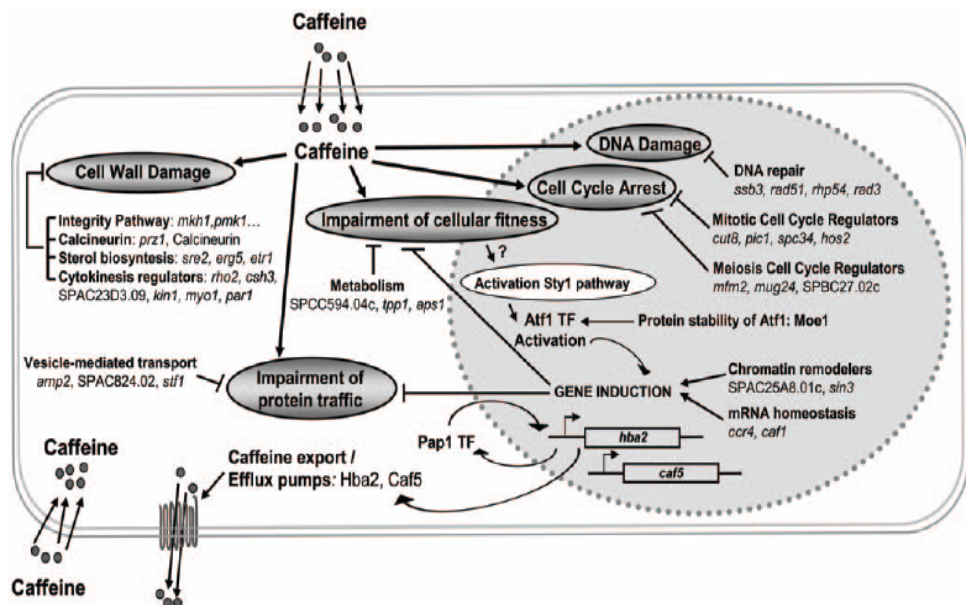
locus of *Escherichia coli* [32], the *mexGHJ-ompD* four-gene operon of *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a multidrug efflux pump system involved in quorum-sensing signal homeostasis and which may be activated by superoxide [33], or the export pumps for glutathione S-conjugates, which have been cloned from mammals, yeast, plants, and nematodes (for a review, see [34]). In the case of the Pap1 regulon, up-regulation of the pathway increases the expression of both Hba2 and Caf5 [20], and these efflux pumps induce a multidrug resistant phenotype. Our data indicate that Hba2 is the major efflux pump for caffeine, since deletion of its gene causes sensitivity to the drug (Figure 2D). However, Caf5 is also able to partially extrude caffeine, since the triple *Atr1 Ahba2 Acaf5* strain displays stronger sensitivity to the drug than *Atr1 Ahba2* cells (Figure 2D). It is worth noting that over-expression of the Pap1 homolog YAP1 of *S. cerevisiae* also confers resistance to several drugs [35], and that such a phenotype is dependent on the presence of two efflux pumps, FLR1 and YCF1, whose expression is under the control of YAP1 [36]. However, deletion of the *YAP1* gene does not result in sensitivity to cycloheximide [37] or diazaborine [36], indicating that either YAP1 in *S. cerevisiae* is not such a strong determinant of multidrug resistance as Pap1 is in *S. pombe*, or that the basal levels of *FLR1/YCF1* transcripts are unchanged in *ΔYAP1* cells (*hba2* basal transcription is 3-fold lower in *Δpap1* cells than in wild-type cells) [20].

The demonstration of linkage between a gene deletion and a phenotype is only a first step that might unveil details of a whole cellular response to an environmental stress. With our screen, we have further explored additional cellular pathways involved in

caffeine resistance and we have identified genes belonging to pathways participating in *S. cerevisiae* survival to caffeine (Fig. 7). These genes validate our screen and corroborate the biological significance of conserved processes between the two distant yeasts. Thus, it was not surprising to isolate genes coding for the cell integrity MAP kinase pathway (Figure 5A & B) as well as cell morphology genes related to that pathway (Supplementary Figure S2). For several microorganisms, caffeine is currently used as a phenotypic criterion to evaluate the function of cell wall integrity pathways [38]. Similarly, it has been described that *S. cerevisiae* uptake of the extracellular Ca<sup>2+</sup> is inhibited by caffeine [30], and, according to our results, that is probably the case in fission yeast (Figure 5C).

It was also predictable to find intracellular protein traffic as one of the major functional categories, with many caffeine-sensitive gene deletions (Supplementary Figure S3). Caffeine acts as a competitive inhibitor for adenosine and its presence likely causes an artificial metabolic stress to the cells. Probably traffic to the vacuole is required to eliminate the caffeine in *S. pombe* as in *S. cerevisiae* [39]. Additionally, some metabolic pathways might be required to counteract the caffeine competitive inhibition effect.

Caffeine was the first drug reported to override checkpoints and several reports described caffeine inhibition of Rad3 [31], and Rad-related kinases ATM or ATR in mammalian cells [40–42]. Importantly enough, three genes known to be involved in replication, recombination and/or repair (*rad3*, *rad51* and *rhp54*) were isolated as essential for normal tolerance to both caffeine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 6A), highlighting the importance of DNA homeostasis in the response to both insults.



**Figure 7. Proposed model for the cellular targets and defense response mechanisms to caffeine in fission yeast.** The main detoxification mechanism for caffeine is extrusion by efflux pumps Hba2 and Caf5, which basal expression levels are dependent on the transcription factor (TF) Pap1. Pap1 is not activated by caffeine, but it shuttles under basal conditions between the nucleus (in pale grey, dotted line) and the cytosol, and regulates the basal expression of about 50 genes [20]. Caffeine interferes with cellular activities and induces a number of toxic effects (in grey ovals): cell wall damage, protein traffic and general fitness impairment, cell cycle arrest and DNA damage. Most of the genes we have isolated in our screen code for proteins which can combat each one of those deleterious effects of caffeine, and have been grouped accordingly. The Sty1 pathway is activated in response to caffeine through an unknown mechanism. Activated Sty1 is then essential to activate changes in gene expression through the transcription factor Atf1, and these changes may modulate the cellular adaptation to caffeine. Chromatin remodelers and regulation of mRNA homeostasis may help regulate gene induction in response to caffeine as well. Lastly, proteins such as Moe1 may be essential to wild-type tolerance to caffeine due to its role in the regulation of Atf1 protein basal levels.  
doi:10.1371/journal.pone.000619.g007

A surprising result from our screen concerns the cAMP-signalling pathway traditionally involved in caffeine tolerance, with cAMP phosphodiesterase being perhaps the best known protein target inactivated by the drug [8]. However, we have not detected a significant alteration of tolerance to caffeine in any of the mutants of this pathway that we have tested (Supplementary Figure S4). Similarly, the TORC1 kinase has recently been described as the growth-limiting target of caffeine [43,44], but the homologous Tor2 kinase is essential and therefore its deletion mutant was not present in the collection, and other components of the pathway were not isolated in our screen. These results suggest, but do not demonstrate, that *S. pombe* cAMP phosphodiesterase is not an essential caffeine target while other signalling pathways important to *S. pombe* survival are affected by this drug.

## Materials and Methods

### Yeast strains and growth conditions

We used the strains 972 (*h<sup>-</sup>*), JA364 (*h<sup>+</sup> ura4-D18*), JA365 (*h<sup>-</sup> ura4-D18*), AV18 (*h<sup>-</sup> sty1::kanMX6*) [45], AV25 (*h<sup>-</sup> pap1::kanMX6*) [45], EHH14 (*h<sup>+</sup> his2 ura4-D18 pap1::ura4-D18 leu1-32 nmt::GFP-pap1::leu1<sup>+</sup>*) [46], KS2088 (*h<sup>-</sup> ura4-D18 wis1DD::12myc:ura4<sup>+</sup> leu1-32 sty1::HAGH:ura4<sup>+</sup>*) [47], AV15 (*h<sup>-</sup> atf1::kanMX6*) [45], EA38 (*h<sup>-</sup> leu1-32 srx1::kanMX6*) [48] and EHH5 (*h<sup>-</sup> leu1-32 sty1::GFP::kanMX6*) [45]. To construct *S. pombe* strains with specific loci deleted, we transformed wild-type strains (either 972 or JA364) with linear fragments containing open reading frame (ORF):

*kanMX6* or ORF:*natMX6*, obtained by PCR amplification using ORF-specific primers and plasmids pFA6a-*kanMX6* [49] or pFA6a-*natMX6* [50] as templates, and we obtained strains NG28 (*h<sup>+</sup> hba2::natMX6*), NG29 (*h<sup>-</sup> caf5::kanMX6*), MJ2 (*h<sup>-</sup> trx1::kanMX6 ura4-D18 leu1-32*), NG35 (*h<sup>+</sup> hba2::natMX6 ura4-D18*), NG34 (*h<sup>-</sup> hba2::natMX6 caf5::kanMX6 ura4-D18*) and NG41 (*h<sup>-</sup> caf5::kanMX6 ura4-D18*). NG24 (*h<sup>-</sup> caf4<sup>+</sup>::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 ade6-704 leu1-32*) [14] with JA365 (*h<sup>-</sup> ura4-D18*). To obtain NG42 (*h<sup>-</sup> hba2::natMX6 caf4::ura4<sup>+</sup> ura4-D18*), we crossed NG35 with NG24. NG37 (*h<sup>+</sup> hba2::natMX6 caf5::kanMX6 caf4<sup>+</sup>::ura4<sup>+</sup> ura4-D18*) was isolated after crossing the double mutant NG34 with NG24. We isolated NG25 (*h<sup>+</sup> caf4<sup>+</sup>::ura4<sup>+</sup> ura4-D18*) after crossing NG24 with JA364. To obtain NG39 (*h<sup>+</sup> caf5::kanMX6 caf4::ura4<sup>+</sup> ura4-D18*) we crossed NG41 with NG25. Cells were grown in standard media [minimal media or rich media (YE)] [51], with or without caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at the indicated concentrations.

### Growth curves

To measure cellular growth we used an assay based on automatic measurements of optical densities (OD) of small (100  $\mu$ l) liquid cell cultures, which allowed us to plot comparable growth curves for each treatment. Basically, we grew cells in YE media to an OD<sub>600</sub> of 0.3 at 30°C under continuous shaking in Erlenmeyer flasks. Then, we diluted the cultures in YE media to an OD<sub>600</sub> of 0.025 and cells continued growing in the same conditions till they reached an

OD<sub>600</sub> of 0.1. We treated the cultures with different agents (2, 5, 10 and 20 mM caffeine and 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Then, we placed 100- $\mu$ l samples into 96-well non-coated polystyrene microplates (in triplicate) with an adhesive plate seal. We used Power Wave microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek) to obtain the growth curves. The OD<sub>600</sub> was automatically recorded using Gen5 software. The software was set as follows: OD was measured at 600 nm, incubation temperature was kept at 30°C, the microplates were subjected to continuous shaking and the readings were done every 10 min during a 14 h period.

#### High-throughput sensitivity screen

Genome-wide *S. pombe* haploid deletion collection covers more than 2,700 genes. *S. pombe* diploid deletion mutants were systematically constructed with targeted mutagenesis at each ORF, and haploid deletion strains for non-essential genes were isolated. The wild-type strains of the collection are 666 (*h<sup>+</sup> ade6-M210 ura4-D18 leu1-32*) and 668 (*h<sup>+</sup> ade6-M216 ura4-D18 leu1-32*). More information is provided at the Bioneer web page (<http://pombe.bioneer.co.kr/introduction/ResearchPurpose.jsp>). The haploid deletion collection was screened as described elsewhere [52]. Basically, the collection was first grown in liquid YE media, and then spread with a manual replicator on three types of solid agar plates: YE media, YE media with 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and YE media with 10 mM caffeine. The plates were incubated at 30°C for 3–4 days.

#### Caffeine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity assay by sequential spots

In order to carefully analyze sensitivity to caffeine on plates, *S. pombe* strains were grown in liquid YE media to an OD<sub>600</sub> of 0.5. Cells were then diluted in YE, and the indicated number of cells in 2  $\mu$ l was spotted onto YE media agar plates, containing or not the indicated concentrations of caffeine (10 or 15 mM) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 or 2 mM). Plates were incubated at 30°C for 3–4 days.

#### Preparation of *S. pombe* TCA extracts and immunoblot analysis

To analyze the *in vivo* redox state of Pap1, trichloroacetic acid (TCA) extracts were prepared as described elsewhere [48]. Immunoblotting was performed as described [45]. Pap1 was immunodetected using polyclonal anti-Pap1 antibody [13]. A different protocol to obtained TCA extracts (without alkylation nor phosphatase treatment) was followed to detect Atf1, and has been described elsewhere [21]. Same extracts were prepared to detect phosphorylated and non-phosphorylated Sty1. Immunoblotting was performed using a commercial anti-p38 MAP kinase antibody (Cell Signalling), or polyclonal anti-Sty1 antibodies raised against bacterial glutathione-S-transferase (GST)-Sty1 following standard rabbit immunization procedures. As a loading control, monoclonal anti-tubulin antibody (Tub2, Sigma) was used.

#### Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy and image capture was performed as described before [13].

#### Supporting Information

##### Table S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s001 (0.16 MB PDF)

#### References

- Sutton A, Immanuel D, Arndt KT (1991) The SPT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol Cell Biol* 11: 2133–2148.

**Figure S1** Several proteins related to the Pap1 pathway are required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of MJ2 (*Atrx1*, coding for the cytosolic thioredoxin), EA38 (*Astr1*, coding for the Tpx1 reductase Srx1); and the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Asty1* and *Atrx2* (coding for the mitochondrial thioredoxin).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s002 (3.53 MB TIF)

**Figure S2** Several regulators of cell polarity or cell wall biosynthesis are required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Asty1*, *Amyo1*, *AC306.06c*, *Apar1*, *AC23D3.09*, *Akin1*, *Arho2*, and *Ash3*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s003 (6.71 MB TIF)

**Figure S3** Several components of intracellular protein sorting are required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Asty1*, *Atps32*, *AC4B3.02C*, *Adid4*, *AC613.01*, *Aryh1*, *Aerd2*, *Asec28*, and *Astf1*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s004 (6.59 MB TIF)

**Figure S4** The protein kinase A pathway is not required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Asty1*, *Ags2*, *Agt3*, *Apha1*, *Afbp1*, *Aags1*, *Asck2* and *Arsu1*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s005 (3.77 MB TIF)

**Figure S5** Several genes coding for enzymes related to metabolic pathways (A) and for mitochondrial components (B) are required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Atpp1*, *AC1778.03c*, *AC594.04c*, *Asty1*, *AC2G2.13c*, *Asib1*, *Asib2*, *Aaps1*, *Aeng5*, *Acoq2*, *Aetr1*, *AC20G8* and *Acoq10*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s006 (6.58 MB TIF)

**Figure S6** Several regulators of the mitotic or meiotic cell cycles are required for normal tolerance to caffeine. We analyzed by sequential spotting (as described in Fig. 2D) the survival to caffeine or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure at the indicated concentrations of the deletion collection strains 666 (WT), *Apap1*, *Asty1*, *Amfm2*, *Acut8*, *Astpc34*, *Apic1*, *Ahos2*, *AC27.02c* and *Amug24*.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006619.s007 (4.31 MB TIF)

#### Acknowledgments

We thank members of the laboratory for helpful discussions. We thank Zig Benko for providing strain *caf<sup>+</sup>::ura<sup>+</sup>* (*Atr1*) and Paul Russell and Miguel Rodriguez-Gabriel for strain K52088 (*uts1DD*).

#### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JA EH. Performed the experiments: IAC NG IIB SGS. Analyzed the data: IAC NG IIB SGS PP JA EH. Contributed reagents/materials/analysis tools: KLH DUK MS AZ. Wrote the paper: EH.

- cdc10 mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 22: 5279-5288.
3. Costigan C, Gehrung S, Snyder M (1992) A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol* 12: 1162-1178.
  4. Gentner NE, Werner MM (1975) Repair in *Schizosaccharomyces pombe* as measured by recovery from caffeine enhancement of radiation-induced lethality. *Mol Gen Genet* 142: 171-183.
  5. Osman F, McCready S (1998) Differential effects of caffeine on DNA damage and replication cell cycle checkpoints in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 260: 319-334.
  6. Loprieno N, Barale R, Baroncelli S (1974) Genetic effects of caffeine. *Mutat Res* 26: 83-87.
  7. Fabre F (1972) Relation between repair mechanisms and induced mitotic recombination after UV irradiation, in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Effects of caffeine. *Mol Gen Genet* 117: 153-166.
  8. Butcher RW, Sutherland EW (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* 237: 1244-1250.
  9. Kumada K, Yanagida M, Toda T (1996) Caffeine-resistance in fission yeast is caused by mutations in a single essential gene, *crml+*. *Mol Gen Genet* 250: 59-68.
  10. Benko Z, Miklos I, Carr AM, Szpiczi M (1997) Caffeine-resistance in *S. pombe*: mutations in three novel *caf* genes increase caffeine tolerance and affect radiation sensitivity, fertility, and cell cycle. *Curr Genet* 31: 481-487.
  11. Benko Z, Fenyvesyolgyi C, Pesti M, Szpiczi M (2004) The transcription factor *Pap1/Caf3* plays a central role in the determination of caffeine resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 271: 161-170.
  12. Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JB, Jones N, et al. (2002) Distinct Regulatory Proteins Control the Graded Transcriptional Response to Increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels in Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13: 805-816.
  13. Vivancos AP, Castillo EA, Jones N, Ayte J, Hidalgo E (2004) Activation of the redox sensor *Pap1* by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration. *Mol Microbiol* 52: 1427-1435.
  14. Benko Z, Szpiczi M, Carr AM (1998) Cloning of *caf1+*, *caf2+* and *caf4+* from *Schizosaccharomyces pombe*: their involvement in multidrug resistance, UV and pH sensitivity. *Mol Gen Genet* 260: 434-443.
  15. Castillo EA, Vivancos AP, Jones N, Ayte J, Hidalgo E (2003) *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the Ran-binding protein *Hba1* show a multidrug resistance phenotype due to constitutive nuclear accumulation of *Pap1*. *J Biol Chem* 278: 40565-40572.
  16. Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, et al. (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor *Pap1* by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor *Crml* (Exportin) and the stress-activated MAP kinase *Sty1/Spel* [published erratum appears in *Genes Dev* 1998 Aug 15;12(16):2650] [see comments]. *Genes Dev* 12: 1453-1463.
  17. Vivancos AP, Jara M, Zuin A, Sanso M, Hidalgo E (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2) levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics* 276: 495-502.
  18. Benko Z, Szpiczi M (1993) Caffeine tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*: physiological adaptation and interaction with theophylline. *Can J Microbiol* 39: 551-554.
  19. Alarco AM, Raymond M (1999) The bZip transcription factor *Cap1p* is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 700-708.
  20. Chen D, Wilkinson CR, Watt S, Penkett CJ, Toone WM, et al. (2008) Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19: 308-317.
  21. Sanso M, Gogol M, Ayte J, Seidel C, Hidalgo E (2008) The transcription factors *Per1* and *Atf1* have distinct roles in stress- and *Sty1*-dependent gene regulation. *Eukaryot Cell*.
  22. Bandyopadhyay A, Lakshmanan V, Matsumoto T, Chang EC, Maitra U (2002) *Moc1* and *spln6*, the fission yeast homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits p66 (eIF3d) and p48 (eIF3c), respectively, are required for stable association of eIF3 subunits. *J Biol Chem* 277: 2360-2367.
  23. Yen HC, Gordon C, Chang EC (2003) *Schizosaccharomyces pombe* *Int6* and *Ras* homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell* 112: 207-217.
  24. Zhou C, Seibert V, Geyer R, Rhee E, Lyapina S, et al. (2001) The fission yeast COP9/signalosome is involved in cullin modification by ubiquitin-related Ned8p. *BMC Biochem* 2: 7.
  25. Katayama S, Kitamura K, Lehmann A, Nikaido O, Toda T (2002) Fission yeast *F-box* protein *PoB* is required for genome integrity and telomere function. *Mol Biol Cell* 13: 211-224.
  26. Bandyopadhyay A, Matsumoto T, Maitra U (2000) Fission yeast *Int6* is not essential for global translation initiation, but deletion of *int6(+)* causes hypersensitivity to caffeine and affects spore formation. *Mol Biol Cell* 11: 4005-4018.
  27. Udagawa T, Nemoto N, Wilkinson CR, Narashimhan J, Jiang L, et al. (2008) *Int6/eIF3c* promotes general translation and *Atf1* abundance to modulate *Sty1* MAPK-dependent stress response in fission yeast. *J Biol Chem* 283: 22063-22075.
  28. Loewith R, Hulberstey A, Young D (2000) *Skh1*, the MEK component of the *mkl1* signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113 ( Pt1): 153-160.
  29. Barba G, Soto T, Madrid M, Nunez A, Vicente J, et al. (2008) Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20: 748-757.
  30. Courchesne WE, Ozturk S (2003) Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 47: 223-234.
  31. Moser BA, Brondello JM, Baber-Furrari B, Russell P (2000) Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol Cell Biol* 20: 4288-4294.
  32. Miller PF, Sulavik MC (1996) Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multi-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21: 441-448.
  33. Palma M, Zurita J, Ferreras JA, Worgall S, Larone DH, et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* *SoxR* does not conform to the archetypal paradigm for *SoxR*-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun* 73: 2958-2966.
  34. Keppler D (1999) Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med* 27: 985-991.
  35. Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS (1994) Cadmium tolerance mediated by the yeast *AP-1* protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J Biol Chem* 269: 32592-32597.
  36. Jungwirth H, Wendler F, Platzer B, Bergler H, Hogenauer G (2000) Diazaboric resistance in yeast involves the efflux pumps *Ydr1p* and *Flr1p* and is enhanced by a gain-of-function allele of gene *YAP1*. *Eur J Biochem* 267: 4809-4816.
  37. Wu A, Wemmie JA, Edgington NP, Goebel M, Guevara JL, et al. (1993) Yeast *bZip* proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J Biol Chem* 268: 18850-18858.
  38. Jacoby JJ, Nilus SM, Heinisch JJ (1998) A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol Gen Genet* 258: 148-155.
  39. Kucharczyk R, Gronadka R, Migdalaki A, Slonimski PP, Rytka J (1999) Disruption of six novel yeast genes located on chromosome II reveals one gene essential for vegetative growth and two required for sporulation and conferring hypersensitivity to various chemicals. *Yeast* 15: 987-1000.
  40. Hall-Jackson CA, Cross DA, Morrice N, Smythe C (1999) *ATR* is a caffeine-sensitive, DNA-activated protein kinase with a substrate specificity distinct from DNA-PK. *Oncogene* 18: 6707-6713.
  41. Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, et al. (2000) Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem* 275: 10342-10348.
  42. Sarkaria JN, Busby EG, Tibbets RS, Roos P, Taya Y, et al. (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59: 4375-4382.
  43. Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palmarczyk G, Francois J (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* 61: 1147-1166.
  44. Reinke A, Chen JC, Aronova S, Powers T (2006) Caffeine targets TOR complex I and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of *Tor1p*. *J Biol Chem* 281: 31616-31626.
  45. Zuin A, Vivancos AP, Sanso M, Takatsune Y, Ayte J, et al. (2005) The glycolytic metabolic methylglyoxal activates *Pap1* and *Sty1* stress responses in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 280: 36708-36713.
  46. Castillo EA, Ayte J, Chiva C, Moldon A, Carrascal M, et al. (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor *Pap1* by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* 45: 243-254.
  47. Shiozaki K, Shiozaki M, Russell P (1998) Heat stress activates fission yeast *Spel/ Sty1* MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 9: 1339-1349.
  48. Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, et al. (2005) A cysteine-sulfenic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant *Pap1* pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8875-8880.
  49. Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A III, et al. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14: 943-951.
  50. Hentges P, Van Drissche B, Talloereau I, Vandenhoute J, Carr AM (2005) Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22: 1013-1019.
  51. Alfa C, Fantes P, Hyams J, McLeod M, Warbrick E (1993) Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
  52. Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, Garcia-Santamarina S, Hoc KL, et al. (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS ONE* 3: e2842.







2010. *Journal of Experimental Botany* 61, 1509-1521.

## Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphenic form of 2-Cys peroxiredoxin

Iván Iglesias-Baena<sup>1</sup>, Sergio Barranco-Medina<sup>1,\*</sup>, Alfonso Lázaro-Payo<sup>1</sup>, Francisco Javier López-Jaramillo<sup>2</sup>, Francisca Sevilla<sup>3</sup> and Juan-José Lázaro<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology of Plants, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Profesor Albareda 1, E-18008 Granada, Spain

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Campus Fuentenueva, Universidad de Granada, E-18071 Granada, Spain

<sup>3</sup> Department of Stress Biology and Plant Pathology, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-30080 Murcia, Spain

\* Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University in Saint Louis, School of Medicine, 660 S Euclid Ave, St Louis, MO 63110, USA.

† To whom correspondence should be addressed: E-mail: jllazaro@eez.csic.es

Received 22 December 2009; Revised 19 January 2010; Accepted 19 January 2010

### Abstract

The antioxidant function of 2-Cys peroxiredoxin (Prx) involves the oxidation of its conserved peroxidatic cysteine to sulphenic acid that is recycled by a reductor agent. In conditions of oxidative stress, the peroxidatic cysteine can be overoxidized to sulphenic acid inactivating the Prx. An enzyme recently discovered, named sulfiredoxin (Srx), reduces the sulphenic 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H). To explore the physiological functions of Srx in plants we have cloned, expressed and purified to homogeneity a Srx from *Arabidopsis thaliana* (AtSrx), as well as five variants by site-directed mutagenesis on amino acids involved in its activity. The activity of sulfiredoxin, determined by a new method, is dependent on the concentration of the sulphenic form of Prx and the conserved Srx is capable of regenerating the functionality of both pea and *Arabidopsis* Prx-SO<sub>2</sub>H. Molecular modelling of AtSrx and the facts that the R28Q variant shows a partial inactivation, that the activity of the E76A variant is equivalent to that of the native enzyme and that the double mutation R28Q/E76A abolishes the enzymatic activity suggests that the pair His100-Glu76 may be involved in the activation of C72 in the absence of R28. The knock-out mutant plants without Srx or 2-Cys Prx exhibited phenotypical differences under growth conditions of 16 h light, probably due to the signalling role of the sulphenic form of Prx. These mutants showed more susceptibility to oxidative stress than wild-type plants. This work presents the first systematic biochemical characterization of the Srx/Prx system from plants and contributes to a better understanding of its physiological function.

**Key words:** Antioxidant defence, *Arabidopsis*, hydrogen peroxide, inorganic phosphate, peroxiredoxin, sulfiredoxin.

### Introduction

High levels of reactive oxygen species (ROS) such as peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), superoxide ion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) have been described as compounds capable of modifying protein, lipids, and DNA (Finkel and Holbrook, 2000). By contrast, low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can function as a second messenger signal in cell proliferation,

differentiation, and migration (Rhee, 2006; Sundaresan *et al.*, 1995). The deregulation of these signalling processes leads to oxidative stress and disease states, including diabetes, cancer, and ageing (Finkel and Holbrook, 2000; Klaunig and Kamendulis, 2004). The ubiquitous peroxiredoxin (Prx) family, and specifically the 2-Cys Prxs, have

Abbreviations: AMS, 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulphonic acid; ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DTT, dithiothreitol; GSH, glutathione; IPTG, isopropyl-1-thio-β-D-galactoside; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

© 2010 The Author(s).

been recognized as peroxide sensors that can be inactivated through hyperoxidation (Kang *et al.*, 2005). Their catalytic cycle consists of two events: (i) the nucleophilic attack of the peroxide by the conserved *peroxidatic cysteine* that is oxidized to sulphenic acid (Cys-S<sub>p</sub>OH), and (ii) the resolution by attack of a free thiol to release water and form a disulphide. At high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the *peroxidatic cysteine* can be overoxidized to the sulphenic acid form (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H) inactivating the enzyme and acting itself as a signal (Vivancos *et al.*, 2005).

In this context, the retroreduction of Prxs is essential to restore the peroxidase activity and the regulation of signalling events. However, the oxidation of the sulphenic acid (Cys-S<sub>p</sub>OH) to sulphinic acid in Prxs (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H) was thought to be an irreversible step (Yang *et al.*, 2002) until Woo *et al.* (2003a) reported that the sulphinic form produced during the exposure of cells to high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was reduced to the catalytically active thiol form (Cys-S<sub>p</sub>H) and that an enzyme might be involved in the reduction. These results were further confirmed by the studies on the retroreduction of different mammalian 2-Cys Prxs by Chevallet *et al.* (2003). However, the identification of the proposed enzyme was carried out by Biteau *et al.* (2003), who found in yeast that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced the over-expression of a new protein that they called sulfiredoxin (Srx) and that the deletion of the gene that encodes it reduced the tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

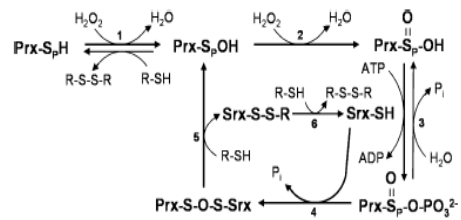
Srx is an antioxidant enzyme present in eukaryotes that contains a C-terminal cysteine residue conserved in all family members (Jönsson and Lowther, 2007). Interestingly, Srx is not apparent in prokaryotes; it is thought that this is due to the role of Srx in the restoration of over-oxidized 2-Cys Prx, whose counterparts in prokaryotes are not sensitive to oxidative inactivation (Wood *et al.*, 2003). Unlike the extensive studies in yeast (Biteau *et al.*, 2003; Vivancos *et al.*, 2005) and mammals (Chang *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006) there are only two references that provide molecular evidence for the presence of functional homologues in higher plants (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007). Plant Srxs contain all the conserved residues necessary for the binding of ATP and catalysis and a putative chloroplast targeting peptide. The single *AtSrx* gene in *Arabidopsis* encodes a 14 kDa polypeptide and knock-out plants in this protein increase the levels of sulphenic form of At-2-Cys Prx under stress. Although these two works deal with the importance of this antioxidant enzyme to maintain redox balance in chloroplasts, they do not provide a systematic biochemical characterization by a kinetic analysis of a plant Srx.

The involvement of the Prx/Srx system in growth factor signalling mediated by receptor tyrosine kinases has recently been reported in mammalian (Choi *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008) and yeast (Vivancos *et al.*, 2005) cells. Choi *et al.* (2005) have demonstrated that human Prx II is a negative regulator of *platelet-derived growth factor* (PDGF) and Prx II deficiency results in increased cell proliferation. In plants, the genome from *Arabidopsis* encodes receptor-like kinases (RLK) genes (Chae *et al.*,

2009) and, recently (Smet *et al.*, 2009), RLK signalling pathways have been identified as regulators in cell specification in plants. In this context, studies by Liu *et al.* (2006) have reported that the knock-out line of *AtSrx* was more susceptible to oxidative stress elicited by paraquat than WT plants, whereas Rey *et al.* (2007) have observed that this mutant line exhibits less oxidative damage than WT under photo-oxidative treatment.

From a mechanical point of view, two schemes have been proposed to explain the mechanism of action of the Srx and both involve an exogenous thiol reductant, ATP, Mg<sup>2+</sup>, and a conserved Cys. According to the first proposed mechanism (Fig. 1), one oxygen atom on the sulphenic moiety of the oxidized Prx functions as a nucleophile and attacks the  $\gamma$ -phosphate of ATP at the Srx to yield a sulphenic acid phosphoryl ester intermediate that is resolved by the nucleophilic attack of the Cys from the Srx (Biteau *et al.*, 2003; Jönsson *et al.*, 2008a). In the second proposed mechanism, the Cys from the Srx attacks the  $\gamma$ -phosphate of ATP resulting in the formation of a thio-phosphate intermediate that reacts with the sulphenic moiety of the Prx to yield sulphenic phosphoryl which is resolved by the external reductant (Jeong *et al.*, 2006). Thus, Srx acts as a phosphotransferase and a thioltransferase in the first hypothesis, while its role is limited to the transfer of the phosphate to the Prx in the second one. Although both mechanisms are plausible there exists some experimental evidence that supports the former (Jönsson *et al.*, 2008b).

In this article, the first systematic biochemical and functional characterization of a plant Srx is reported. The heterologous expression and purification to homogeneity of



**Fig. 1.** Catalytic cycle of 2-Cys Prx, overoxidation by peroxide, and proposed reaction mechanism of retroreduction by Srx. On the left part of the figure the peroxide oxidizes the N-terminal cysteine (the peroxidatic cysteine, Cys-S<sub>p</sub>H) of one subunit to sulphenic acid (Cys-S<sub>p</sub>OH) (1), which reacts with the C-terminal cysteine (the resolving cysteine, Cys-S<sub>p</sub>H) of the other subunit to form an intermolecular disulphide that is reduced. However, at high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> the peroxidatic cysteine can be overoxidized to sulphinic acid (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H) (2) inactivating the enzyme. According to the most accepted mechanism of retroreduction the sulphenic acid is phosphorylated, through a reversible step, by a direct attack on the  $\gamma$ -phosphate of ATP in the presence of Srx (3). The phosphoryl ester (Prx-SO<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) converted into a thiosulphinate (Prx-SO-S-Srx) and inorganic phosphate (P) is released (4). A reducing agent (R-SH) (Trx, GSH or DTT) reduces this complex to release Prx-Cys-S<sub>p</sub>OH and Srx-S-S-R (5) that is subsequently reduced to Srx-SH (6).



Srx from *Arabidopsis thaliana*, as well as of five variants (R28Q, K40Q, C72S, E76A, and R28Q/E76A) are described, with the aim of understanding its action mechanism. To this end, a new method has been designed to determine the Srx activity based on the ATP hydrolysis. The response of AtSrx and At-2-Cys-Prx knock-out lines to oxidation stress has also been explored. The results provide additional insight into the function of Srx and the crucial role in plants that of the sulphinic form of Prx.

## Materials and methods

### Cloning, mutagenesis, and purification of recombinant AtSrx and mutants R28Q, K40Q, C72S, E76A, and R28Q/E76A

Total RNA was isolated from 2 g of leaves from *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) by the phenol/SDS method (Sambrook *et al.*, 1989). The cDNA library was generated by RT-PCR using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) and oligo dT<sub>20</sub> as a primer. The full-length coding AtSrx sequence (309 pbs) which encodes the mature protein (GenBank accession number Q8GY89) was amplified by PCR. Forward and reverse primers were designed with *Nco*I and *Bam*HI (Roche, Mannheim, Germany) restriction sites respectively (underlined): AtSrx-F (5'-CACCATGGACGGTTCGCCGCGGTGAT-3'), AtSrx-R (5'-TAAGGATCCATCTTCTCTGAGGTACCAA-3').

The PCR were performed at an annealing temperature of 55 °C and the DNA products were gel-purified, cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, USA) and sequenced. The PCR cDNA encoding the predicted mature protein (amino acids 23–125), lacking chloroplast transit peptide, was digested with *Hind*III and *Bam*HI, and cloned into pETM-11 expression vector (Novagen, Darmstadt, Germany). The R28Q, K40Q, C72S, and E76A mutations were introduced by PCR as described by Rouhier *et al.* (2002) using a mix of cloning and mutagenic primers (mutagenic bases marked in bold):

AtSrx-F (as above), AtSrx-R (as above), R28Q-F (5'-TTGGAGAAGATACGACAACCGTTGAT-3'), R28Q-R (5'-ATCAACGGTTGTCGTATCTTCTCCAA-3'); K40Q-F (5'-TCTTTCACCTGGTTCGTATCGTTGGA-3'), K40Q-R (5'-TCCAACGATCAGAACCAAGTGAAGA-3'); C72S-F (5'-TATCTGTGACTTCCCGAGAACCATA-3'), C72S-R (5'-TATGGTCTCGGGAAGTCACAGATA-3'); E76A-F (5'-TGCTACTAGAACCGGCGCATCAG-3'), E76A-R (5'-CTGATGCGCCGCGTATCTGTGACT-3').

PCR were performed with 35 cycles using a temperature profile of 30 s at 94 °C, 30 s at 65 °C and 60 s at 72 °C. The purified PCR products were digested with *Nco*I and *Bam*HI and ligated into pGEM-T (Promega) at the corresponding restriction sites. The sequences of the recombinant plasmids were verified by sequencing. The PCR products of the mutants were digested with *Hind*III and *Bam*HI for cloning into pETM-11 (Novagen, Darmstadt, Germany).

For the expression of His-tagged AtSrx and its variants, *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) was transformed with the recombinant plasmids (AtSrx-pETM-11, R28Q-pETM-11, K40Q-pETM-11, C72S-pETM-11, E76A-pETM-11, and R28Q/E76A-pETM-11). Transformed cells were cultured at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with kanamycin to 0.6 OD<sub>600</sub> and then the overexpression was induced by 1 mM IPTG for 6 h. Cells were harvested by centrifugation and stored at -70 °C. Frozen cells were resuspended in 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and disrupted with French press. The crude extract was centrifuged and the supernatant was supplemented with 20 mM imidazole and DNAase (Roche) prior to loading onto a Ni<sup>2+</sup> column equilibrated with 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 500 mM

NaCl, and 20 mM imidazole in a FPLC system. Proteins were eluted with a gradient of imidazole from 20 mM to 500 mM. Fractions with the protein were dialysed against 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5) and loaded onto a Mono Q 5/50 column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl. Fractions with Srx were dialysed against 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5). The success of each step was monitored by SDS-PAGE.

### Cloning and purification of recombinant 2-Cys Prxs

The cDNA coding for mature *Arabidopsis* 2-Cys Prx (At-2-Cys Prx) (GenBank accession number Y10478) was amplified from a cDNA library using primers containing 5' extensions with *Bam*HI (Roche) site (underlined) for the forward and reverse primers: At2CP-F (5'-GGATCCATGGCGTCTGTTGCTTCTC-3'); At2CP-R (5'-GGATCCCTAAATAGCTGAGAAGTACTC-3'). The 798 pb digested product was cloned into pQE32 vector (Qiagen). The cDNA encoding At-2-Cys Prx was assessed by sequencing. Expression in BL21 cells was induced by adding 1 mM IPTG. The His-tagged 2-Cys Prx protein was purified by trapping onto Ni-nitriloacetic acid Sepharose and elution with 500 mM imidazole (Barranco-Medina *et al.*, 2008).

Chloroplast 2-Cys Prx from *Pisum sativum* (Ps-2-Cys Prx) was cloned without His-tag, and expressed and purified as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004).

### Plant material

*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) plants were grown in greenhouse with a 16/8 h light/dark photoperiod, with 250 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperature regime of 22/18 °C (day/night) and a relative humidity of 55%.

Two mutant lines (SALK 149311 and SALK 015324) for *At-2-Cys Prx B* and *AtSrx*, corresponding to T-DNA insertions events, termed ΔPrx B and ΔSrx, respectively, were isolated to obtain homozygous mutants using leaf genomic DNA extracted with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Plants homozygous for the T-DNA insertion were identified from the T<sub>3</sub> population and confirmed in the T<sub>4</sub> generation using genomic PCR according to published methods (<http://signal.salk.edu>).

The identification of the mutant lines was carried out by PCR to confirm the presence of transcript of *At-2-Cys Prx A*, *At-2-Cys Prx B*, and *AtSrx* (see Supplementary Fig. S1A at JXB online), using the following primers: 2-Cys Prx A-F (5'-CAAAGCCAGGCCGATGATC-3'), 2-Cys Prx A-R (5'-TCATTGTCTCATCAACGCTTCG-3'); 2-Cys Prx B-F (5'-CATCTCTCTCTCTGTTCCG-3'), 2-Cys Prx B-R (5'-TCTCATGTTCTCATCAACATTC-3'); AtSrx-F (as above), AtSrx-R (as above).

The presence of the T-DNA insert fragment into each knock-out line was assessed with the primer T-DNA Left border a1 (Lba1) (5'-TGGTTCACGATAGTGGCCATCG-3') with 2-Cys Prx B-R (as above) or AtSrx-R (as above) (see Supplementary Fig. S1B at JXB online).

The selection of the mutants and the study of the response of At-2-Cys Prx B and AtSrx knock-out lines to oxidative stress in plates were carried out on MS plates supplemented with kanamycin. In order to compare the oxidation stress response of mutants and wild-type (WT) plants, 5-week-old seedlings were sprayed with a solution containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.5% Tween 20.

### Isolation of chloroplasts

Young leaves (10 g) from *Arabidopsis thaliana* (Col.) were homogenized in an ice-cold buffer containing 330 mM sorbitol, 50 mM MES-KOH (pH 6.5), 2 mM ascorbate, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Chloroplasts were purified on a Percoll gradient (König *et al.*, 2002) and resuspended in sorbitol buffer. The amount of chloroplastic protein was determined by the Bradford (1976) assay

and the approximate number of chloroplast was estimated with a Neubauer camera.

*Histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in leaves*

The histochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was performed using endogenous POX-dependent *in situ* histochemical staining, in which whole leaves were vacuum-infiltrated with 0.1 mg ml<sup>-1</sup> 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) in 50 mM TRIS-acetate buffer (pH 5.0) and incubated at 25 °C, in the dark, for 24 h (Hernández *et al.*, 2001). Leaves were rinsed in 80% (v/v) ethanol for 10 min at 70 °C, mounted in lactic acid:phenol:water (1:1:1, by vol.), and photographed directly.

*Fluorescence measurements*

Modulated chlorophyll fluorescence emission from the upper surface of dark-adapted leaf discs was measured at midday using a PAM-2000 modulated Walz (Effeltrich, Germany) fluorometer. After dark adaptation of whole plants for 30 min, *F<sub>o</sub>* and *F<sub>m</sub>* measurements were performed from 6-8 leaves per plant. The initial level (*F<sub>o</sub>*) of chlorophyll fluorescence was excited by a dim red light modulated at 600 Hz and determined with far-red light after a 2 s illumination, while the maximal level (*F<sub>m</sub>*) was induced by an 800 ms pulse of intense white light. The efficiency of excitation energy capture by PSII, corresponding to the probability that an absorbed photon reaches the PSII reaction centres, was calculated as  $(F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$ .

*Obtaining the sulphinic form of 2-Cys Prx*

The sulphinic form of Prx (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) was generated in 50 mM TRIS-HCl pH 7.5 by a first incubation with 10 mM DTT for 30 min at 37 °C and then 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added to the reaction mixture and the sample was incubated for an additional 30 min at 37 °C. The excess of DTT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was removed by dialysis in a PD-10 column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equilibrated with 25 mM TRIS-HCl pH 7.5. The sulphinic form of Prx was checked by immuno-blot analysis after treatment with AMS (Biteau *et al.*, 2003) and by identification with specific antibodies (Woo *et al.*, 2003b).

*In vitro Srx activity assays*

The determination of the Srx activity by the spectrophotometric quantification of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) is based on the method described by Chen *et al.* (1956). Reaction mixtures containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, and various concentrations of ATP (0.25 or 1 mM), 2-Cys Prx (reduced and overoxidized) (15–30 μM) and Srx (1–5 μM), with or without GSH (10 mM), were incubated at 30 °C. At the indicated times (from 0 min to 120 min), aliquots of 100 μl were withdrawn and added to 350 μl of the colour reagent (two volumes of 10% (w/v) trichloroacetic acid/four volumes of 0.4% (w/v) ammonium molybdate in 3% (v/v) sulphuric acid/one volume of fresh L-ascorbic acid at 66.7 mg ml<sup>-1</sup>). After exactly 3 min of incubation at room temperature, 50 μl of 1.3 M tri-sodium citrate (Merck, Darmstadt, Germany) were added (Baginski *et al.*, 1975; Gawronski and Benson, 2004) and the reaction was allowed to equilibrate for 45 min at 37 °C before reading the absorbance at 820 nm. For each determination a standard curve was obtained with potassium di-hydrogen phosphate (0–100 μM).

Srx activity was also measured by the spectrophotometric quantification of ADP by coupling to the oxidation of NADH in the presence of phosphoenolpyruvate, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase (Kornberg and Pricer, 1951). Aliquots of the reaction mixtures prepared as described above were withdrawn at the indicated times and added to a mixture containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.4 mM NADH,

10 U of pyruvate kinase, and 10 U of lactate dehydrogenase, with or without (blank cuvette) 2.5 mM phosphoenol pyruvate, and the absorbance at 340 nm was measured.

The ATP/ADP ratio during Srx-dependent retroreduction of Prx-SO<sub>2</sub>H was monitored by chromatography in a Mono Q 5/50 GL column as described by Jönsson *et al.* (2005).

*Kinetic parameters*

*K<sub>M</sub>* and *k<sub>cat</sub>* of Srx from *Arabidopsis* and pea were determined by spectrophotometric quantification of the inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) released at 5 min and 10 min (to check a lineal increase) of reaction using saturating concentrations of purified Srx (30 μM), for its substrates: sulphinic form of 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) using 1 mM ATP, and for ATP using 40 μM Prx-SO<sub>2</sub>H. All determinations were made under the same conditions of reaction: 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, from 0–40 μM of Prx-SO<sub>2</sub>H, and from 0 to 500 μM of ATP, incubated at 30 °C in the absence of reductant.

*Peroxidase activity*

Peroxide-dependent peroxidase activity of the recombinant 2-Cys Prxs were measured as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004).

*Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis*

Denaturing SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) with acrylamide concentrations of 6% (stacking gel) and 12.5% (resolving gel). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. For Western blot analysis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Germany) by electroblotting. Immunoreaction was carried out with rabbit serum against mature 2-Cys Prx, Srx or hyperoxidized Prx, diluted 1/5000, 1/1500, or 1/2000, respectively, in PBST containing 5% dried milk. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, St Louis, USA) was used as the secondary antibody. The antigen was detected by chemiluminescence using a Western Lighting chemiluminescence reagent plus (Perkin-Elmer, Boston, USA) following the manufacturer's protocol.

Antibodies against 2-Cys Prx were obtained as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004), while antibodies against the Srx peptide (CHRYEAHQKLGGLPTI) were generated by Abyntek (Vizcaya, Spain) and antibodies against hyperoxidized Prx were purchased from LabFrontier (Seoul, Korea).

*Molecular modelling of the AtSrx and pK<sub>a</sub> predictions*

Modelling was approached by homology modelling at the Geno3D server (Combet *et al.*, 2002) using as template the human Srx PDB entries 1xw3 and 3cyi that share about 39% identity, the psi-blast E-values (Altschul *et al.*, 1997) being 9e<sup>-6</sup> (9e<sup>-21</sup> to 1e<sup>-19</sup> when only structures in the PDB sharing less than 95% pairwise identity are considered). Both models comprise residues 21 to 102 (80% coverage) although that generated using 3cyi as template led to better parameters than that from 1xw3. Thus, the Errat overall quality factors (Colovos and Yeates, 1993) were 100 versus 91.9, the percentage of residues with an averaged 3D-ID score (Lüthy *et al.*, 1992) better than 0.2 was 91.8% versus 98.8%.

Predictions of pK<sub>a</sub> were carried out at PROPKA server. It implements a method based on empirical relationships that uses as input 3D coordinates. The reported overall accuracy on the basis of the comparison of 314 experimental pK<sub>a</sub> values with those estimated by PROPKA is ±0.89 pH units. For the particular case of Cys, PROPKA predictions are within 1 pH unit of experimental values in 83% of the cases (Li *et al.*, 2005).

## Results and discussion

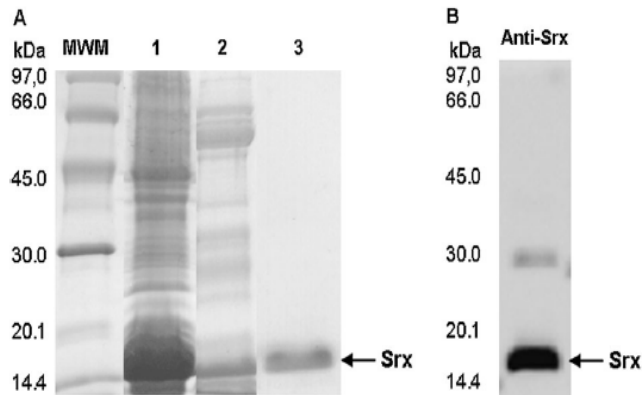
### Isolation of recombinant AtSrx and production of sulphinic form of Prx

A 375 pb cDNA was isolated from *Arabidopsis thaliana* RNA by RT-PCR and primers designed from the sequence of the putative AtSrx. The cDNA sequence encoded a 125 amino acids peptide with a molecular mass of 13 914 Da and a sequence-derived isoelectric point of 10.76, bearing a chloroplast transit peptide in the N-terminus and the signature sequence FG/SCHRY present in plant Srxs (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007). A second PCR amplification with suitable primers led to the cDNA of the mature protein consisting of 103 amino acids with predicted molecular weight and isoelectric point of 11 546 and 9.86 Da, respectively. This cDNA was subcloned into pETM-11 expression vector and overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) to yield the recombinant N-terminal 6× His-tagged fusion mature Srx (AtSrx). The SDS-PAGE analysis showed that the His-tag approach led to a partially pure sample and additional Mono Q chromatography was needed to isolate the recombinant AtSrx (Fig. 2A). The Srx identity of the isolated recombinant protein was confirmed by Western blotting with antibodies against a Srx peptide and revealed a faint band at a molecular weight corresponding to a dimer of Srx (Fig. 2B).

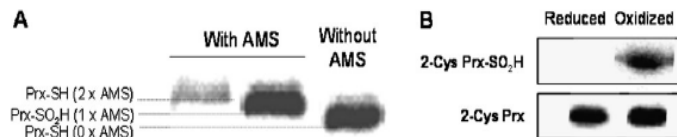
Srx is involved in the restoration of the sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin (Prx-SO<sub>2</sub>H). Hence the production and overoxidation of Prx was a prerequisite to characterize the functionality of the AtSrx. Recombinant 2-Cys Prx from *Arabidopsis thaliana* was isolated and oxidized to the sulphinic form by a first incubation with DTT to reduce any disulphide bond blocking the cysteine residues of the active site and then by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to oxidize them to the sulphinic form. The formation of the sulphinic species was monitored by 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulphonic acid (AMS) treatment (Biteau *et al.*, 2003) which alkylates cysteines only in the free SH-form and increases the molecular weight in about 0.5 kDa (Fig. 3A) and also by Western blot using specific antibodies against the Prx-SO<sub>2</sub>H (Woo *et al.*, 2003b) (Fig. 3B). Both assays confirmed the production of the overoxidized Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) and HPLC-mass spectrometry verified the sulphinic identity of the overoxidized form and the absence of sulphonic forms.

### Determination of the sulfiredoxin activity

The activity of Srx may be determined by two different approaches that have been implemented in several methods not exempt of some drawbacks: (i) detection and quantification of the redox state of the Prx (Biteau *et al.*, 2003;



**Fig. 2.** Purification of recombinant AtSrx and confirmation of the Srx identity. (A) SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Lane 1, crude extract; lane 2, after His-tag column; lane 3, pure protein after Mono Q chromatography. (B) Western blot with a specific antibody against Srx.



**Fig. 3.** Assessment of the production of overoxidized forms of At-2-Cys Prx. (A) Purified 2-Cys Prx was overoxidized to the Prx-SO<sub>2</sub>H form in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and then treated with AMS as described in the Materials and methods. After SDS-PAGE, reduced (2× AMS) and overoxidized (1× AMS) forms of 2-Cys Prx were visualized with Western blot with an antibody against 2-Cys Prx. The reduced form of 2-Cys Prx without AMS is also visualized as a control. (B) Western blot with antibodies against hyperoxidized Prx (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) and 2-Cys Prx.



Chang *et al.*, 2004) and (ii) determination of the hydrolysis of the ATP (Jeong *et al.*, 2006; Roussel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). The enzymatic activity of the recombinant AtSrx was determined by two variants of the methods based on the hydrolysis of ATP. One relies in the oxidation rate of NADH to report the ADP formation via coupling to the conversion of phosphoenolpyruvate into pyruvate and then into lactate by pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, respectively. Both enzymes are commercial and results may be standardized, circumventing the strong variability of the enzymatic determination of the hydrolysis of ATP currently in use. The second method is based on the formation of a coloured phosphomolybdate complex between molybdate and the phosphate resulting from the hydrolysis of ATP. The determination of the enzymatic activity of the recombinant AtSrx by the two alternative methodologies is summarized in Table 1. Results demonstrate the feasibility of both approaches and show that the molar concentration of ADP after 2 h of reaction at different Srx:Prx-SO<sub>2</sub>H stoichiometries in the presence of 250 μM or 1 mM ATP corresponds to the concentration of phosphate.

The simplicity of colorimetric assay is especially attractive and further evidences of its feasibility were obtained by comparison with the method based on the detection and quantification of the redox state of the Prx by Western blotting (Chang *et al.*, 2004). To this end, the Srx activity of aliquots withdrawn at different times from a sample containing 5 μM AtSrx, 15 μM Prx-SO<sub>2</sub>H, 10 mM GSH, and 250 μM ATP was determined by quantification of both the sulphinic Prx with specific antibodies and the phosphate by the colorimetric assay. As shown in Fig. 4A, the intensity of the band detected by antibody against the hyperoxidized Prx decreased as the incubation time with AtSrx is longer whereas the intensity of the band detected with antibodies against 2-Cys Prx remained unchanged. The plot of the amount Prx-SO<sub>2</sub>H reduced by AtSrx estimated from the Western blot, versus the concentration of phosphate (P<sub>i</sub>)

resulting from the hydrolysis of ATP, reveals a linear relationship with *R* coefficient of 0.94 and an estimated slope of 0.98 (Fig. 4B) that validates the colorimetric assay for the determination of the sulfiredoxin activity.

*Characterization of the sulfiredoxin from Arabidopsis*

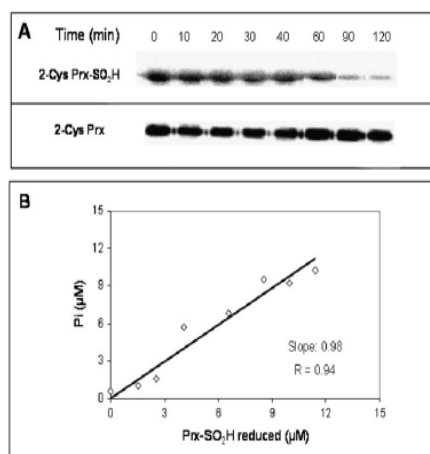
The biochemical characterization of mammalian sulfiredoxins by Jeong *et al.* (2006) revealed that the hydrolysis of ATP was dependent on the sulphinic form of peroxiredoxin (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) and that, in the presence of glutathione, it reached the concentration of the sulphinic Prx (Fig. 1, step 5). In the absence of the reductant (GSH, DTT, Trx, ...), the hydrolysis of ATP progressed further and this experimental result was explained on the basis of a futile cycle of phosphorylation and dephosphorylation that consumes ATP continuously as a consequence of the formation of a sulphinic phosphoryl ester Prx intermediate (Fig. 1, steps 3 and 4) that is hydrolysed to regenerate the sulphinic acid group. The fact that the kinetic of the inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) formation is hyperbolically saturated led to the suggestion of an inactivation as a result of a disulphide formation between Srx and Prx.

There is no similar study on plant Srxs, and AtSrx is a good model to test the generality of the above observations. The assay of activity using several pH (from 6.8 to 9.5), revealed that the optimal reduction of Prx-SO<sub>2</sub>H by AtSrx takes place at pH 7.8 (data not shown). In a first set

**Table 1.** Comparison between Srx activity measured by the determination of released phosphate and by the determination of released ADP

Reaction mixtures containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub> and the indicated concentrations of AtSrx, Prx-SO<sub>2</sub>H, and ATP. After 2 h incubation at 30 °C, released phosphate and ADP were determined as indicated in the Materials and methods. Data are means ±SD of values from three independent experiments and the similarity between both methods were statistically analysed by a 2-tailed Student *t* test.

AtSrx (μM)	Prx-SO <sub>2</sub> H (μM)	ATP (mM)	P <sub>i</sub> (μM)	ADP (μM)	Significance
5	15	0.25	35.9±4.3	42.1±2.5	≥0.99
5	30	0.25	80.4±11.5	78.4±2.1	≥0.99
2.5	15	0.25	24.4±3.1	26.4±3.4	≥0.99
5	15	1	63.2±5.0	77.5±5.3	≥0.98
5	30	1	96.6±7.6	97.6±4.5	≥0.99
2.5	15	1	44.3±4.4	59.6±3.1	≥0.98



**Fig. 4.** Correlation between Srx activity measured by the determination of released phosphate and that using specific antibodies against hyperoxidized Prx. Reaction mixture containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 μM ATP, 10 mM GSH, 15 μM Prx-SO<sub>2</sub>H, and 5 μM Srx was incubated at 30 °C. (A) At the indicated times, aliquots were withdrawn and subjected to Western blot with specific antibodies against Prx-SO<sub>2</sub>H and 2-Cys Prx (control). (B) The concentration of Prx-SO<sub>2</sub>H reduced was determined from the corresponding Western blot band intensity (by analysed imaging) and plotted against the concentration of phosphate determined in the same samples.

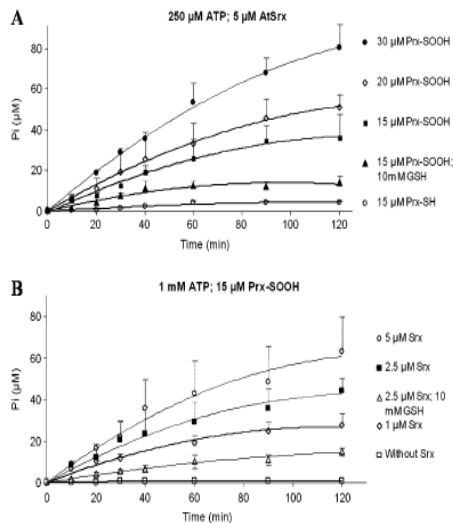
of experiments at 250  $\mu\text{M}$  ATP and 5  $\mu\text{M}$  AtSrx, the influence of the Prx was analysed. As depicted in Fig. 5A, the release of phosphate was negligible when reduced 2-Cys Prx (Prx-SH) was assayed, confirming the requirement of the sulphinic moiety and ruling out a non-specific ATP hydrolysis. As its mammalian counterparts, in the presence of 10 mM GSH the concentration of released phosphate (13.9  $\mu\text{M}$ ) was that of the sulphinic Prx (15  $\mu\text{M}$ ) in the assay, being the extent of ATP hydrolysis in absence of reductant influenced by the concentration of the sulphinic Prx and larger than its concentration in the assay, in full agreement with the existence of the proposed phosphorylation/dephosphorylation futile cycle (Fig. 1, step 3).

In a second set of experiments at 1 mM ATP and 15  $\mu\text{M}$  Prx-SO<sub>2</sub>H, the effect of the concentration of AtSrx was studied (Fig. 5B). As expected, in the presence of GSH the released P<sub>i</sub> reached the concentration of sulphinic Prx in the assay (15.2  $\mu\text{M}$  and 15  $\mu\text{M}$ , respectively). On the other hand, the assay in the absence of the reductant supports the

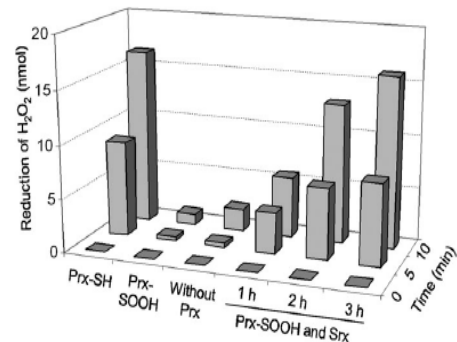
participation of the AtSrx in the futile cycle since at 15  $\mu\text{M}$  Prx-SO<sub>2</sub>H, the hydrolysis of ATP at 5, 2.5, and 1  $\mu\text{M}$  AtSrx yielded 63.2, 44.3, and 27.8  $\mu\text{M}$  P<sub>i</sub>, respectively. Moreover, a comparison of experiments at 15  $\mu\text{M}$  Prx-SO<sub>2</sub>H and 5  $\mu\text{M}$  AtSrx, and 250  $\mu\text{M}$  ATP (Fig. 5A) or 1 mM ATP (Fig. 5B), reveals a release of P<sub>i</sub> of 35.9  $\mu\text{M}$  and 63.2  $\mu\text{M}$ , respectively, suggesting that the yield of the futile cycle is also dependent on the concentration of ATP.

The kinetic parameters of AtSrx were determined by measuring the P<sub>i</sub> released after 5 min of reaction. For the sulphinic form of At-2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) using saturating concentrations of AtSrx (30  $\mu\text{M}$ ) and 1 mM ATP, the kinetic parameters were determined to be:  $K_M=79 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}=0.66 \text{ min}^{-1}$ ; the kinetic parameters for ATP using saturating concentrations of AtSrx (30  $\mu\text{M}$ ) and 40  $\mu\text{M}$  sulphinic 2-Cys Prx were:  $K_M=29 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}=0.025 \text{ min}^{-1}$ . These data are similar to those obtained from mammalian Srx (Jönsson and Lowther, 2007), suggesting that AtSrx, like mammalian Srx, is not a highly efficient enzyme despite our calculations revealing the low concentration of this enzyme in this organelle that was estimated as 2 ng of Srx in 1  $\mu\text{g}$  of total chloroplastic protein (see Supplementary Fig. S2 at JXB online).

In order to evaluate the functionality of the regenerated Prx the peroxidase activity of retroreduced, overoxidized, and reduced Prxs specimens were analysed. Results showed a negligible activity for Prx-SO<sub>2</sub>H and that 3 h of retroreduction in the presence of Srx, GSH, and ATP led to a 96.8% restoration of the peroxidase activity compared with the reduced Prx (Fig. 6). On the other hand, there exists evidence of the capability of the human Srx to reduced mitochondrial peroxidoredoxin III although the physiological mechanism of the mitochondrial translocation remains unclear. In fact it has been demonstrated that the



**Fig. 5.** Srx enzymatic activity determined by the quantification of the phosphate resulting from the hydrolysis of ATP. Reaction mixtures containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu\text{M}$  or 1 mM ATP and various concentrations of 2-Cys Prx (reduced and overoxidized) and Srx were incubated at 30 °C. At the indicated times, aliquots of 100  $\mu\text{l}$  were withdrawn and subjected to phosphate determination as described in the Materials and methods. (A) The reaction was carried out with 250  $\mu\text{M}$  ATP, 5  $\mu\text{M}$  Srx, and various concentrations of Prx-SO<sub>2</sub>H, namely, 30  $\mu\text{M}$  (closed circles), 20  $\mu\text{M}$  (open diamonds), 15  $\mu\text{M}$  (open squares); 15  $\mu\text{M}$  and 10 mM GSH (closed triangles); control with 15  $\mu\text{M}$  Prx-SH (open circles). (B) The reaction was carried out with 1 mM ATP, 15  $\mu\text{M}$  Prx-SO<sub>2</sub>H, and various concentrations of Srx, namely, 5  $\mu\text{M}$  (open circles), 2.5  $\mu\text{M}$  (closed squares), 1  $\mu\text{M}$  (open diamonds); 2.5  $\mu\text{M}$  and 10 mM GSH (open triangles); control without Srx (open squares). Data are means  $\pm$  SD of values from three independent experiments.

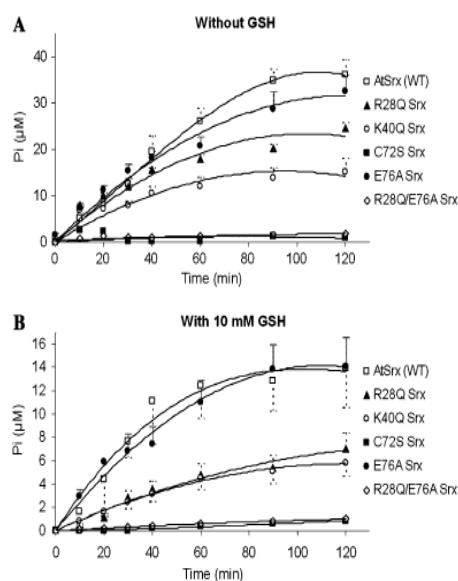


**Fig. 6.** Recovery of the peroxidase activity of the sulphinic form of Prx. Reaction mixture containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM GSH, 5  $\mu\text{M}$  Prx-SO<sub>2</sub>H, and 1  $\mu\text{M}$  Srx was incubated at 30 °C. At 1, 2, and 3 h aliquots were withdrawn and peroxidase activity was determined at the indicated times, as described in the Materials and methods. Peroxidase activity of recombinant reduced 2-Cys Prx (Prx-SH) and overoxidized Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) were also determined. Peroxidase activity without Prx was determined as a control.

overexpression of mitochondrion-targeted Srx promotes the restoration of Prx III and results in cellular resistance to apoptosis with enhanced elimination of mitochondrial  $H_2O_2$  (Noh *et al.*, 2009). In this context, the feasibility of AtSrx to restore the activity of other Prxs was put to test on the recombinant *Pisum sativum* 2-Cys Prx, lacking the His-tag and the sequence identity with that from *Arabidopsis* being 84.2%. Results revealed similar activity of the regenerated Prx regardless of the species and the presence of His-tag and the kinetic parameters are similar to those reported above for Prx-SO<sub>2</sub>H ( $K_M=71 \mu M$ ,  $k_{cat}=0.65 \text{ min}^{-1}$ ).

#### Site-directed mutagenesis of AtSrx

In order to gain additional insight into the features of AtSrx, site-directed mutagenesis was carried on, R28, K40, C72, and E76. Residues R28, K40, and C72 are conserved among Srx proteins from mammals, yeast, and plants and they have been demonstrated to play a critical role in the functionality of the enzyme (Jeong *et al.*, 2006). Five mutants of AtSrx, namely R28Q, K40Q, C72S, E76A, and R28Q/E76A were generated and their Srx activity was assayed in the absence (Fig. 7A) and presence (Fig. 7B) of reductant (10 mM GSH) and no significant relative difference have been found between both conditions. The



**Fig. 7.** Activity of Srx variants. (A) Activity was measured as described in Fig. 5, in the presence of 250  $\mu M$  ATP, 15  $\mu M$  Prx-SOOH, and 5  $\mu M$  Srx, namely, AtSrx WT (open squares); R28Q Srx (closed triangles); K40Q Srx (open circles); C72S Srx (closed squares); E76A Srx (closed triangles), and R28Q/E76A Srx (open diamonds). (B) Activity was measured with the same mix of reactions, adding 10 mM of GSH. Data are means  $\pm$ SD of values from three independent experiments.

kinetic parameters ( $K_M$  and  $k_{cat}$ ) and the catalytic efficiency as expressed by  $k_{cat}/K_M$  values for the assay in the absence of reductant are summarized in Table 2. The discrepancy observed for the lowest  $k_{cat}/K_M$  value reported for K40Q or R28Q, depending on the use of ATP or 2-Cys-Prx-SO<sub>2</sub>H as substrate, can be rationalized on the basis that both substrates interact in the catalysis,  $k_{cat}/K_M$  values being diminished for both substrates and both variants.

As expected, mutation of C72S resulted in an abolition of the activity, confirming its critical role in the hydrolysis of ATP. Residues R28 and K40 correspond to R51 and K61 in human Srx (the residue numbers are lower by one in rat Srx) and their mutation to glutamine resulted in a partial reduction of the hydrolysis of ATP (Fig. 7). According to the X-ray structure of the human Srx (Jönsson *et al.*, 2005) K61 interacts with one of the oxygen atoms of the  $\alpha$ -phosphate of ADP and its mutation in rat Srx led to a weak ATPase binding and an ATPase activity of 10% of that of the Srx (Jeong *et al.*, 2006). Thus ATPase activity of the K40Q AtSrx can be explained as a consequence of a diminished ATP binding capability.

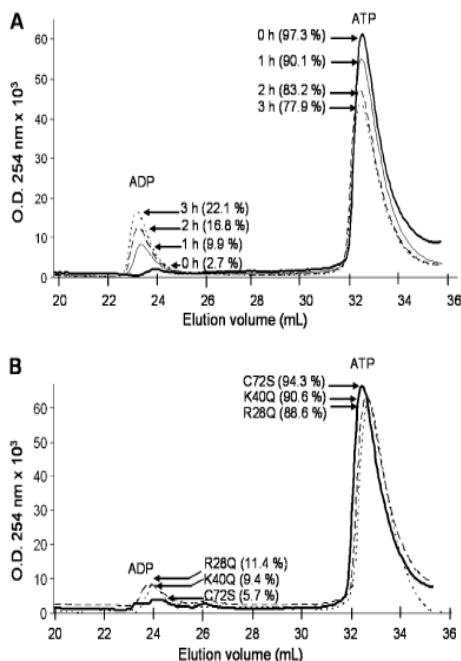
Mutation of R28 was expected to result in the inactivation of the enzyme, as reported for rat Srx, since the structure of the human Srx shows that R51 is adjacent to C99 (C72 in AtSrx) and most likely functions to activate C99 to the thiolate form. However, the colorimetric assay showed that R28Q AtSrx retains a significant functionality (Fig. 7). This result was confirmed by the chromatographic determination of the ATP/ADP ratio during Srx-dependent retroreduction of Prx-SO<sub>2</sub>H since the retention time for ATP and ADP in a Mono Q 5/50 column is different enough even to monitor the ATPase activity (Fig. 8A). As shown in Fig. 8B, the amount of ADP produced by mutant C72S was negligible, which is in agreement with the data reported by Jönsson *et al.* (2005) using the same method and similar concentrations of Srx (25  $\mu M$ ), overoxidized Prx (25  $\mu M$ ), and ATP (0.5 mM). Variants R28Q and K40Q (Fig. 8B) showed activities comparable to those obtained by the phosphate determination (Fig. 7), R28Q being more active than K40Q and validating the results obtained by the colorimetric assay.

**Table 2.** Kinetic parameters for AtSrx and its variants for Prx and ATP

Data were determined by measuring  $P_i$  at 5 min in reactions containing 30  $\mu M$  AtSrx, 1 mM Mg, 0–40  $\mu M$  Prx-SO<sub>2</sub>H or 0–500  $\mu M$  ATP in 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5).

Enzyme	Substrate	$k_{cat}/K_M$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
AtSrx WT	2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	$1.39 \times 10^2$
	ATP	$0.14 \times 10^2$
R28Q AtSrx	2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	$0.27 \times 10^2$
	ATP	$0.03 \times 10^2$
K40Q AtSrx	2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	$0.47 \times 10^2$
	ATP	$0.02 \times 10^2$
E76A AtSrx	2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	$1.46 \times 10^2$
	ATP	$0.16 \times 10^2$





**Fig. 8.** FPLC analysis of SrX activity. Reaction mixture containing 50 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM ATP, 15 μM SrX, and 30 μM Prx-SO<sub>2</sub>H (AtSrX and variants) were incubated at 30 °C. Aliquots of 200 μl were withdrawn at the indicated times and the ADP formed was separated from ATP in a Mono Q anion exchange column as indicated in the Materials and methods. (A) AtSrX activity with Prx-SO<sub>2</sub>H after the indicated times. (B) Variants SrX activity R28Q, K40Q, and C72S with Prx-SO<sub>2</sub>H after 3 h of reaction.

The above results suggest that the activation of C72 is either poorly relevant or resulting from the interaction with other residues besides R28. The former hypothesis does not seem realistic since this type of Arg-Cys interaction to activate the nucleophilicity of Cys has been described in other enzymes such as peroxiredoxins (Wood *et al.*, 2003) and methionine sulphoxide reductases (Lowther *et al.*, 2002). In fact the pK<sub>a</sub> predicted by PROPKA server (Li *et al.*, 2005) for C99 from human SrX is 4.98. This anomalous pK<sub>a</sub> value for a cysteine (the standard value is 9.0) makes C72 especially reactive, being the hydrogen bonding with R51, S55 the main responsible for the enhanced nucleophilicity of C99 (Table 3).

To address the existence of other residues involved in the nucleophilic activation of C72 the tertiary structure of the AtSrX was modelled at the Geno3D server (Combet *et al.*, 2002). The best two models were generated using as template the coordinates of the human SrX (PDB entry 1xw3) and the C99S mutant (PDB entry 3cyi). Both models comprised residues 21 to 102 and the fact that the alignment of the coordinates with Swiss-PDBviewer 4.0.1 (Guex and Peitsch, 1996) yielded an overall RMS deviation of 0.87 Å confirmed that they are equivalent. The prediction of the

pK<sub>a</sub> value for C72 was 6.46 and 4.29 for the model based on the human SrX and C99S mutant, respectively. The analysis of the residues involved in the activation of C72 is summarized in Table 3 and it identifies R28 as being mainly responsible for the shift in the pK<sub>a</sub> for the model based on the SrX although the predicted value was far from that predicted for C99 from the human SrX. Unexpectedly, the model based on the C99S showed a completely different pattern, H73 and T33 being the two main contributors to the pK<sub>a</sub> shift that, however, yielded the pK<sub>a</sub> prediction closest to that for the human SrX. The inspection of both models revealed that the only difference was the position of the SH-group. In the model based on the coordinates of the C99S human SrX, the -SH group of the catalytic Cys is pointing to residue H100 that shows an anomalous predicted pK<sub>a</sub> value of 7.22 (standard value for histidine is 6.5) as a consequence of the interaction with E76 (Table 3).

The catalytic triad cysteine-histidine-glutamic acid predicted by the model is present in picornains 2A and 3C, cysteine peptidases from picornaviruses. Cysteine proteases are thought to attack the substrate by a thiolate-imidazolium ion pair, the acidic component of the triad being essential for activity (Polgar, 2005). In order to assess the prediction, the double mutant R28Q/E76A was produced and the resulting protein was inactive in the absence and presence of reductor (Fig. 7), validating the prediction. The facts that, in mammals, the residue equivalent to E76 is A103 and that the mutation of R51 (equivalent to R28 in At-SrX) yields the inactivation of the enzyme encouraged us to generate the variant E76A to explore its role in catalysis. However, variant E76A shows the same activity as AtSrX WT (Fig. 7), suggesting that E76 is not crucial in the wild-type plant enzyme and that the pair histidine-glutamic acid may be involved in the activation of C72 in the absence of R28.

#### Response of ΔSrX and ΔPrx B plants to oxidative stress

The involvement of the Prx/SrX system in growth factor signalling mediated by receptor tyrosine kinases in mammalian (Choi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Lei *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008) and yeast (Vivancos *et al.*, 2005) and the existence of more than 600 receptor-like kinase homologues in the *Arabidopsis thaliana* genome whose role in signalling pathways has been recognized (Smet *et al.*, 2009) prompted us to investigate the role of the Prx/SrX system in the growth under oxidative conditions. As shown in Fig. 9A, knock-out lines of *Arabidopsis* (ΔSrX and ΔPrx B) grown in a 16/8 h light/dark photoperiod exhibited phenotypic differences. Leaves were smaller in ΔSrX but larger in ΔPrx B compared with WT in 5-week-old plants. The average rosette diameter (cm) for n=10 plants were 7.87±0.91 (AtWT), 9.41±0.95 (ΔPrx B), and 6.21±0.57 (ΔSrX). These differences with respect to the WT were statistically significant by a 2-tailed Student *t* test at P > 0.98. This is the first phenotype variation described for both lines of mutants in plants grown under a long cycle photoperiod. However, under a short cycle photoperiod (8/16 h light/dark) no phenotypic differences between both lines and WT were observed (data

**Table 3.** pK<sub>a</sub> values as output by PROPKA for the catalytic Cys and the nearby His predicted from the structure of the human Srx and the models of AtSrx based on the PDB entries 3cyi (C99S human Srx) and 1xw3 (human Srx)

 The contribution of the pK<sub>a</sub> shift is quantified in terms of three perturbations: desolvation, hydrogen bonding and charge-charge interactions.

Human Srx (1xw3)												
Residue	pK <sub>a</sub>	Locate	Desolvation effects				Sidechain hydrogen bond			Backbone hydrogen bond		
			Massive		Local							
Cys 99	4.98	Surface	0.00	363	0.00	0	-1.46	Ser	55	-0.73	Val	56
His 100	6.29	Surface	0.00	278	-0.21	3	-1.50	Arg	51	-0.33	Cys	99
							0.00	-	0	0.00	-	0

Model of the tertiary structure of AtSrx using 1xw3 as template												
Residue	pK <sub>a</sub>	Locate	Desolvation effects				Sidechain hydrogen bond			Backbone hydrogen bond		
			Massive		Local							
Cys 72	6.46	Surface	0.00	358	0.07	1	-1.60	Arg	28	-0.36	Thr	33
							0.00	-	0	-0.62	Cys	72
His 73	6.36	Surface	0.00	295	-0.14	2	0.00	-	0	-0.03	His	73
										0.00	-	0

Model of the tertiary structure of AtSrx using 3cyi as template												
Residue	pK <sub>a</sub>	Locate	Desolvation effects				Sidechain hydrogen bond			Backbone hydrogen bond		
			Massive		Local							
Cys 72	4.29	Surface	0.00	337	0.14	2	-1.60	Thr	33	-0.81	Thr	33
							0.00	-	0	-0.78	Cys	72
His 73	7.22	Surface	0.00	293	0.07	1	0.79	Glu	76	0.00	-	0

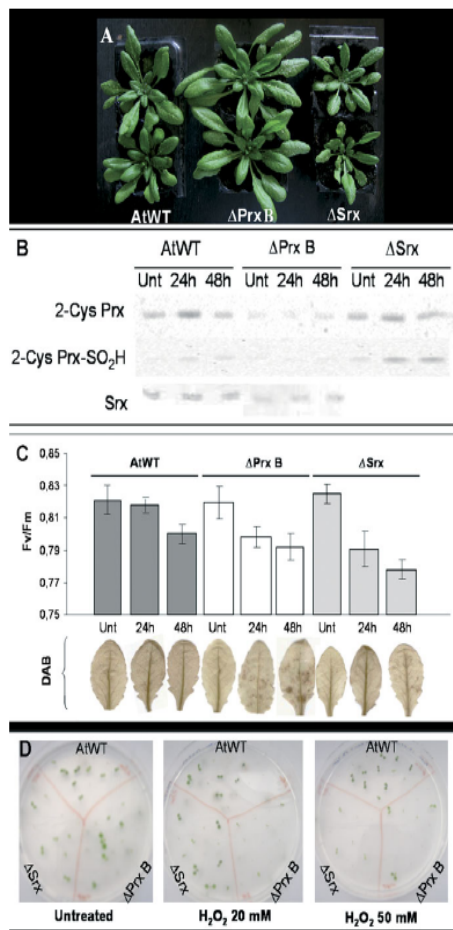
not shown), in full agreement with the bibliography (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007). As expected, Western blot analysis of leaf extracts showed a small amount of 2-Cys Prx and of its sulphinic form in ΔPrx B (because 2-Cys Prx A is expressing) as well as the absence of Srx in ΔSrx (Fig. 9B). A closer analysis revealed a higher level of Prx-SO<sub>2</sub>H in ΔSrx than in WT and an inverse relationship between growth and level of Prx-SO<sub>2</sub>H. It is tempting to speculate that this inverse correlation may be related to a regulatory role of the sulphinic form of 2-Cys Prx B that may account for the phenotypical differences observed under a long photoperiod: the extended illumination may induce a moderate stress, increasing the amount of sulphinic Prx that yields a lower growth rate. Thus, ΔPrx B plants that produce a low amount of Prx-SO<sub>2</sub>H and ΔSrx that can not retroreduce it exhibited the largest and the smallest leaf size, respectively. This hypothesis demands additional studies to confirm by complementation lines whether the phenotypic differences are the result of the level of Prx-SO<sub>2</sub>H. Further work would open a wide field connecting Prx/Srx system and redox signalling.

Plants treated with 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to induce an oxidative stress showed differences in the levels of the sulphinic form of 2-Cys Prx when compared with untreated plants (Fig. 9B). In ΔSrx, the absence of Srx yielded an increased

level of Prx after 24 h and 48 h of treatment that has not been found in AtWT. Liu *et al.* (2006) reported an increase of Srx at the transcript level in WT plants under stress conditions. However, no changes in the level of AtSrx have been found in treated plants, probably due to the limited time of treatment. On the other hand, the fact that ΔPrx B plants yielded a lower level of Srx than the AtWT suggests that the sulphinic form of 2-Cys Prx in plants may regulate the expression of Srx as shown in yeast by Vivancos *et al.* (2005). To our knowledge, this is the first report of a lower level of the Srx protein in ΔPrx B compared with AtWT plants.

The effect of the manipulation of the Prx/Srx system on the photosynthetic efficiency ( $F_v/F_m$ ) was also analysed. As shown in Fig. 9C, although  $F_v/F_m$  was not affected in untreated plants, mutants were more sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and DAB detection revealed a larger accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide ion probably due to the difficulty of eliminating them. This result is in full agreement with those reported by Liu *et al.* (2006), who found that AtSrx knock-out mutants under paraquat treatment were more sensitive than WT and also had greater sensitivity of the Srx knock-down mammalian epidermal cells to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced cell death (Wei *et al.*, 2008). However, Rey *et al.* (2007) have reported that





**Fig. 9.** Characterization of  $\Delta$ Prx B and  $\Delta$ Srx and its response to oxidative stress. (A) Phenotype of untreated plants at 5 weeks old under a long cycle photoperiod. (B) Western blot of levels of total Prx and overoxidized Prx (2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H) in 10  $\mu$ g of total leaf protein and levels of Srx in 20  $\mu$ g of total leaf protein from untreated plants and after 24 h or 48 h of 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (C) Fluorescence measurements ( $F_v/F_m$ ) and staining with DAB of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in leaves from untreated plants and treated for 24 h or 48 h with 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (D) Mutants grown on MS medium with 20 mM and 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

mutant lines lacking Srx increased stress tolerance and Baier *et al.* (2000) and Lamkemeyer *et al.* (2006) reported that plants with decreased levels of 2-Cys Prx and Prx Q, respectively, did not have an apparently different phenotype from WT at the plant level and that both lines had a decreased sensitivity to oxidants. Probably, these discrepancies may be related to the different growth conditions and oxidative treatments.

In order to gain additional insight into the response of  $\Delta$ Srx and  $\Delta$ Prx B to oxidative stress during germination, seedlings were grown in plates with MS medium and

kanamycin containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results showed that  $\Delta$ Prx B mutants were more sensitive than  $\Delta$ Srx at low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and that  $\Delta$ Srx plants were more sensitive than AtWT at high concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 9D). These results reveal that, although both enzymes are not essential for viability of the plant, they protect the chloroplast with some specificity depending on the intensity of the oxidative stress, so the role of Srx is crucial in critical situations to switch on the antioxidant pathway to regenerate the oxidative damage (Vivancos *et al.*, 2005).

## Conclusions

To our knowledge, this is the first systematic biochemical and functional characterization of plant Srx by a new and reliable colorimetric method based on the detection of inorganic phosphate. Biochemical studies show that AtSrx behaves as its mammalian counterparts in terms of kinetic parameters and capability to retroreduce the activity of other Prxs. However, site-directed mutagenesis and molecular modelling have revealed that, whereas in mammals, mutation of R51 leads to the inactivation of the enzyme, the equivalent mutation in AtSrx only reduces the activity and only the additional mutation of E76 abolishes it. This unique feature of plant Srxs suggests that the pair histidine–glutamic acid may be involved in the activation of C72 in the absence of R28. Functional studies in *Arabidopsis* of  $\Delta$ Srx and  $\Delta$ Prx B knock-out lines grown under a long photoperiod led to the detection of a phenotype variation that could suggest a regulatory role of the growth process of the sulphinic form of 2-Cys Prx B. Induction of oxidative stress shows that, as in yeasts, 2-Cys Prx in plants may regulate the expression of Srx and that, although Srx and Prx are not essential for plant viability, they protect against oxidative stress. Further works are ongoing to investigate the signalling role of the sulphinic form of 2-Cys Prx in eukaryotic cells.

## Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

**Supplementary Fig. S1.** Identification of mutants  $\Delta$ Prx and  $\Delta$ Srx.

**Supplementary Fig. S2.** Determination of the Srx amount into the chloroplast isolated from *Arabidopsis*.

## Acknowledgements

This work was supported by Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación (Project BFU2008-00745/BFI) and by Acción Integrada (Project HA2007-0077) between Spain and Germany. We would like to thank Joseph Ecker as the donor of the knock-out lines used in this work. We are grateful to the proteomic services of the University of Córdoba for the HPLC analysis and Dr M Barón's group for the help in measurements of  $F_v/F_m$ .

and DAB detection. FJLJ is indebted to Professor Santoyo for his support.

## References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Baginski ES, Epstein E, Zak B.** 1975. Review of phosphate methodologies. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **5**, 399–416.
- Baier M, Noctor G, Foyer CH, Dietz KJ.** 2000. Antisense suppression of 2-Cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiology* **124**, 823–832.
- Barranco-Medina S, Sakorin S, Lázaro JJ, Dietz KJ.** 2008. Thermodynamics of the dimmer-decamer transition of reduced human and plant 2-Cys peroxiredoxin. *Biochemistry* **47**, 7196–7204.
- Bernier-Villamor L, Navarro E, Sevilla F, Lázaro JJ.** 2004. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2191–2199.
- Biteau B, Labarre J, Toledano MB.** 2003. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**, 980–984.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Chae L, Sudat S, Dudoit S, Zhu T, Luan S.** 2009. Diverse transcriptional programs associated with environmental stress and hormones in the *Arabidopsis* receptor-like kinase gene family. *Molecular Plant* **2**, 84–107.
- Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG.** 2004. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulphinic acid in the active site to cysteine. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 50994–51001.
- Chen Jr. PS, Toribara TY, Wagner H.** 1956. Microdetermination in phosphorus. *Analytical Chemistry* **28**, 1756–1758.
- Chevallet M, Wagner E, Luche S, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T.** 2003. Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 37146–37153.
- Choi MH, Lee IK, Kim GW, et al.** 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* **435**, 347–353.
- Colovos C, Yeates TO.** 1993. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Science* **2**, 1511–1519.
- Combet C, Jambon M, Deléage G, Geourjon C.** 2002. Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* **18**, 213–214.
- Finkel T, Holbrook NJ.** 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247.
- Gawronski JD, Benson DR.** 2004. Microtiter assay for glutamine synthetase biosynthetic activity using inorganic phosphate detection. *Analytical Biochemistry* **327**, 114–118.
- Guex N, Peitsch MC.** 1996. Swiss-PDBViewer: a fast and easy-to-use PDB viewer for macintosh and PC. *Protein Data Bank Quarterly Newsletter* **77**, 7.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Ros-Barceló A, Sevilla F.** 2001. Antioxidant systems and O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of *Pisum sativum* L. leaves: its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**, 817–831.
- Jeong W, Park SJ, Chang TS, Lee DY, Rhee GS.** 2006. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulphinic acid of peroxiredoxin to cysteine sulphinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14400–14407.
- Jönsson TJ, Lowther WT.** 2007. The peroxiredoxin repair proteins. *Subcellular Biochemistry* **44**, 115–141.
- Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Lowther WT.** 2008a. Reduction of cysteine sulphinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulphinic phosphoryl ester intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 23846–23851.
- Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Poole LB, Lowther WT.** 2005. Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* **44**, 8634–8642.
- Jönsson TJ, Tsang AW, Lowther WT, Furdul CM.** 2008b. Identification of intact protein thiosulphinate intermediate in the reduction of cysteine sulphinic acid in peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22890–22894.
- Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH.** 2005. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine* **11**, 571–578.
- Kim H, Kim H, Hong S, Rhee SG, Jeong W.** 2009. A colorimetric assay for sulfiredoxin activity using inorganic phosphate measurement. *Analytical Biochemistry* **393**, 36–40.
- Klaunig JE, Kamendulis LM.** 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **44**, 239–267.
- König J, Baier M, Horing F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz K-J.** 2002. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 5738–5743.
- Kornberg A, Pricer Jr. WE.** 1951. Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 481–495.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**, 680–685.
- Lamkemeyer P, Laxa M, Collin V, et al.** 2006. Peroxiredoxin Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *The Plant Journal* **45**, 968–981.
- Lei K, Townsend DM, Tew KD.** 2008. Protein cysteine sulphinic acid reductase (sulfiredoxin) as a regulator of cell proliferation and drug response. *Oncogene* **27**, 4877–4887.
- Li H, Robertson AD, Jensen JH.** 2005. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pK<sub>a</sub> values. *Proteins* **61**, 704–721.

- Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, Wang DW. 2006. Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Research* **16**, 287–296.
- Lowther WT, Weissbach H, Etienne F, Brot N, Matthews BW. 2002. The mirrored methionine sulphoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nature Structural Biology* **9**, 348–352.
- Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**, 83–85.
- Noh YH, Baek JY, Jeong W, Rhee SG, Chang TS. 2009. Sulfiredoxin translocation into mitochondria plays a crucial role in reducing hyperoxidized peroxiredoxin III. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 8470–8477.
- Polgar L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **62**, 2161–2172.
- Rey P, Becuwe N, Barrault MB, Rumeau D, Havaux M, Biteau B, Toledano MB. 2007. The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulphinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. *The Plant Journal* **49**, 505–514.
- Rhee SG. 2006. Cell signalling.  $H_2O_2$ , a necessary evil for cell signalling. *Science* **312**, 1882–1883.
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP. 2002. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar. Protein–protein interaction and catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 13609–13614.
- Roussel X, Béchade G, Kriznik A, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, Rahuel-Clermont S. 2008. Evidence for the formation of a covalent thiosulphinic intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22371–22382.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smet ID, Voss U, Jürgens G, Beeckman T. 2009. Receptor-like kinases shape the plant. *Nature Cell Biology* **11**, 1166–1173.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. 1995. Requirement for generation of  $H_2O_2$  for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296–299.
- Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, Hidalgo E. 2005. A cysteine-sulphinic acid in peroxiredoxin regulates  $H_2O_2$ -sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 8875–8880.
- Wei Q, Jiang H, Matthews CP, Colburn NH. 2008. Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105**, 19738–19743.
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG. 2003a. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulphinic acid formation. *Science* **300**, 653–656.
- Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG. 2005. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 3125–3128.
- Woo HA, Kang SW, Kim HK, Yang KS, Chae HZ, Rhee SG. 2003b. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulphinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 47361–47364.
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemistry Science* **28**, 32–40.
- Yang KS, Kang WS, Woo AH, Hwang SH, Chae Z, Kim K, Rhee GS. 2002. Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulphinic acid. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 38029–38036.



---

## **The dual targeted plant Sulfiredoxin retroreduces the sulfinic form of atypical mitochondrial Peroxiredoxin**

Iván Iglesias-Baena<sup>1</sup>, Sergio Barranco-Medina<sup>1#</sup>, Francisca Sevilla<sup>2</sup> and Juan-José Lázaro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology of Plants. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-18008, Granada, Spain.

<sup>2</sup> Department of Stress Biology and Plant Pathology. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, E-30080, Murcia, Spain.

\* *Correspondence to:* Juan-José Lázaro, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology of Plants. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Profesor Albareda 1, E-18008, Granada, Spain. Tel. +34-958-181600. Fax: +34-958-129600. E-mail: [jjlazaro@eez.csic.es](mailto:jjlazaro@eez.csic.es)

**Running head:** Srx reduces Prx IIF-SO<sub>2</sub>H into mitochondria

This work was supported by Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia e Innovación (proyect BFU2008-00745/BFI) and by Acción Integrada (Project HA2007-0077) between Spain and Germany.

#*Sergio Barranco-Medina. Current address:* Department of Biochemistry and Molecular Biophysics. Washington University in Saint Louis, School of Medicine. 660 S. Euclid Ave. St. Louis, MO 63110. E-mail: [sbarranco-medina@biochem.wustl.edu](mailto:sbarranco-medina@biochem.wustl.edu)

\* *Correspondence to:* Juan-José Lázaro, Department of Biochemistry and Cellular and Molecular Biology of Plants. Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/ Profesor Albareda 1, E-18008, Granada, Spain. Tel. +34-958-181600. Fax: +34-958-129600. E-mail: [jjlazaro@eez.csic.es](mailto:jjlazaro@eez.csic.es)

### **Abstract**

Sulfiredoxin (Srx) couples the energy of ATP hydrolysis to the energetically unfavourable process of reducing the inactive sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxins (Prxs) to regenerate its active form. In plants, Srx as well as typical 2-Cys Prx have been considered as enzymes with exclusive chloroplast localization. This work explores the subcellular localization of Srx in *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*. Immunocytochemistry, analysis of protein extracts from isolated intact organelles, and cell free posttranslational import assays demonstrated that plant Srx also localizes to the mitochondrion in addition to plastids. The dual localization was in line with the prediction of a signal peptide for dual targeting. Activity tests and microcalorimetric data proved the interaction between Srx and its mitochondrial targets Prx IIF and thioredoxin *o* (Trxo). Srx catalysed the retroreduction of the inactive sulfinic form of atypical Prx IIF using Trxo as reducing agent. Arabidopsis Srx also reduced overoxidized human Prx V. These results suggest that plant Srx could play a crucial role in the regulation of Prx IIF activity by controlling its regeneration of overoxidized plant Prx in mitochondria which are sites of efficient ROS production in plants.

## **Introduction**

Peroxiredoxins (Prxs), non metal peroxidase enzymes, are considered the main regulators of the intracellular hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) concentration. These enzymes are implicated in both protection against oxidative stress and signalling pathways (Wood *et al.*, 2003). Within mammalian mitochondria, two different types of Prxs have been found: typical 2-Cys Prx (Prx III) and atypical 2-Cys Prx (Prx V). The first type is specifically localized in the mitochondria (Watabe *et al.*, 1997), while the second Prx has been reported in cytosol, peroxisome and nucleus as well (Rhee *et al.*, 2005). Human Prx III (hPrx III) has been described to protect cells against oxidative stress by removing mitochondrial  $H_2O_2$  (Chang *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2008) with thioredoxin 2 as electron donor (Lee *et al.*, 1999). These proteins are the most important defence against  $H_2O_2$  produced by the electron transport chain (ETC). Although not restricted to mitochondria, hPrx V is the other mitochondrial human Prx implicated in the protection of mitochondrial DNA against damage induced by  $H_2O_2$  (Banmeyer *et al.*, 2005).

The catalytic cycle for both types of Prxs consists of three steps: *i*) the nucleophilic attack of the peroxide by the conserved *peroxidatic cysteine* (Cys-S<sub>p</sub>H) that is oxidized to sulphenic acid (Cys-S<sub>p</sub>OH), *ii*) the formation of the disulphide by attack of the free thiol of the *resolving cysteine* to release water, and *iii*) the regeneration of the thiol form by an appropriate electron donor.

At high concentrations of  $H_2O_2$ , and due to the long time needed to form the disulphide bond (Yang *et al.*, 2002), the *peroxidatic cysteine* can be overoxidized to sulfinic acid form (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H), inactivating the enzyme. Although this overoxidation appears disadvantageous at first sight, Wood *et al.* (2003) ascribed a specific

function to the overoxidized form in controlling peroxide signalling in eukaryotic cells. According to this hypothesis, eukaryotic 2-Cys Prx modulates the cell response to intracellular peroxide by either efficiently decomposing it at low concentrations or by acting as a “floodgate” following hyperoxidation allowing local spreading of redox signals (Vivancos *et al.*, 2005).

Like cytosolic typical 2-Cys Prxs (hPrxs I-II), mitochondrial hPrx III can be overoxidized and inactivated to the sulfinic form (Cys-S<sub>p</sub>O<sub>2</sub>H) under oxidative stress (Cox *et al.*, 2009). The oxidation of the sulphenic to sulfinic acid was initially thought to be an irreversible modification (Yang *et al.*, 2002) until Woo and coworkers (2003) proved that the sulfinic form of Prx is reduced to the catalytically active thiol form (Cys-S<sub>p</sub>H). Biteau *et al.* (2003) confirmed that an ATP-dependent enzyme named sulfiredoxin (Srx) is able to reduce the overoxidized Prx in yeast. Although mammal Srx is a cytosolic enzyme, Woo *et al.* (2005) demonstrated that the sulfinic form of mitochondrial hPrx III could be reduced *in vitro* by hSrx. More recently Noh *et al.* (2009) reported the hSrx translocation from cytosol to mitochondria under oxidative stress conditions to reduce overoxidized hPrx III.

In *Arabidopsis thaliana*, the unique Srx gene (At1g31170) encodes a 14 kDa polypeptide that reduces the sulfinic form of 2-Cys Prx. Both proteins have been localized specifically within the chloroplast (Baier and Dietz, 1997; Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007) and a systematic biochemical characterization of plant Srx has been recently reported (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). Plant mitochondria only contain one type of Prx, Prx IIF (Finkemeier *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2007; Barranco-Medina *et al.*, 2007) which belongs to the atypical type II

Prx subfamily along with the human Prx V. Thus far, it has been considered that Srx reduces exclusively the sulfinic form of typical 2-Cys Prx (Woo *et al.*, 2005) and there is no reference involving Srx in the reduction of an atypical 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H.

The presence of Srx in mammalian mitochondria in response to oxidative stress (Noh *et al.*, 2009) and the importance of plant mitochondria as a significant site of ROS production encouraged us to investigate the presence of Srx in this organelle from plants and study the retroreduction of the atypical Prx IIF-SO<sub>2</sub>H. Moreover, it seemed to be a testable hypothesis that mitochondria contain their own constitutive pool of Srx for retroreduction of overoxidized Prx IIF, under physiological conditions, rather than depending on a slower translocation of Srx from the cytosol to the mitochondrion during oxidative stress.

The results from this work show that Srx from *Pisum sativum* (PsSrx) and *Arabidopsis thaliana* (AtSrx), in addition to the already known chloroplast localization, is also present in mitochondria regardless of the redox state. The mitochondrial Srx, together with the reductant TrxO, retroreduces the inactive sulfinic form of atypical Prx IIF employing a mechanism similar to that proposed for other Srxs (Jönsson *et al.*, 2008). This mechanism involves two binary complexes, namely Prx IIF-Srx and Srx-TrxO. In the current study these interactions were demonstrated with a multidisciplinary approach using biochemical, immunological and microcalorimetric techniques. Together, these data represent a first step toward the understanding of the role of Srx in regulation of mitochondrial peroxidase activity and signalling function.

## Results

### **Primary structure and mitochondrial prediction of PsSrx**

The pea *Srx* cDNA sequence isolated in our lab (GenBank accession GU223224) showed a high homology to other Srx enzymes of higher plants. The amino acid sequences of the mature protein were identical between PsSrx and AtSrx, while the comparison of the pre-proteins resulted in 90% identity. Bioinformatic analysis of the full length of PsSrx (133 amino acids), predicted a molecular mass of 14,539 D and a theoretical pI of 10.0. The 26 amino acids coding transit peptide located in the N-terminal region from PsSrx was obtained by 5'-RACE as described in *Material and Methods*. ChloroP and MitoProt bioinformatic programs predicted the subcellular localization, with a probability of 48% and 53% of targeting the preform to the chloroplast and mitochondrion, respectively. On the other hand, MultiLoc/TargetLoc program predicted a dual localization to both the chloroplast and mitochondrion with a probability of 97%. In addition, the transit peptide (MAASNFLQLPLRSFTVINVASASS) is rich in serine residues, deficient of glutamic acid, and has features typical for ambiguous targeting signals (Pujol *et al.*, 2007; Mitschke *et al.*, 2009).

AtSrx previously purified by Iglesias-Baena *et al.* (2010) contains an N-terminal signal peptide (MANLMMRLPISLRSFSVSASS) with features similar to that of PsSrx. ChloroP and MitoProt analysis of AtSrx again predicted a dual probability of 55% and 85% for chloroplast and mitochondria, respectively. MultiLoc/TargetLoc program showed a probability of 70% of chloroplastic/mitochondrial dual localization.

The mature protein from pea comprises 107 amino acids with a predicted molecular mass of 11,832 D and a theoretical pI of 9.9. PsSrx protein sequence presents the catalytic

cysteine in position 72 within a conserved peptide FG/SCHRY in plant Srxs (Liu *et al.*, 2006).

The cDNAs encoding the mature PsSrx and AtSrx preform were subcloned into expression vector, over-expressed as His-tagged recombinant proteins and purified as described in *Material and Methods*.

### **Chloroplastic and mitochondrial localization of Srx**

The presence of PsSrx in mitochondria was studied by immunocytochemistry with specific antibodies against sulfiredoxin in leaf sections from unstressed young plants (Figure 1). A similar number of gold particles were found in both chloroplasts and mitochondria. The labelling was also similar for its chloroplast target 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H. The absence of spots with preimmune serums used as control confirmed the specificity of the immunolocalization assay.

The presence of Srx was also investigated by immuno-blots with protein extracts from isolated chloroplasts and mitochondria from pea and *Arabidopsis* leaves under normal growth conditions using antibodies specific against Srx. Figure 2 shows the occurrence of PsSrx and AtSrx in both organelles. The low Srx amount in *Arabidopsis* may tentatively indicate a lower yield in the chloroplast and mitochondria extracts. Western blot shows the presence of a Srx dimer in chloroplasts and mitochondria of pea (without DDT) previously observed with recombinant enzyme (Iglesias-Baena *et al.*, 2010) (Figure 2A). To exclude significant contamination with chloroplastic constituents, the mitochondrial preparation was checked for the presence of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) which is exclusively present in this organelle at high levels (Figure 2B). This enzyme was detected in chloroplastic fractions but not in isolated mitochondria

confirming the purity of the mitochondrial preparations. A second control of purity using specific antibodies was achieved by the exclusive detection of Prx IIF and 2-Cys Prx in mitochondria and chloroplast, respectively (Figure 2C-D).

The suborganellar localization of Srx in mitochondria was studied in fractionated pea mitochondria. Western blot analysis of the membrane and soluble fraction revealed the presence of soluble PsSrx in mitochondrial matrix (Figure 2E), co-localized with PsPrx IIF.

As the next step, *in vitro* import of recombinant AtSrx preform was studied with isolated chloroplasts and mitochondria from *Arabidopsis thaliana* knock-out in Srx ( $\Delta$ Srx). The absence of Srx in this KO line ensures that the Srx found in the organelles after the import experiments must have an exogenous origin. The His-tagged version of the AtSrx preform (pAtSrx-His-tag) was used to enable a double detection with antibodies against both Srx and 6xHis-tag. Purified recombinant protein containing the signal peptide was incubated separately with chloroplasts and mitochondria and then with a mixture of both organelles. After incubation and extensive washing, chloroplasts and mitochondria were re-isolated and analyzed by Western blot with antibodies against 6xHis and Srx. Prx IIF and 2-Cys Prx were also detected with specific antibodies to test the purity of the chloroplast and mitochondria preparations, respectively. As depicted in Figure 3, Srx was detected in mitochondria and chloroplast after the import experiment. The molecular mass difference of about 2 kD observed between the preform and the imported form of Srx indicates the cleavage of the transit peptide of the Srx preform in the organelle. Due to the positive results with KO plants in Srx and also with WT plants (data not shown), we



used as negative control Srx without the transit peptide (His-tag-AtSrx mature protein) in the same conditions to discard an unspecific import.

### Retroreduction of sulfinic form of atypical Prx by Srx

The mitochondrial localization of plant Srx suggested that the sulfinic form of the atypical mitochondrial Prx IIF could be retroreduced by Srx in an ATP-dependent manner. To explore this possibility, we prepared overoxidized PsPrx IIF (PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H), checked its activity and determined its retroreduction by PsSrx. In order to test whether or not other type II Prxs from pea could be Srx targets, we also studied the reduction of the sulfinic form of cytosolic type II Prx (PsPrx IIC).

Recombinant atypical Prx IIF and Prx IIC from *Pisum sativum* were isolated and overoxidized to the sulfinic form by combining a incubation with DTT and then with high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment to regenerate the reduced form of the active site until complete conversion to Prx-SO<sub>2</sub>H. The formation of sulfinic species was monitored by AMS treatment (Biteau *et al.*, 2003) which alkylates cysteines only in the free SH-form and increases the molecular mass by about 0.5 kD per modified cysteine (Figure 4). Mass spectrometric analysis of the Prx-SO<sub>2</sub>H proteins following HPLC separation verified the identity of the overoxidized sulfinic forms of both proteins.

The DTT-dependent peroxidase assay was performed to assess the residual activity for the sulfinic forms of PsPrx IIF and PsPrx IIC. The activity decreased by about 80% for overoxidized PsPrx IIF and was negligible for overoxidized PsPrx IIC (Figure 5A) in comparison with the reduced forms. After 3 hours of retroreduction in the presence of PsSrx, DTT, ATP and Mg<sup>2+</sup>, the PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H restored total

peroxidase activity, while overoxidized Prx IIC remained inactive. This finding proves the ability of PsSrx to reduce only a certain kind of atypical Prx. Amino acid identity among atypical Prx IIF and Prx IIC from pea is only 31%. The question remains whether another enzyme retroreduces the overoxidized cytosolic PsPrx IIC as PsSrx proved itself incapable of doing so.

To address if plant Srx could develop a different mechanism than mammalian Srx, PsSrx was used for retroreduction of the sulfinic forms of hPrx I and hPrx V. After 3 hours, the inactive hPrx I-SO<sub>2</sub>H and hPrx V-SO<sub>2</sub>H recovered almost completely their peroxidase activity (Figure 5B).

### Characterization of plant Srx activity with mitochondrial Prx and Trx

The involvement of PsSrx in the retroreduction of PsPrx IIF led us to study the role of the mitochondrial PsTrxo in this process. Barranco-Medina *et al.* (2008b) demonstrated an *in vivo* interaction between PsPrx IIF and PsTrxo which implies a role of Trxo as physiological electron donor to Prx IIF. In addition to this role in the catalytic cycle of Prx IIF, Trxo could participate as reductant in the retroreduction of Prx IIF-SO<sub>2</sub>H by Srx. To address this question, the activity of PsSrx was explored with sulfinic forms of atypical PsPrx IIF and PsPrx IIC with and without PsTrxo as reductant.

In the absence of a reducing agent, a futile cycle of phosphorylation and dephosphorylation continuously hydrolyses ATP and releases P<sub>i</sub> at amounts higher than the concentration of Prx IIF-SO<sub>2</sub>H in the assay. The effect of ATP on the amount of P<sub>i</sub> released was assessed with 15 μM PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H and 5 μM PsSrx (Figure 6A). The P<sub>i</sub>-released in the presence of 250 μM or 1 mM ATP concentration saturated after 90 to 120

min amounted to 34  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$ , respectively, and indicated the activity of the futile cycle (Figure 6A). The  $\text{P}_i$ -released was negligible when PsPrx IIF-SH was added, confirming the requirement of the sulfinic moiety for Srx activity.

In presence of PsTrxO, the concentration of released phosphate was much lower and corresponded to the concentration of the sulfinic PsPrx IIF in the assay (15  $\mu\text{M}$ ) (Figure 6A). This indicates the suppression of the futile cycle due to efficient reductive regeneration of the PsPrx IIF thiol form. The results with TrxO resembled those with GSH as reductant (Figure 6B) suggesting that PsTrxO functions as the physiological reductant in retroreduction of PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H by PsSrx in mitochondria.

The release of phosphate was negligible when PsPrx IIC-SO<sub>2</sub>H was assayed (Figure 6B), confirming the absence of activity for the sulfinic form of cytosolic Prx IIC from pea. Mutation of C72S in AtSrx abolished the activity, underlining the critical role of its catalytic cysteine for the reduction of atypical PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H (Figure 6B).

In order to gain additional insight into the reaction mechanism, Srx activity was studied using sulfinic form of C84S-variant of PsPrx IIF (where the *resolving cysteine* was mutated to serine) as substrate (Figure 6B). This variant maintains only a partial peroxidase activity (Barranco-Medina *et al.*, 2007) and can also be converted to the sulfinic form of Prx IIF because the peroxidatic cysteine (Cys 59) is present. The rate and extent of  $\text{P}_i$  release at identical concentrations of Srx, ATP and sulfinic Prx were similar for Prx IIF-SO<sub>2</sub>H and C84S-Prx IIF-SO<sub>2</sub>H. This result indicates that unlike the peroxidase activity, the mutation of the resolving cysteine (Cys 84) does not modify the Srx activity in the futile cycle mode.

The kinetic parameters were determined by measuring the  $\text{P}_i$  released after 5 min of reaction and were similar to those published for human Srx (Chang *et al.*, 2004b; Jeong *et al.*, 2006) and AtSrx (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). The  $k_{\text{cat}}$  of PsSrx for Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H was 0.702  $\text{min}^{-1}$ . Likewise, the  $k_{\text{cat}}$  of PsSrx for the sulfinic form of PsPrx IIF was 0.195  $\text{min}^{-1}$ . These parameters reveal that plant Srx is more efficient for chloroplast 2-Cys Prx than for mitochondrial Prx IIF, but Srx is not an efficient enzyme for both mitochondrial and chloroplast Prxs-SO<sub>2</sub>H.

The enzyme kinetics of plant Srx were also determined during retroreduction of hPrx I-SO<sub>2</sub>H and hPrx V-SO<sub>2</sub>H (Figure 6C). Both human Prxs were retroreduced with similar kinetic constants. The C72S-AtSrx variant was used as a control and failed to reduce any sulfinic form.

The Srx activity towards atypical mitochondrial Prxs from pea and human was confirmed by competition assay (Figure 7). Reduction of the sulfinic form of typical Ps-2-Cys Prx and hPrx I was assessed in the presence of atypical PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H and hPrx V-SO<sub>2</sub>H, respectively, using the antibody specifically directed against overoxidized typical Prxs. The reduction rate of 2-Cys Prx dropped to 50% in presence of atypical Prx, indicating that AtSrx shares its activity between both Prx types.

### Interactions between proteins of the Srx/Prx/Trx system

For a better understanding of the function of the redox system in plant mitochondria, the interactions between Srx, Prx and Trx were investigated by qualitative and quantitative methods. The first set of experiments addressed the occurrence of binary complexes between Srx-Prx IIF, Srx-TrxO and Prx IIF-TrxO from

pea. The interaction between Srx and Prx IIF was addressed taking advantage of the histidine-tag in the N-terminal region of PsSrx. Ni-NTA-beads were incubated with or without His-tagged Srx. Then, as targets of Srx, overoxidized or reduced forms of Ps-2-Cys Prx or PsPrx IIF were added to the preloaded resin in the presence of ATP and  $Mg^{2+}$  in order to enable the Prx-Srx interaction. After extensive washing, proteins were eluted from the resin with imidazole and analyzed by non-reducing SDS-PAGE and Western blot analysis. The immunoblot revealed only the sulfinic form of both Prxs (Ps-2-Cys Prx and PsPrx IIF) bound to PsSrx in presence of ATP and  $Mg^{2+}$ , and the binding did not result in stable disulfide-heterocomplex because both proteins were resolved as separate proteins in non-reducing SDS-PAGE (Figure 8A-B).

The thermodynamics of Prx and Srx interactions were studied by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). 2-Cys Prx or Prx IIF in the ITC cell were titrated by injecting Srx. Table 1 summarizes the thermodynamic binding parameters. Binding of Srx with the sulfinic form of Prxs was driving by a negative  $\Delta G$  indicating a favourable process.

As shown above, PsSrx was active with the sulfinic form of PsPrx IIF in the presence of PsTrxo as reductant (Figure 6A). This reaction was studied in more detail by analyzing the interaction between Srx and Trxo. To this end, the C36S-Trxo variant was used where the resolving Cys in the Trx active site was replaced by Ser. This modification enabled the formation of an intermolecular disulphide bond between the catalytic Cys and the oxidized target. After the incubation of Srx with PsTrxo or C36S-PsTrxo, the proteins were separated by non-reducing SDS-PAGE and analyzed by Western blot with antibodies against Srx and Trxo. Both antibodies detected a protein band with apparent molecular mass of

26 kD (Figure 8C). Mass spectrometry analysis of this band confirmed the formation of the heterocomplex. This result showed that PsSrx and PsTrxo formed a mixed disulphide during retroreduction of the sulfinic form of PsPrx IIF. Such complexes were not detected when PsSrx was incubated with wild type PsTrxo since the presence of Cys36 resolved the intermolecular disulphide bridge between Srx and Trxo.

### **Role of AtSrx in the mitochondrial Prx IIF redox state**

To establish the redox link between Srx and Prx IIF under physiological conditions, Arabidopsis leaf extracts of a Srx knock-out line ( $\Delta Srx$ ) and wild type were analyzed by 2D-gel/immunoblots with antibodies against Prx IIF. Several spots of Prx IIF were revealed in the acidic fraction (Figure 9). Wild type plant extracts presented a single Prx IIF spot at pI of 6.3 corresponding to the reduced form of Prx IIF. However, analysis of  $\Delta Srx$  plant extracts for Prx IIF showed not only the spot at 6.3 but also another one at pI 5.9 corresponding to the oxidized Prx IIF (Barranco-Medina *et al.*, 2007). The spot to pI 4.9 is likely to represent the hyperoxidized form of Prx IIF, due to the fact that it is not reduced with DTT.

### **Discussion**

This paper describes features of plant Srx that add a new dimension to our understanding of the versatility of this Srx. It is shown that Srx from plants has a dual chloroplast and mitochondrial localization, can reduce the inactive sulfinic form of atypical plant Prx IIF and human Prx V, and interacts with its targets Trxo and Prx IIF.

Srx and its target 2-Cys Prx have been localized specifically in the chloroplast from Arabidopsis (Baier and Dietz, 1997; Liu *et al.*, 2006; Rey

*et al.*, 2007). However, *i*) the conditional mitochondrial localization in mammalia in response to oxidative stress (Noh *et al.*, 2009) and *ii*) the high probability of dual targeting to chloroplast and mitochondrion in pea predicted by our bioinformatic analysis, stimulated us to investigate the intracellular localization of Srx from *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana* in detail.

In this work we have demonstrated by several lines of evidence that plant Srx, in addition to its known chloroplast function, has a mitochondrial localization. A first sign of this dual localization was obtained by immunocytochemistry. The low density labelling was not surprising in the light of the low Srx concentration previously found in chloroplasts (Iglesias-Baena *et al.*, 2010), at similar levels of its chloroplastic target 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H and Srx in the mitochondria (Figure 1). Furthermore it must be noted that we used unstressed young plants even though Srx is mainly expressed in stressed and senescent plants ([www.geneinvestigator.com](http://www.geneinvestigator.com)). Our objective was to demonstrate the presence of Srx into plant mitochondria under physiological conditions, in contrast to human Srx (Noh *et al.*, 2009). The immunolocalization was also addressed by Western blots with isolated chloroplasts and mitochondria, reaching the conclusion that Srx has the same localization that its target Prx IIF (Finkemeier *et al.*, 2005; Barranco-Medina *et al.*, 2007). The occurrence of both enzymes in the mitochondrial matrix suggested that PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H could possibly be retroreduced by Srx.

The dual localization of Srx in plants adds a new feature to Srx function and thus differs from the results reported by Liu *et al.* (2006) and Rey *et al.* (2007). The first group deduced, for several plant Srxs, using ChloroP and TargetP programs, that Srx contains an N-terminal chloroplast transit peptide. AtSrx linked to GFP

fusion protein was only studied in chloroplasts (Liu *et al.*, 2006). Rey *et al.* (2007) also studied the subcellular localization of AtSrx by GFP fusion, in an heterologous system, and concluded that Srx from *Arabidopsis* is exclusively localized in plastids discarding its presence in mitochondria. GFP with about 27 kD is quite large as compared to the preform of Srx with 14 kD. Thus, GFP as fused tag may modify the targeting of the Srx protein e.g. by shifting the import ratio between chloroplast and mitochondrion to an exclusive plastid import. Mis-localization of GFP fusion markers might be due to the masking of targeting signals or impeding their insertion into the protein import complex and further translocation into the organelle. As this technique could have problems with the import of the protein to the mitochondrion, we decided to use the import assay described by Rudhe *et al.* (2002) that is specific for dual “in vitro” import. The efficiency of this method has been corroborated by comparison with other dual import methods (Bhushan *et al.*, 2007). After the import, Srx was detected in the chloroplasts and mitochondria with a molecular mass about 2 kD less than the preform, indicating the cleavage of the transit peptide. Moreover, the highly similar molecular mass of the processed mature protein in chloroplasts and mitochondria indicate a similar cleavage site in both organelles. We provide additional evidence that Srx contains a dual signal peptide which targets the enzyme to chloroplasts as well as to mitochondria with *in vitro* relative similar preference.

The previously reported exclusive chloroplast localization of Srx (Liu *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2007) coincided with the localization of its target, 2-Cys Prx. The mammalian Srx is a cytosolic protein. However, Srx translocates from cytosol to mitochondria in response to oxidative stress to retroreduce sulfinic form of

Prx III (Noh *et al.*, 2009). Prx III is a typical 2-Cys Prx in mitochondria of mammalia. The results from histochemical analysis, immunochemical detection of Srx in purified mitochondria, and cell-free import of Srx preform prove that plant mitochondria contain Srx regardless of its oxidative state. The presence of Srx in this organelle, a significant site of ROS production, could provide a system to regenerate inactive sulfinic form of Prx IIF. Further experiments were designed to address this hypothesis of a functional relationship between Srx and Prx IIF.

To date, the Srx activity has been linked exclusively to the retroreduction of typical Prxs. By 2D-analysis, Woo *et al.* (2005) reported that hSrx was unable to retroreduce the sulfinic form of hPrx V present in peroxisomes, cytosol, mitochondria and nucleus. A previous report indicated that plant Srx could deploy a different mechanism of retroreduction than mammalian Srx (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). In that respect we have demonstrated that plant Srx can reduce mitochondrial Prx IIF. Strikingly, in contrast to human Srx (Woo *et al.*, 2005), AtSrx regenerated the active thiol form from overoxidized human mitochondrial Prx V as well as the typical hPrx I. This clearly indicates that plant Srx can retroreduce a broader substrate spectrum than other Srxs described in the literature. The report of retroreduction of atypical PsPrx IIF and hPrx V by AtSrx opens the door to study novel potential Srx targets in the cell.

The tight interaction between PsPrx IIF and PsTrxo was recently characterized *in vitro* by use of recombinant proteins and *in situ* with extracts from isolated mitochondria (Barranco-Medina *et al.* 2008b) and by use of the C36S-Trxo variant (Martí *et al.*, 2009). We have analyzed Srx-Prx and Srx-Trxo interactions in order to demonstrate the catalytic

cycle in the reduction of the sulfinic form of Prx IIF. The results indicated that only the sulfinic form of Ps-2-Cys Prx and PsPrx IIF interacted with Srx to form a non-covalent complex. Such interactions have been reported neither for plant 2-Cys Prx nor for any atypical Prx. The first evidence for an interaction between plant Srx with Trx has been obtained in this work through the formation of a mixed disulfide between Srx and C36S-Trxo and by ITC characterizing thermodynamic values. Trx as reductant sustained Srx activity in yeast (Roussel *et al.*, 2008). Roussel *et al.* (2009) investigated the binary complex between oxidized monomeric Srx and Trx and suggested that differences in the recycling mechanism between yeast and mammals might be attributed to Cys (Cys48) which is present in yeast Srx but absent from mammalian Srx. As plant Srx lacks this additional Cys, the recycling mechanism is probably similar to that in mammals.

Exclusive visualization of oxidized mitochondrial Prx IIF in extracts of plants lacking Srx supports the dual targeting of Srx since the absence of Srx in the mitochondria provides a straight forward explanation for the accumulation of hyperoxidized Prx IIF.  $\Delta$ Srx plants have higher amounts of the inactive sulfinic form of 2-Cys Prx which indirectly disturbs the development of the plant mutant line with phenotypic differences (Iglesias-Baena *et al.*, 2010). However, antisense plants expressing low amounts of 2-Cys Prx show disturbances of the redox state only under severe deficiency (Baier *et al.*, 2000). Likewise increased oxidation state of 2-Cys Prx in plants lacking NTRC as a regenerator of 2-Cys Prx has little effect on plant development (Kirchsteiger *et al.*, 2009). Thus, hyperoxidation of Prx IIF triggered by redox imbalance of the chloroplast appears to provide a less likely causal relationship. The presence of plant Srx

in the mitochondria could play a role in the protection against inactivation of Prx IIF and in the equilibrium of ROS scavenging.

### **Conclusion**

In summary, this work describes novel features of plant Srx which localizes to the mitochondrion regardless of the cellular redox state where it is able to retroreduce the inactive sulfinic form of the atypical PsPrx IIF using Trx $o$  as electron donor. We have shown for the first time the relationship between the lacking of Srx in knock-out plants and increased levels of hyperoxidized forms of mitochondrial Prx IIF under physiological conditions. In this context, the reaction sequence proposed in Figure 10 of the Srx/Prx/Trx system, has been verified by pull-down assays and ITC of the different binary heterocomplexes. The presence of Srx in plant mitochondria adds new features concerning the role of Prx IIF in the equilibrium of ROS concentrations as well as the implication of these enzymes in signalling pathway.

### **Materials and methods**

#### **Plant material**

Pea seeds (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln) were germinated in moistened vermiculite arranged in plastic trays and grown for 14-21 days in a growth chamber to extract RNA, genomic DNA and protein. The plants were cultivated in a growth chamber for 11 days at a day/night cycle of 16/8 h, at 23/18 °C, respectively at a relative humidity between 50% and 60% and a photon flux density of 170  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  during the light phase.

*Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) plants were grown in a greenhouse with a 16 h light/8 h dark photoperiod, with 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ , 22°C/18°C (day/night) and a relative humidity of 55%. The mutant line

(SALK 015324) for *AtSrx*, corresponding to T-DNA insertion events, termed  $\Delta\text{Srx}$ , was characterized as described by Iglesias-Baena *et al.* (2010).

#### **Cloning and purification of recombinant proteins**

Total RNA was isolated from 3 g. of young leaves from pea (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln) using the phenol/SDS method (Sambrook *et al.*, 1989). The cDNA library was generated by RT-PCR using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) and oligo dT $_{20}$  as a primer.

The full-length coding *PsSrx* sequence (312 pb) which encodes the mature protein was amplified by PCR. Forward and reverse primers were designed for alignment with other plant Srxs with *Nco* I and *Bam*H I (Roche, Mannheim, Germany) restriction sites respectively (underline):

Srx-F (5'-  
CACCATGGACGGTTCGCCCGG  
TGAT-3'),

Srx-R (5'-  
TAAGGATCCATCTTCTCTGAGGT  
ACCAA-3').

The PCR cDNA encoding the mature protein (amino acids 23 to 125) was digested with *Hind* III and *Bam*H I, and cloned into pETM-11 expression vector (Novagen, Darmstadt, Germany).

The cDNA coding for the *AtSrx* preform (pAtSrx) containing the N-terminal signal peptide and a C-terminal His-tag as needed for import assays was obtained using forward primer pAtSrx-F (5'-  
TCTAGAATGGCGAATTTGATGAT  
G-3') with *Xba*I (Roche, Mannheim, Germany) restriction site (underline) and Srx-R as reverse primer.

PCR were performed at an annealing temperature of 55°C and the DNA products were gel-purified, cloned in pGEM-T (Promega, Madison, USA) and sequenced. The 5'-end was cloned by 5'-RACE. Two

PCR reactions were carried out using: *i*) primer Sr<sub>x</sub>-R and an oligo dT with a sequence in the 5'-end, and *ii*) a reverse primer complementary to this sequence and a homologous primer. Recombinant plasmids were verified by sequencing.

Expression and purification of His-tagged PsSr<sub>x</sub>, pAtSr<sub>x</sub>, AtSr<sub>x</sub> and C72S-AtSr<sub>x</sub> variant were performed as described by Iglesias-Baena *et al.* (2010).

Chloroplastic 2-Cys Prx from *Pisum sativum* (Ps-2-Cys Prx), mitochondrial PsPrx IIF and C84S-PsPrx IIF variant, mitochondrial PsTrx<sub>o</sub> and C36S-PsTrx<sub>o</sub> variant, and cytosolic Prx type II (PsPrx IIC) were cloned without His-tag, expressed and purified as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004), Barranco-Medina *et al.* (2006, 2007, 2008b) and Martí *et al.* (2009). The cytosolic and mitochondrial peroxiredoxins I and V from human (hPrx I and hPrx V) were obtained from Sigma-Aldrich (Germany) and AbFrontier (Seoul, Korea) respectively.

### Bioinformatic analysis

MitoProt (prediction of signal peptide) (Claros and Vincens, 1996), ChloroP (subcellular localization) (Small *et al.*, 2004) and MultiLoc/TargetLoc (dual protein targeting predictor) (Hoeglund *et al.*, 2006) were used for the analysis of the deduced amino acid sequences. The ClustalW program, provided by the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk>), was used for alignments.

### Immunocytochemistry

Leaf sections of 1 mm were cut from 14 day-old pea plants. These small leaf pieces were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde/0.05 M Na cacodylate buffer (pH 7.4) at 0°C for 2 h and washed three times, for 1 h each, in the above buffer. Afterwards the samples were dehydrated by

successive treatments with solutions containing increasing alcohol concentrations in the range 30-100% (v/v), and embedded in Unicryl resine. Ultrathin sections were obtained with a Reichert OM U2 ultramicrotome, and picked up on uncoated nickel grids.

Samples were immunolabeled with rabbit antiserum against Sr<sub>x</sub> and Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H diluted 1:50 and 1:150 respectively in albumin-containing Tris buffered saline (BSA/TBS) for 2 h. Grids were rinsed 5 times with TBS and incubated for 1 h with gold-conjugated (30 nm) anti-rabbit IgG (Sigma) at 1:200 dilution in BSA/TBS. Samples were counterstained with 0.1% (w/v) uranyl acetate (20 min) followed by 2% (w/v) lead citrate (1 min).

### Isolation of chloroplasts and mitochondria

Pea leaves (10 g) of 14 to 21 day-old seedlings were homogenized in an ice-cold buffer containing 300 mM sorbitol, 50 mM Mes-KOH (pH 6.5), 2 mM ascorbate, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Chloroplasts were purified on a Percoll gradient (König *et al.*, 2002) and resuspended in sorbitol buffer.

Mitochondria were isolated from pea leaves as described by Jiménez *et al.* (1997) with two rounds of Percoll gradient purification to obtain a highly pure mitochondrial fraction. Mitochondria were broken by sonication and matrix was separated from membranes by centrifugation at 100,000 x g.

### In vitro import assay

Mitochondrial and chloroplastic import experiments were carried out as described by Rudhe *et al.* (2002). Both intact organelles were isolated from Arabidopsis and tested separately and together in a dual import system with 30 μM of protein precursor (His-tagged pAtSr<sub>x</sub>) incubated during 20 min at 25°C with gentle agitation in a dual import buffer in a final volume of 100 mL (0.3 M

sucrose, 15 mM HEPES-KOH pH 7.4, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, 0.2% BSA, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM methionine, 4 mM ATP, 1 mM GTP, 0.2 mM ADP, 5 mM succinate, 4.5 mM DTT, 10 mM potassium acetate and 10 mM NaHCO<sub>3</sub>). After several washes of isolated organelles, import was analyzed by immuno-blot with specific antibodies.

### Overoxidation of Prxs

The sulfinic forms of Prxs (Prx-SO<sub>2</sub>H) were generated as described by Iglesias-Baena *et al.* (2010). The Prx-SO<sub>2</sub>H was checked by immuno-blot analysis after treatment with AMS with acrylamide concentrations of 17% (Biteau *et al.*, 2003).

### In vitro activity assays

The determination of the Srx activity by the spectrophotometric quantification of inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) was carried out as described by Iglesias-Baena *et al.* (2010).

Peroxide-dependent peroxidase activity of the recombinant Prxs were measured as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004).

### Polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis

Denaturing SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) with acrylamide concentrations of 6% (w/v, stacking gel) and 12.5% (resolving gel). Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

2D-PAGE was carried out in 11 cm IPG strips with a pH range of 4-7 (GE-Healthcare). Isoelectric focusing (IEF) was conducted using an IPGphor II system (Amersham Pharmacia Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Focused strips were equilibrated with 5 M urea, 2 M thiourea, 10 mM DTT, 2% SDS (w/v), 30% (v/v) glycerol, a dash of bromophenol blue in 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) for 10 min. The equilibrated strips were transferred to 12.5% SDS-

polyacrylamide gels and separated at 120 V. Afterwards the gels were subjected to Western blot analysis to visualise polypeptide spots.

For Western blot analysis, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Germany) by electroblotting. Immunoreaction was carried out with rabbit serum against mature Ps-2-Cys Prx, PsPrx IIF, PsTrxo and chloroplast FBPase, diluted 1:5,000, 1:3,000, 1:5,000 and 1:2,000, respectively, in PBSTA. Secondary antibodies were used as horseradish peroxidase-conjugates. The antibody against Srx was diluted 1:2,000 in PBSA and used with Alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, St. Louis, USA) as the secondary antibody, for membrane detection using NBT/BCIP solution (Roche, Mannheim, Germany) following the manufacturer's protocol. The commercial antibody anti-His<sub>6</sub>-Peroxidase (Roche, Germany) was diluted 1:2,000 in PBSTA during 2 h and was detected by chemiluminescence. Antibody against hyperoxidized Prx was provided by AbFrontier (Seoul, Korea) and diluted 1:2,000 in PBST containing 5% dried milk.

Antibodies against Ps-2-Cys Prx and PsPrx IIF were obtained as described by Bernier-Villamor *et al.* (2004), and Barranco-Medina *et al.* (2007) respectively. Antibodies against Srx peptide (CHRYEAHQKLGGLPTI) and Trxo C-terminal peptide (ARLNHITEKLFKKD) were generated by Abyntek (Vizcaya, Spain) and Sigma-Aldrich respectively.

### Pull-down assay

Pre-equilibrated nickel NTA-beads were incubated with or without His-tag PsSrx (200 µg) during 1 h at 4°C. Then, beads were centrifuged and supernatant was discarded. Over oxidized and reduced forms of Ps-2-Cys Prx or PsPrx IIF (200 µg) were incubated with the resin in presence of



1 mM ATP and 1 mM MgCl<sub>2</sub> at 4°C for 2 h. The suspension was transferred in a tube and washed 3 times with buffer containing 20 mM imidazole and cleared by centrifugation (1,000 x g). Finally, proteins were eluted with 500 mM imidazole and centrifuged, and the supernatant was analyzed by Western blot using the specific antibodies.

#### **Isothermal titration calorimetry (ITC)**

Prior to ITC experiments, proteins were extensively dialyzed against buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 100 mM NaCl at 4°C. All solutions were filtered through a 0.22 µm filter (Rothman) and degassed before titrations.

Isothermal titration calorimetry (ITC) was performed with a VP calorimeter (Microcal, Northampton, MA). Protein concentrations were measured by reading the absorbance at 280 nm (Nano-Drop system) and using specific extinction coefficients. The reference power was set to 10 µcal/s, and the cell content stirred at 286 rpm throughout the titrations at 25°C. After an initial 60 s delay, series of 1.6 µL of protein solution were injected into the cell at 3 min intervals to reach equilibrium after each injection. The first injection was an incomplete injection of 1 µL and was ignored during data analysis (Barranco-Medina *et al.*, 2008b). Data were analyzed using the software provided by MicroCal Systems (ORIGIN).

#### **Acknowledgements**

We thank Prof. K.J. Dietz (University of Bielefeld) for critical reading of the manuscript. We would like to thank A. Lázaro-Payo for his excellent technical assistance, Dr. T. Krell for the use of the ITC, Dr. A. Serrato for providing antibody against chloroplast FBPase and C. Allison for her comments. We are grateful to the

proteomic services of the IPBLN (CSIC) for the mass spectrometry analysis and to the microscopy services of the University of Granada for its helpful in immunolocalization assays.

#### **Literature cited**

**Baier M, Dietz KJ** (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J* **12**: 179-190

**Baier M, Noctor G, Foyer CH, Dietz KJ** (2000) Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in Arabidopsis specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. *Plant Physiol* **124**: 823-832

**Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoops B** (2005) Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **579**: 2327-2333

**Barranco-Medina S, Kakorin S, Lázaro JJ, Dietz KJ** (2008a) Thermodynamics of the dimer-decamer transition of reduced human and plant 2-Cys Peroxiredoxin. *Biochemistry* **47**: 7196-7204

**Barranco-Medina S, Krell T, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ, Dietz KJ** (2008b) Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *J Exp Bot* **59**: 3259-3269

**Barranco-Medina S, Krell T, Finkemeier I, Sevilla F, Lázaro JJ, Dietz KJ** (2007) Biochemical and molecular characterization of the

mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiol. Biochem* **45**: 729-739

**Barranco-Medina S, López-Jaramillo FJ, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro JJ** (2006) Cloning, overexpression, purification and preliminary crystallographic studies of a mitochondrial type II peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *Acta Crystallogr Sect F* **62**: 695-698

**Bernier-Villamor L, Navarro E, Sevilla F, Lázaro JJ** (2004) Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **55**: 2191-2199

**Biteau B, Labarre J, Toledano MB** (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**: 980-984

**Bhushan S, Pavlov PF, Rudhe C, Glaser E** (2007) In vitro and in vivo methods to study protein import into plant mitochondria. *Methods Mol Biol* **390**: 131-150

**Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG** (2004a) Peroxiredoxin III, a mitochondrion specific peroxidase, regulates apoptotic signalling by mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 41975-41984

**Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee, S.G.** (2004b) Characterization of mammalian Sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem* **279**: 50994-51001

**Claros MG, Vincens P** (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779-786

**Cox AG, Pearson AG, Pullar JM, Jönsson TJ, Lowther WT, Winterbourn CC, Hampton MB** (2009) Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. *Biochem J* **421**: 51-58

**Finkemeier I, Goodman M, Lankemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ** (2005) The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *J Biol Chem* **280**: 12168-12180

**Gama F, Keech O, Eymery F, Finkemeier I, Gelhaye E, Gardeström P, Dietz KJ, Rey P, Jacquot JP, Rouier N** (2007) The mitochondrial type II peroxiredoxin from poplar. *Physiol Plant* **129**: 196-206

**Hoeglund A, Doennes P, Blum T, Adolph HW, Kohlbacher O** (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs, and amino acid composition. *BMC Bioinformatics* **22**: 1158-1165

**Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lázaro-Payo A, López-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lázaro JJ** (2010) Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulfinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J Exp Bot* **61**: 1509-1521

**Jeong W, Park SJ, Chang TS, Lee DY, Rhee GS** (2006) Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. *J Biol Chem* **281**: 14400-14407

**Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione

cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* **114**: 275-284

**Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Lowther WT** (2008) Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. *J Biol Chem* **283**: 23846-23851

**Jönsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Poole LB, Lowther WT** (2005) Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxins by human sulfiredoxin. *Biochemistry* **44**: 8634-8642

**Kirchsteiger K, Pulido P, González M, Cejudo FJ** (2009) NADPH Thioredoxin reductase C controls the redox status of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **2**: 298-307

**König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz KJ** (2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5738-5743

**Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685

**Lee SR, Kim JR, Know KS, Yoon HW, Levine RL, Ginsburg A, Rhee SG** (1999) Molecular cloning and characterization of a mitochondrial selenocysteine-containing thioredoxin reductase from rat liver. *J Biol Chem* **274**: 4722-4734

**Li L, Shoji W, Oshima H, Obinata M, Fukumoto M, Kanno N** (2008) Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defence of mice. *FEBS Lett* **582**: 2431-2434

**Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, Wang DW** (2006) Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Res* **16**: 287-296

**Martí MC, Olmos E, Calvete JJ, Díaz I, Barranco-Medina S, Whelan J, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A** (2009) Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: Identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiol* **150**: 646-657

**Mitschke J, Fuss J, Blum T, Höglund A, Reski R, Kohlbacher O, Rensing SA** (2009) Prediction of dual protein targeting to plant organelles. *New Phytol* **183**: 224-235

**Noh YH, Baek JY, Jeong W, Rhee SG, Chang TS** (2009) Sulfiredoxin translocation into mitochondria plays a crucial role in reducing hyperoxidized peroxiredoxin III. *J Biol Chem* **284**: 8470-8477

**Pujol C, Maréchal-Drouard L, Duchêne AM** (2007) How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* **369**: 356-367

**Rey P, Becuwe N, Barrault MB, Rumeau D, Havaux M, Biteau B, Toledano MB** (2007) The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. *Plant J* **49**: 505-514

**Rhee SG, Chae HZ, Kim K** (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. *Free Radic Biol Med* **38**: 1543-1552

**Roussel X, Béchade G, Kriznik A, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, Rahuel-Clermont S** (2008) Evidence for the formation of a covalent thiosulfinate intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *J Biol Chem* **283**: 22371-22382

**Roussel X, Kriznik A, Richard C, Rahuel-Clermont S, Branlant G** (2009) The catalytic mechanism of sulfiredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* passes through an oxidized disulfide sulfiredoxin intermediate that is reduced by thioredoxin. *J Biol Chem* **284**: 33048-33055

**Rudhe C, Chew O, Whelan J, Glaser E** (2002) A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* **30**: 213-220

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

**Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C** (2004) Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4**: 581-590

**Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, Takahashi SY** (1997) SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* **249**: 52-60

**Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayté J, Toledano MB, Hidalgo E** (2005) A cysteine-sulfenic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8875-8880

**Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee**

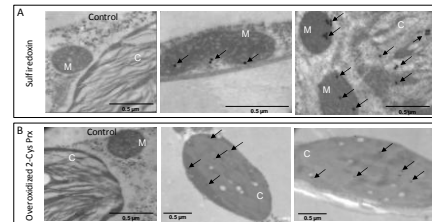
**SG** (2003) Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfenic acid formation. *Science* **300**: 653-656

**Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG** (2005) Reduction of cysteine sulfenic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J Biol Chem* **280**: 3125-3128

**Wood ZA, Poole LB, Karplus PA** (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signalling. *Science* **300**: 650-653

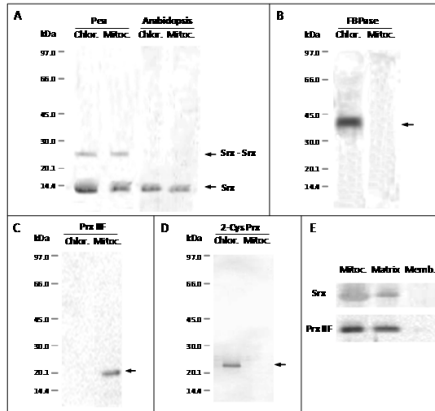
**Yang KS, Kang WS, Woo AH, Hwang SH, Chae Z, Kim K, Rhee GS** (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfenic acid. *J Biol Chem* **277**: 38029-38036

## Figures

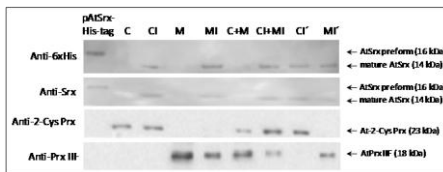


**Figure 1.** Subcellular localization of PsSrx and overoxidized 2-Cys Prx in plant. **A.** Immunocytochemical detection of PsSrx in mitochondria (M) and chloroplasts (C) of pea leaf cross sections using the polyclonal antibody against Srx. **B.** Immunocytochemical detection of 2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H in chloroplasts (C) of pea leaf cross sections using the polyclonal antibody against overoxidized Prx-SO<sub>2</sub>H. The preimmune serum of Srx and 2-Cys Prx were used as control (left panel).

Similar results were obtained in several analyses.



**Figure 2.** Chloroplastic and mitochondrial localization of plant Srx. SDS-PAGE of isolated chloroplast and mitochondria equivalent to 30  $\mu$ g protein from pea and Arabidopsis, and Western blot using specific antibodies against Srx (A), FBPase (B), PsPrxs IIF (C) and Ps-2-Cys Prx (D). Submitochondrial localization of PsSrx and PsPrx IIF (E).

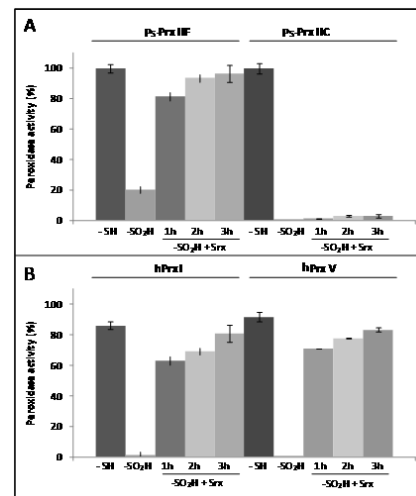


**Figure 3.** Dual import assay of pAtSrx to isolated chloroplasts and mitochondria from Arabidopsis KO in *Srx*. The recombinant preprotein from Arabidopsis (pAtSrx-His-tag) with signal peptide was imported to both chloroplasts (C) and mitochondria (M). Detection was carried out by Western blot using the specific antibodies against 6xHis-tag and Srx, and also against 2-Cys Prx and Prx IIF as control. Lanes: pAtSrx-His-tag, recombinant AtSrx not imported; C, chloroplasts before import; CI, chloroplasts after import; M,

mitochondria before import; MI, mitochondria after import; C+M, chloroplasts and mitochondria before import; CI+MI, mixture of chloroplasts and mitochondria after import; CI', isolated chloroplasts after import with mitochondria; MI', isolated mitochondria after import with chloroplasts.

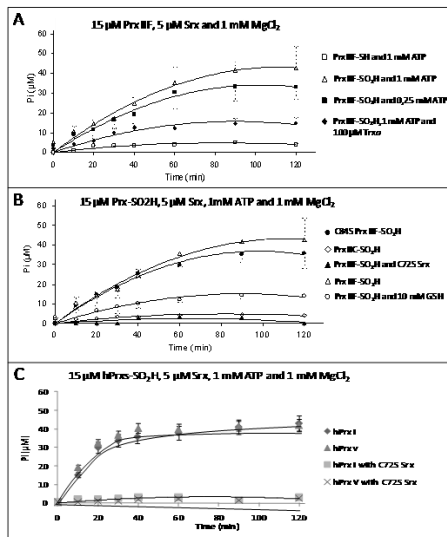


**Figure 4.** Assessment of the production of overoxidized forms of PsPrx IIF and PsPrx IIC. Purified PsPrx IIF and PsPrx IIC proteins were hyperoxidized and treated with AMS. After SDS-PAGE, reduced (linked to 2xAMS) and hyperoxidized (linked to 1xAMS) forms of PsPrx IIF (A) and PsPrx IIC (B) were visualized by silver staining. The reduced form of both Prxs without AMS was visualized as a control.

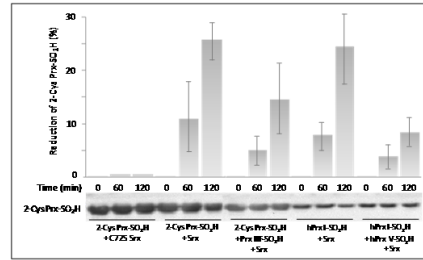


**Figure 5.** Srx-dependent recovery of peroxidase activity starting from sulfinic form of atypical Prxs. Retroreduction of PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H or PsPrx IIC-SO<sub>2</sub>H by PsSrx (A) and hPrx I-SO<sub>2</sub>H or hPrx V-SO<sub>2</sub>H (B) by wild type AtSrx. The reaction mixture

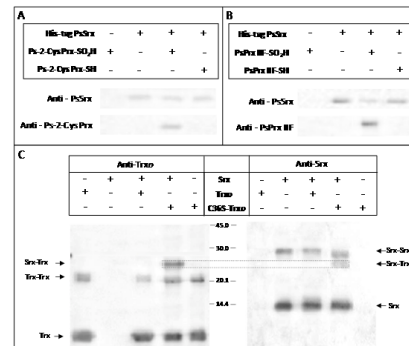
contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, 5 μM Prxs-SO<sub>2</sub>H and 1 μM Srx and was incubated at 30°C. At indicated time aliquots were withdrawn and peroxidase activities determined, as described in *Material and Methods*. Peroxidase activity of reduced Prxs (Prx-SH) and overoxidized Prxs (Prxs-SO<sub>2</sub>H) were also determined. Data are means ±SD from three determinations.



**Figure 6.** SrX enzymatic activity determined by quantification of released inorganic phosphate. **A.** Activities of sulfinic form of PsPrx IIF with 5 μM PsSrx, using different amounts of ATP and Prx (as indicated the legend) and PsTrx<sub>o</sub> as reducing agent. Reduced PsPrx IIF (Prx IIF-SH) was used as control. **B.** Activities of sulfinic form of PsPrx IIF and C86S-PsPrx IIF variant or PsPrx IIC were measured with 5 μM PsSrx or C72S-AtSrx variant (as control). **C.** Activities of 30 μM of sulfinic form of hPrx I or hPrx V with 5 μM AtSrx wild type or C72S-AtSrx variant (as control). Data are means ±SD from three determinations.

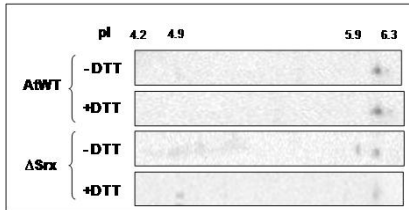


**Figure 7.** Competition assay for SrX-retroreduction of typical Prxs in presence of mitochondrial atypical Prxs. At the indicated times, aliquots were withdrawn containing the sulfinic form of Ps-2-Cys Prx-SO<sub>2</sub>H and hPrx I-SO<sub>2</sub>H in absence or presence of 10 μM of PsPrx IIF-SO<sub>2</sub>H and hPrx V-SO<sub>2</sub>H respectively, 5 μM PsSrx or AtSrx, 1 mM ATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM GSH. The C72S-AtSrx variant was used as control. The concentration of reduced Prx-SO<sub>2</sub>H was determined from the corresponding Western blot band intensity of independent experiments by image analysis.

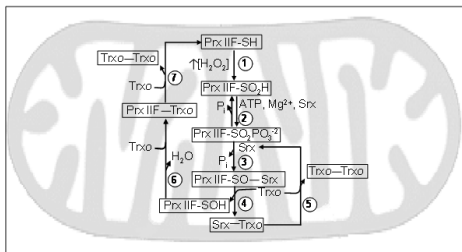


**Figure 8.** Characterization of the PsSrx-PsPrx IIF and PsSrx-PsTrx<sub>o</sub> interactions. Western blot analysis of the elution fractions from Ni-NTA sepharose using specific antibodies against Srx and 2-Cys Prx (**A**) or Prx IIF (**B**). Recombinant Prxs and Srx, and also reduced Prxs, from pea were loaded. **C.** Western blots against Trx<sub>o</sub> and Srx to confirm the interaction between both proteins using 20 μg of recombinant PsSrx (oxidized form with 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), PsTrx<sub>o</sub> or C36S-

PsTrxo variant. All three proteins were loaded alone in independent lanes as controls.



**Figure 9.** Redox state of Prx IIF in Srx mutant plants. Analysis by 2D-SDS-PAGE-immunoblot with antibodies against Prx IIF of 50 µg of leaf extract from *Arabidopsis thaliana* knock-out in Srx ( $\Delta$ Srx) versus wild type (AtWT).



**Figure 10.** Proposed catalytic cycle of Prx IIF overoxidation and regeneration. At high  $H_2O_2$  concentrations Prx IIF may be overoxidized to the inactive sulfinic form (Prx IIF-SO<sub>2</sub>H) (*step 1*) that is phosphorylated, through a reversible step, in the presence of Srx and ATP (*step 2*). The phosphoryl ester (Prx IIF-SO<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) converted into a thiosulphinate (Prx IIF-SO - S-Srx) and inorganic phosphate (P<sub>i</sub>) is released (*step 3*). A reducing agent, such as mitochondrial Trxo or GSH reduces the complex to release Prx IIF-SOH and Srx - Trxo (*step 4*). Srx - Trxo is subsequently reduced to Srx (*step 5*) by Trxo. The sulfenic form of Prx IIF is reduced by Trxo, releasing H<sub>2</sub>O, and to form the complex Prx IIF - Trxo (*step 6*) and the active Prx IIF-SH

is recycled by another Trxo (*step 7*) that form the dimer (Trxo - Trxo).

**Tables**

**Table 1.** Thermodynamic parameters of the interaction between Srx from *Arabidopsis thaliana* (AtSrx) or *Pisum sativum* (PsSrx) with PsTrxo and Prx (At-2-Cys Prx, Ps-2-Cys Prx and PsPrx IIF).

Syringe	Cell	T <sup>o</sup> (°C)	K <sub>d</sub> (µM)	ΔG (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔH (kCal mol <sup>-1</sup> )	ΔS (cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
AtSrx	At-2-Cys Prx-SH	25	-	3.67 ± 0.00	-3.01x10 <sup>5</sup>	-12.2 ± 1.4
	At-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	25	7.32 x 10 <sup>5</sup>	-7.99 ± 0.03	9.01 ± 0.51	57.0 ± 1.7
PsSrx	PsTrxo	25	2.88 x 10 <sup>5</sup>	-8.81 ± 0.06	-49.85 ± 0.63	-205 ± 2.1
	Ps-2-Cys Prx-SO <sub>2</sub> H	25	3.03 x 10 <sup>5</sup>	-8.84 ± 0.05	8.92 ± 0.99	59.6 ± 1.0
	PsPrx IIF-SH	25	-	4.16 ± 0.02	-2.50x10 <sup>5</sup>	-14.2 ± 1.5
	PsPrx IIF-SO <sub>2</sub> H	25	2.85 x 10 <sup>5</sup>	-8.80 ± 0.06	1.02 ± 0.06	33.0 ± 0.3







La función antioxidante de la 2-Cys peroxiredoxina (Prx) incluye la oxidación de su cisteína peroxidática conservada a ácido sulfénico, que es reducida por la tiorredoxina (Trx). En condiciones de estrés oxidativo, esta cisteína puede ser sobreoxidada a ácido sulfinico, inactivando su actividad peroxidasa con ganancia de actividad chaperona. Una enzima recientemente descubierta, llamada sulfiredoxina (Srx), reduce la forma sulfinica de la 2-Cys Prx (Prx-SO<sub>2</sub>H) en presencia de ATP, Mg<sup>2+</sup> y un tiol como agente reductor.

En plantas, la Srx así como la 2-Cys Prx, han sido consideradas exclusivamente enzimas cloroplastídicas. Teniendo en cuenta que las mitocondrias son también un lugar importante en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), decidimos investigar la presencia de Srx en este orgánulo de guisante y *A. thaliana*.

Para estudiar su función fisiológica en plantas, la Srx se ha donado, expresado y purificado. Se han obtenido, además, cinco mutantes mediante mutagénesis dirigida en aminoácidos implicados en su actividad. La actividad sulfiredoxina, determinada por un método nuevo, depende de la concentración de Prx-SO<sub>2</sub>H y ATP. Cuatro años después del descubrimiento de la Srx en plantas, este trabajo presenta la primera caracterización bioquímica sistemática del sistema Prx/Srx en vegetales y contribuye a un mejor conocimiento de su función fisiológica.

Se han estudiado, además, la interacción *in vitro* de la Srx con diferentes Prxs de plantas y humanas, así como el papel del sistema Prx-Trx en la defensa antioxidante en levadura, concretamente cepas de *S. pombe* sometidas a estrés oxidativo.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, han sido necesarias técnicas de bioquímica, biología molecular, proteómica y biofísica.

