

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN
(CSIC)



CARACTERIZACION BIOQUIMICA
Y MOLECULAR DE UNA
PEROXIRREDOXINA
MITOCONDRIAL DE *Pisum*
sativum

TESIS DOCTORAL

SERGIO BARRANCO MEDINA

2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (CSIC)



“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
MOLECULAR DE UNA
PEROXIRREDOXINA
MITOCONDRIAL DE *Pisum sativum*”

TESIS DOCTORAL

Sergio Barranco Medina
2006

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA
Y MOLECULAR DE UNA
PEROXIRREDOXINA
MITOCONDRIAL DE *Pisum sativum*”**

Memoria presentada por el Ldo. D°
Sergio Barranco Medina para aspirar al
grado de Doctor en Farmacia.

Granada, Septiembre de 2006

Fdo: Ldo. D° Sergio Barranco Medina

Juan José Lázaro Paniagua, Doctor en Farmacia, Investigador Científico de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEZ, CSIC) y Francisca Sevilla Valenzuela, Doctora en Ciencias, Profesora de Investigación del CEBAS del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que Don Sergio Barranco Medina ha realizado el trabajo de investigación titulado “Caracterización bioquímica y molecular de una peroxirredoxina mitocondrial de *Pisum sativum*” 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 C.S.I.C.

Dr. D. Juan José Lázaro Paniagua
Investigador Científico del C.S.I.C.

Granada, Septiembre de 2006.

El Trabajo que se presenta en esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido financiado por una beca predoctoral del Plan de formación de profesor universitario (FPU) del Ministerio de educación. Una parte del mismo ha sido realizada en el departamento de bioquímica de plantas de la universidad alemana de Bielefeld en un periodo de 12 meses.

AGRADECIMIENTOS

Es éste el momento de expresar mi gratitud a todas aquellas personas que en mayor o menor medida han contribuido a ver cumplido el sueño científico, la deseada meta de esta tesis, que no supone sino una etapa más en lo que espero sea mi carrera investigadora. A todos vosotros, por vuestro tiempo, apoyo, calma y entendimiento. También a aquéllos con los que intercambié una sonrisa en los pasillos.

Al Dr. Juan José Lázaro Paniagua, director de esta tesis, por haberme acogido en su grupo de investigación, por todo lo que científicamente he aprendido de él, por haberme permitido desarrollar mis ideas, por su confianza en todo momento, por sus mimos, por su humanidad. Él más que nadie merece mi agradecimiento. Que nuestra estrecha relación de amistad perdure con el tiempo será el mejor de los resultados de mi tesis.

A la Dra. Francisca Sevilla Valenzuela, codirectora de esta tesis quien desde Murcia siempre estuvo pendiente de todo lo que acontecía con mi trabajo en Granada.

A la Dra. María Dolores Suárez Ortega, tutora de doctorado, por haber despertado en mí la mística inquietud y pasión por la bioquímica en mis años de estudiante, por dirigir mis pasos desde la Facultad de Farmacia hasta la EEZ y por las numerosas ocasiones en las que fui invitado a su casa.

Al Dr. Karl Josef Dietz, por haberme aceptado en su grupo de investigación durante los 12 meses de mis estancias en la Universidad alemana de Bielefeld, por su dirección, apoyo y comprensión en todo momento.

Al Dr. Javier López Jaramillo, por su ayuda en el campo de la cristalización y por las largas discusiones científicas que hemos compartido a lo largo de esta tesis.

A la Dra. Laura Bernier Villamor por iniciarme en el laboratorio en la primera etapa de mi tesis, por su amistad hasta el día de hoy.

A la Dra. Mariam Sahrawy por facilitarme el banco de gDNA digerido y sus consejos en la búsqueda de las regiones promotoras.

A Francisca Castro por su buena asistencia técnica y por la convivencia a lo largo de estos cuatro fugaces años. A Iván, recientemente llegado al laboratorio, gracias por tu interés y por haberte brindado en tantas ocasiones.

Al Dr. Tino Krell, por su ayuda en los ensayos de calorimetría, por aceptar ser miembro del tribunal de mi tesis y por implicarse tan directa y positivamente en mi trabajo.

A José Ángel, ya doctor, por todo lo que hemos reído, por tantas veces como me ha ayudado con el ordenador, por nuestros sudores en las carreras de fondo, gracias y mucha suerte en París.

A Juande, por los buenos momentos de charlas y bromas de los que hemos disfrutado, eso sí, siempre en los ratos libres...

A Eloy, por aguantarme tantas bromas, tener siempre ese positivismo contagiante en su persona y por haberme animado tantas veces.

A Jesús, mi compi de fatigas del Granero y fiestas de guardar, por su ayuda científica en momentos clave, por su complicidad.

A la Dra. Matilde Barón Ayala, Mónica y Carlota, por el buen ambiente que siempre ha existido entre nosotros.

A todos los compañeros de laboratorio de la Universidad de Bielefeld, Dr. Vivek Pandei, Dr. Schanti Sharma, Dennis, Thorsten, Dra. Andrea Kandlwinder, Dra. Margarete Baier, Schanti, Frau Gayk, Miriam L., Miriam Hanitzsch., Elke, Oksoon, Isabelle, Simone Falko, Dr. Georgi, Dra. Iris Finkemeier, Petra, Tina, Peter, Aison y especialmente a Calisto, Pedro, Marie y Daniel. A Jehad y Vanesa a los que tanto admiro y extraño; no dejemos que la distancia rompa lo que con tanto cariño forjamos en Bielefeld, una amistad sincera.

A mis compañeros de almuerzo, tertulias *et al.*, que han hecho mucho más llevadero este trabajo: Fran, Emilio (Fireman), Cristina, Beatriz, Mamen, Carlos, Ana Domínguez, Soco, Pepe, María Jesús, Elena, Mari Carmen, José Carlos, Tesi, Chechu, Patri, Juan (one), Rebeca, Antonio Serrato, Cristina, Cintia, Irene, Beatriz, Raúl, Gloria, María Eugenia, Andreas, Cristina, Esther, África y especialmente a María, Quina, Patri y Amada a las que tengo un especial cariño.

A todas a aquellas personas que ya no están en el laboratorio, Corina, Morad, Álvaro, Abdel, Meli, Antonio, Manolo, Sol, Matías y especialmente a Carmen Nogueras por su bondad, cariño y sinceridad.

A Ana Vílchez, por ser la persona ajena a mi grupo que más se ha interesado por mi situación, por su forma de ser y por su amistad.

A la Dra. M^a Isabel Rodríguez , Dr. Juan de Dios Alche y a Conchita, por su valiosa colaboración con la microscopía electrónica.

A la Dra. Olga Martínez por su ayuda en la preparación de anticuerpos.

A mis compañeros y amigos de Facultad, Miguel, Mari Carmen, Jesús, Antonio Romero, Antonio Segura y Antonio Quirante por el interés que han mostrado a lo largo de mi tesis doctoral.

A mis hermanos Serafín y Mariola, por haberse interesado tanto por mi trabajo, por quererme como lo hacen y aceptarme como soy. A mis cuñados Alejandro y Loli, por ser como sois.

A mis sobrinos que quiero con locura, Alejandro, Sergio, Mariola y Alan. Vuestros besos y risas siempre me dieron fuerzas.

A mi abuela Dolores, quien sólo alcanzó ver el primer semestre de mi tesis, por todo el amor que me dio, por esa huella que dejó impresa en mi corazón.

A mis padres, quienes celebran mis éxitos como los suyos propios, por habérmelo dado todo en la vida, ilusión, amor, felicidad, ganas de vivir, afán de superación y un sin fin de dulces momentos. También vosotros habéis sufrido conmigo esta tesis. No existen palabras, ni moneda con la que pagaros. Mis apellidos son el mejor de cuantos títulos pueda obtener.

Y a Julia, el lujo de mi vida, por demostrarme cada día por qué te quiero tanto.

A todos, el placer ha sido mío...

A MI FAMILIA, Y A JULIA

Ora et labora

ÍNDICE

<u>ÍNDICE</u>	I
<u>ABREVIATURAS</u>	XV
<u>RESUMEN – SUMMARY</u>	XIX
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. TOXICIDAD DEL OXÍGENO	3
1.1. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO ACTIVADO	3
1.2. ACCIÓN BIVALENTE DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO ACTIVADO	7
2. PRODUCCIÓN DE ROS EN MITOCONDRIAS	10
3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	18
3.1. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS	19
3.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	20
<u>ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</u>	25
1. PEROXIRREDOXINAS	27
1.1. GENERALIDADES	27
2. PEROXIRREDOXINAS VEGETALES	32
3. PEROXIRREDOXINAS DE 2-CYS	32
3.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PRX DE 2-CYS	33
3.2. MECANISMO CATALÍTICO Y CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LAS PRX DE 2-CYS	34
3.3. ESTRUCTURA DE LAS PRX DE 2-CYS	39
3.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PRX DE 2-CYS	41

3.5. INACTIVACIÓN DE LAS PRX DE 2-CYS <i>IN VIVO</i> BAJO TRTAMIENTOS DE ESTRÉS	46
4. PEROXIRREDOXINAS DE TIPO II	48
4.1. GENERALIDADES	48
4.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PRX VEGETALES DE TIPO II.	50
4.3. MECANISMO CATALÍTICO Y CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LAS PRX DE TIPO II	52
4.4. ESTRUCTURA DE LAS PRX DE TIPO II	55
4.5. ESTRUCTURAS GÉNICAS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PRX DE TIPO II	62
4.6. FUNCIONES <i>IN VIVO</i> DE LAS PRX TIPO II	66
5. PEROXIRREDOXINAS DE 1-CYS	68
5.1. GENERALIDADES	68
6. PEROXIRREDOXINA Q	70
6.1. GENERALIDADES	70
7. TIORREDOXINAS	74
7.1. GENERALIDADES	74
7.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TIORREDOXINAS	77
7.3. TIORREDOXINAS MITOCONDRIALES	79
<u>OBJETIVOS - OBJETIVES</u>	81
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	89
MATERIALES	91
1. MATERIAL VEGETAL	91
2. ANIMALES	92
3. BACTERIAS	92

4. VECTORES PLASMÍDICOS	93
5. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y OTROS REACTIVOS RELACIONADOS	93
5.1. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO	93
5.2. ANTIBIÓTICOS Y OTROS COMPUESTOS RELACIONADOS	94
6. MARCADORES DE PESO MOLECULAR Y TAMPONES DE CARGA	94
6.1. DNA	95
6.2. RNA	95
6.3. PROTEÍNAS	96
7. CEBADORES	97
8. APARATAJE Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS	100
8.1 CULTIVOS BACTERIANOS	100
8.2. BIOLOGÍA MOLECULAR	100
8.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	100
8.4. CENTRÍFUGAS Y ROTORES	101
8.5. MATERIAL PARA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	101
8.6. MATERIAL PARA CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA	101
8.7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	102
METODOLOGÍA	103
1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	103
1.1 PROPAGACIÓN DNA PLASMÍDICO	103
1.1.1 Preparación de bacterias competentes	103
1.1.2. Transformación de bacterias competentes. Choque térmico	104
1.2. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	105
1.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico mediante kits comerciales	105

1.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico mediante lisis por ebullición	105
1.3. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA	106
1.4. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	108
1.5. PURIFICACIÓN DE DNA CON FENOL-CLOROFORMO	108
1.6. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE DNA	109
1.6.1. Reacciones de Ligación	109
1.6.2. Reacciones de digestión con enzimas de restricción	110
1.6.3. Reacciones de retrotranscripción. Obtención de cDNA	110
1.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	111
1.6.5. PCR sobre colonia	112
1.6.6. RT-PCR	112
1.6.7. RT-PCR semicuantitativa	113
1.6.8. Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5'RACE)	114
1.6.9. Mutagénesis dirigida	116
1.6.10. PCR Walking	118
1.6.11. Búsqueda de intrones PrxII F	120
1.6.12. Secuenciación de DNA	121
2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA y gDNA	121
2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDOS FOLIARES	121
2.1.1. Extracción de RNA total mediante el método del fenol-SDS	121
2.1.2. Extracción de RNA total con Trizol	123
2.2. EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO	123
2.3. CUANTIFICACIÓN DE RNA	124
2.4. ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DE AGAROSA	125
2.5. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO (gDNA)	126
3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	126
3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	126
3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO	126

3.3. ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS	127
3.4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO BIDIMENSIONAL	129
3.4.1. Preparación de la muestra	129
3.4.2. Primera dimensión (IEF) en tiras con gradiente de pH inmovilizado	129
3.4.3. Segunda dimensión	130
3.5. TINCIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	130
3.5.1. Tinción de plata	131
3.5.2. Tinción con Azul Coomassie	132
3.6. SECADO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA	132
3.7. SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS	132
3.7.1. Digestión trípica y huella peptídica	133
3.7.2. Secuenciación de iones	133
3.8. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL	134
4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	134
4.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>E coli</i>	134
4.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	136
4.2.1. Purificación de la PrxII F y mutantes recombinantes	136
4.2.2. Purificación de la Trx 02 recombinante	137
5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS	138
5.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	138
5.2. ELISA	138
5.3. WESTERN BLOT	140
5.3.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	140
5.3.2. Hibridación y análisis de blots de proteínas	141
5.4. INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	142
5.4.1. Preparación del tejido	142

5.4.2. Inmunolocalización	142
6. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	143
6.1. ENSAYO DE PROTECCIÓN DE DNA	143
6.2. ACTIVIDAD PEROXIDASA DEPENDIENTE DE DTT	144
7. MICROCALORIMETRÍA	145
8. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS TIOL	147
9. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL REDOX	148
10. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS	149
11. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DEL TRIPTÓFANO	151
12. ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	151
12.1. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO	151
13. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PRXII F RECOMBINANTE	152
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	154
<u>RESULTADOS</u>	157
1. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA LA PRXII F DE <i>P.sativum</i>	159
2. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	164
3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	167
4. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES C59S Y C84S	172
5. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA LA TRX MITOCONDRIAL DE <i>P. sativum</i>	173
6. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA TRX O2 DE <i>P. sativum</i>	177

7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PRXII F, PROTEÍNAS MUTANTES Y TRX O2 DE <i>P. sativum</i>	179
7.1. CLONADO DEL GEN DE LA PRXII F, MUTANTES Y TRX O2 EN EL VECTOR pET-3d Y SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	179
7.2. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE LA PRXII F, C59S, C84S Y TRX O2 RECOMBINANTES MADURAS	181
7.2.1. Purificación de las proteínas PrxII F, C59S y C84S	181
7.2.2. Purificación de la Trx O2	184
8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA PRXII F Y TRX O2 DE <i>P. sativum</i> MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL	186
9. FACTORES QUE AFECTAN A LA OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i> Y ESTUDIO COMPARATIVO CON LAS PROTEÍNAS MUTANTES C59S Y C84S	194
9.1. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA	194
9.2. EFECTO DEL ESTADO REDOX	195
9.3. EFECTO DEL pH	197
10. ESTUDIO PORMENORIZADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE	200
11. ELECTROMOVILIDAD DE LA PRXII F MADURA RECOMBINANTE	203
12. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	204
13. COMPORTAMIENTO DE LA PRXII F NATIVA DE <i>P. sativum</i> EN GELES SDS-PAGE	205

14. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PRXII F MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	206
15. LOCALIZACIÓN SUB-SUB-CELULAR DE LA PRXII F	208
16. RECONOCIMIENTO PRXII F – ANTICUERPO MEDIANTE MICROTERMOCALORIMETRÍA	209
17. UNIÓN DE LA PRXII F OXIDADA A LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES	211
18. PROTECCIÓN DE DNA FRENTE A ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO	212
19. ACTIVIDAD PEROXIDASA	213
19.1. ACTIVIDAD PEROXIDASA DEPENDIENTE DE DTT	214
19.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA PRXII F PARA LA ELIMINACIÓN DEL H₂O₂	215
20. DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES REDOX DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	217
21. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS SULFIDRILLO PRESENTES EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRXII F, C59S Y C84S	218
22. ESTUDIO DE LA PRXII F MEDIANTE TÉCNICAS BIDIMENSIONALES	219
23. EFECTO DEL ESTRÉS FÍSICO Y QUÍMICO SOBRE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	222
24. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O₂	224
24.1. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O₂ DETERMINADA MEDIANTE MICROTERMOCALORIMETRÍA (ITC) Y FILTRACIÓN EN GEL	225

24.2. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O2 MEDIANTE FILTRACIÓN MOLECULAR DE MATRICES MITOCONDRIALES Y POSTERIOR ANÁLISIS POR ELISA	230
25. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MEDIANTE FLUORIMETRÍA	232
26. CRISTALIZACIÓN DE LA PRXII F RECOMBINANTE DE <i>P. sativum</i>	233
<u>DISCUSIÓN</u>	237
1. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA LA PRXII F DE <i>P. sativum</i> Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA	239
2. AISLAMIENTO DEL PROMOTOR Y DE LA REGIÓN INTRÓNICA-EXÓNICA DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	242
3. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PRXII F RECOMBINANTE MADURA Y MUTANTES C59S y C84S	244
4. AISLAMIENTO DE UNA TRX MITOCONDRIAL DE <i>P. Sativum</i>	246
5. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA TRX O2 RECOMBINANTE	248
6. ESTADOS DE OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F DE <i>P. Sativum</i>	249
7. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI PRXII F Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	254
8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i>	256
9. COMOPORTAMIENTO DE LA PRXII F EN GELES BIDIMENSIONALES	260

10. REGULACIÓN REDOX DE LA EXPRESIÓN DE LA PRXII F DE <i>P. sativum</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO	263
11. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O₂	265
12. UNIÓN DE LA PRXII F OXIDADA A LA MEMBRANA MITOCONDRIAL	268
13. CRISTALIZACIÓN DE LA PrxII F DE <i>P. sativum</i>	269
<u>CONCLUSIONES - CONCLUSIONS</u>	280
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	283

ABREVIATURAS.

A	Absorbancia (densidad óptica)
Aa	Aminoácido
Apx	Ascorbato peroxidasa
Á	Amstrong
cDNA	DNA complementario
Cys	Cisteína
C59S	Peroxirredoxina mutada en la cisteína 59
C84S	Peroxirredoxina mutada en la cisteína 84
Δ	Incremento
ΔG	Energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio de entalpía
ΔS	Cambio de entropía
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Mezcla de nucleósidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
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
Fd	Ferredoxina
FPLC	Cromatografía rápida de proteínas

gDNA	Ácidos desoxirribonucleico genómico
GFP	Proteína verde fluorescente
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GSHR	Glutación reductasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Ig G	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
ITC	Microcalorimetría
K_a	Constante de asociación
Kb	Kilobases
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis Menten
M	Molar
MDHR	Monodehidroascorbato reductasa
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD/NADH	Nicotinamín adenín dinucleótido
NFκβ	Receptor nuclear κβ.
nm	Nanómetro
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén glycol
pI	Punto isoelectrico
PRK	Fosforribulokinasa
Prx	Peroxirredoxina
p/v	Peso/volumen
PS	Fotosistema

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto.
rRNA	RNA ribosómico.
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida con SDS
SOD	Superóxidodismutasa
Srx	Sulfirredoxina
RACE	Amplificación rápida de extremos de cDNA
TAE	Tampón Tris-ácido acético-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TBHP	Tert-butilhidroperóxido
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tpx	Tiorredoxín peroxidasa
TR	Tiorredoxín reductasa
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
Trx	Tiorredoxina
TSA	Antioxidante específico de tioles
UE	Unidad enzimática
UTR	Región no traducida.
V	Voltio
v/v	Volumen/volumen

RESUMEN – SUMMARY

RESUMEN

La mitocondria es una organela sumamente activa en la célula eucariótica, donde las especies de oxígeno reactivo (ROS) son generadas en cantidades significativas, en particular en el contexto de la actividad respiratoria de la cadena de transporte electrónico (ETC). Los lugares principales de producción de ROS son el complejo I y complejo III de la ETC. Las mitocondrias contienen un juego de enzimas antioxidantes cuya función es la de descomponer los ROS; entre ellas se encuentran la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión peroxidasa y Glutatión reductasa. Ahora además existen pruebas de que la peroxirredoxina mitocondrial de *Arabidopsis* juega un papel importante en la mencionada defensa antioxidante.

Las peroxirredoxinas (Prx) reducen el peróxido de hidrógeno y alquilhidroperóxidos hasta el alcohol correspondiente y agua. Estas enzimas pertenecen a la familia de las peroxidases que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos y de las que existen en múltiples isoformas. Las Prx son peroxidases dependientes de tiol en cuya secuencia N-terminal existe al menos una cisteína conservada que reacciona con los sustratos de peróxido. En plantas se distinguen cuatro subgrupos de Prx en función del número y posición de los residuos conservados de cisteína: Prx de 2-Cys, Prx tipo II, Prx Q y Prx de 1-Cys.

Diez años después del descubrimiento de las Prx en plantas, este trabajo presenta la caracterización de la PrxII F mitocondrial de guisante, su secuencia genómica y aminoacídica, propiedades bioquímicas y estados de oxidación analizados por geles bidimensionales, su expresión en respuesta a frío, NaCl y Cd₂Cl₂, propiedades de oligomerización e interacción con una Trx O₂ mitocondrial de guisante.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral han sido necesarias técnicas de bioquímica, biología molecular, proteómica, biofísica y cristalografía.

SUMMARY

The mitochondrion is a metabolically highly active organelle of the eukaryotic cell where reactive oxygen species (ROS) are generated at significant rates particularly in context of the respiratory electron transport activity. The main sites of ROS production are the complex I and the complex III of the mitochondrial electron transport chain (ETC). Mitochondria contain a set of ROS decomposing antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. There is now evidence from *Arabidopsis thaliana* that a mitochondrial peroxiredoxin (Prx) plays an important role in this antioxidant defence.

Peroxiredoxins (Prx-s) reduce hydrogen- and alkylhydro-peroxides to the corresponding alcohol and water. These enzymes belong to the family of peroxidases which are found in all organisms and which exist in multiple isoforms. Prx-s are thiol-based peroxidases which in their N-terminal part possess at least one conserved cysteine that reacts with the peroxide substrates. In plants, four Prx subgroups can be distinguished based on the number and position of the conserved cysteine residues, namely 2-Cys Prx, type II Prx, Prx Q and 1-Cys Prx.

Ten years after the discovery of Prx in plants this work presents the characterization of the mitochondrial pea PrxII F, including the determination of DNA and protein sequences, its biochemical properties and oxidation states as analyzed by two-dimensional gel separations. Furthermore its expression in response to cold, NaCl and Cd₂Cl stress is studied as well as its oligomerisation state and interaction with a mitochondrial Trx O₂ from pea.

In this thesis a multidisciplinary approach has been employed consisting primarily in biochemical, molecular biological, proteomic, biophysics and crystallographic studies.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. TOXICIDAD DEL OXÍGENO

1.1. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO ACTIVADO

La multiplicidad de funciones desempeñadas por el O₂ en el metabolismo es un reflejo de su bioquímica tan característica. La reducción de O₂ a agua proporciona la energía que permite la impresionante complejidad de los organismos superiores pero su reducción es una ventaja algo confusa. Cuando la reducción no es completa, la consecuencia inevitable de metabolismo aeróbico es la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS), que pueden ser extremadamente reactivas, de manera que son capaces de reaccionar y dañar moléculas biológicas como DNA, proteínas y lípidos. Por esto, la producción y eliminación de ROS debe estar estrictamente controlada (Ritcher and Schweizer, 1997).

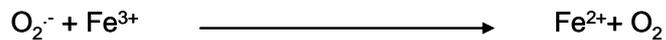
La reducción del O₂ molecular se desarrolla en cuatro pasos, esquematizados en la figura 1, con la consiguiente generación de varias especies radicales de O₂ (Hippeli *et al.*, 1999). La cadena de reacción requiere la iniciación del primer paso, mientras que los siguientes pasos son exotérmicos y por lo tanto pueden desarrollarse espontáneamente, tanto mediante catalizadores como sin ellos. Las especies de oxígeno activado producido en estas reacciones parciales presentan una elevada diversidad en cuanto a su reactividad pero son menos estables que el O₂ o el agua (Foyer and Noctor, 2000).

El primer paso en la reducción del O₂ produce ROS con una vida relativamente corta y que no pueden difundir fácilmente: perhidroxilo (HO₂[·]) y superóxido (O₂^{·-}), que se encuentra en solución en equilibrio con su forma protonada, el radical perhidroxilo. El tiempo de vida medio para el superóxido es

aproximadamente de 2-4 μ s (Smirnov, 1993). Estos radicales superóxido son altamente reactivos, formando hidroperóxidos con compuestos eno y dieno, incluso siendo capaces de oxidar aminoácidos específicos, tales como histidina, metionina y triptófano y de provocar la peroxidación lipídica en las membranas celulares (Knox and Dodge, 1985).

El segundo estadio de reducción del O_2 genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cuya vida media es más larga (1 ms) y además puede difundir desde su lugar de producción (Willekens *et al.*, 1997). Uno de los efectos nocivos en los que radica la toxicidad biológica del H_2O_2 es 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 la reacción de Haber-Weiss (1934) el radical $O_2^{\cdot -}$ puede llevar a cabo la descomposición de peróxido de hidrógeno formando el radical OH^{\cdot} (2). Esta reacción está catalizada por trazas de Fe^{+3} o Cu^{+2} y en realidad está constituida por dos semirreacciones (1) (Halliwell and Gutteridge, 1999).



La última especie generada por esta serie de reducciones es el radical hidroxilo (OH \cdot), uno de los oxidantes más poderosos que se conocen y cuya vida media es menor de 1 μ s, resultando en una mayor afinidad por moléculas biológicas en su sitio de producción y reaccionando a una velocidad prácticamente controlada por difusión. Así ejerce su efecto nocivo mediante tres mecanismos: la inactivación de enzimas (por oxidación de grupos SH o cambios en el estado redox de los metales de los centros activos), la hidroxilación de compuestos aromáticos (como las bases del DNA provocando rupturas de cadenas y mutaciones) y a la peroxidación de lípidos de membrana (alterando su funcionalidad con producción de hidroperóxidos) (Dat *et al.*, 2000).

Los ROS producidos por la reacción de Haber-Weiss pueden además reaccionar entre ellos y generar una tercera serie de ROS, aún más tóxicos que los otros dos. De manera similar, el O $_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con otras moléculas como ocurre con los peróxidos lipídicos. También es capaz de reaccionar con óxido nítrico, conduciendo a la formación de peroxinitrito, especie considerada menos reactiva que los peróxidos (Belligni and Lamattina, 1999). Estas reacciones dependen de la concentración y de la capacidad de eliminación de la propia célula. Las plantas pueden favorecer la formación de unas u otras especies por la eliminación preferencial del H $_2$ O $_2$ con antioxidantes o, por el contrario, acumular H $_2$ O $_2$ mediante la activación de la superóxido dismutasa. Por otra parte, la acumulación de H $_2$ O $_2$ puede conducir a una producción mayor de ROS. Además de una posible función directa del H $_2$ O $_2$ en la activación de las oxidasas dependientes NAD(P)H, se ha sugerido que el H $_2$ O $_2$ por sí mismo es capaz de estimular la acumulación de ROS (Rao *et al.*, 1999).

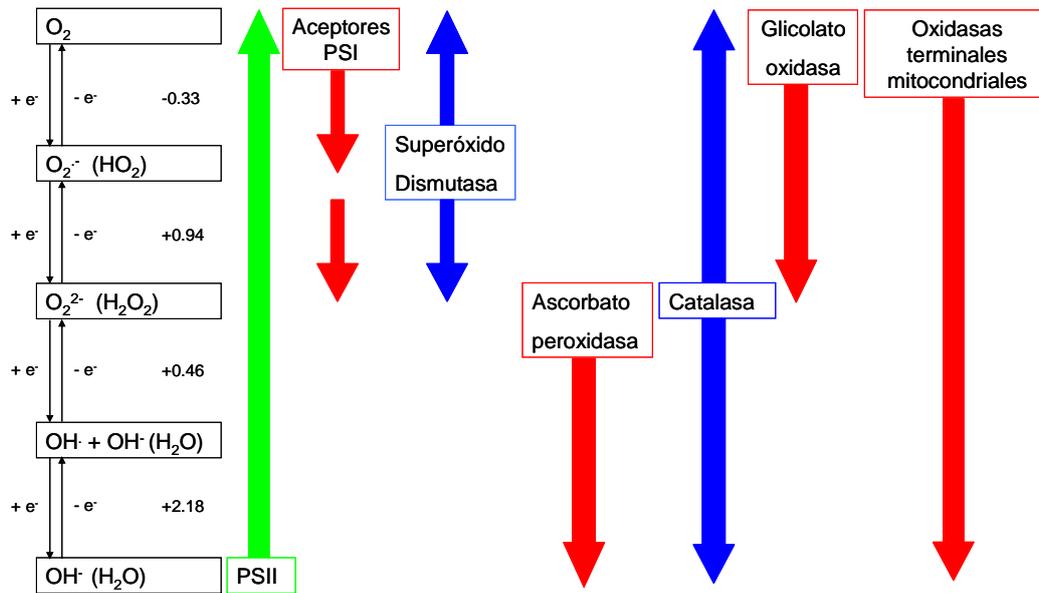


Figura1. Reacciones de interconversión de O_2 y agua y formación de especies de oxígeno activado en células fotosintéticas. Las formas protonadas de los aniones se muestran entre paréntesis. Los valores numéricos representan los potenciales redox aproximados. El potencial redox (por electrón) para la interconversión tetravalente de oxígeno y agua es aproximadamente de +0.81 V. Las flechas muestran algunas de las numerosas reacciones de las especies de oxígeno. Las especies de oxígeno que actúan como sustrato en cada reacción se indican recuadradas en posición vertical. La oxidación del agua se indica en verde, las reacciones de disociación se muestran en azul y las reacciones que implican la transferencia neta de electrones al oxígeno en rojo (Foyer and Noctor, 2000).

1.2. ACCIÓN BIVALENTE DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO ACTIVADO

Existen un elevado número de autores que argumentan sustancialmente que los ROS ocasionan efectos muy perjudiciales a los sistemas biológicos durante el estrés abiótico o biótico. Sin embargo, cada vez está cobrando más importancia la función de estos ROS como moléculas implicadas en los procesos de señalización celular actuando como mensajeros secundarios por lo que se sugiere una función doble muy importante para estas moléculas.

Así, se entiende que las especies de oxígeno reactivo y los peróxidos tienen un doble papel en el metabolismo. Por una parte son altamente tóxicos y deben estar perfectamente controlados (Noctor and Foyer, 1998), y, por otro lado, sirven como sustratos en el metabolismo y como señales de regulación (Foyer and Noctor, 2000).

Aunque cada vez se conoce más sobre las distintas señales de respuesta de las plantas frente al estrés, se sabe muy poco acerca del modo de acción del H_2O_2 (Bolwell, 1999). En *E. coli* se comprobó que el H_2O_2 a bajas concentraciones es capaz de funcionar como segundo mensajero pero a altas concentraciones puede ser fitotóxico (Greemberg *et al.*, 1990). Investigaciones más antiguas en el campo de la patogénesis defendían una función señalizadora para los ROS durante las interacciones planta-patógeno. En años recientes se ha obtenido la inducción específica de respuestas de defensa por tratamientos con H_2O_2 , lo cual corrobora la idea de que el H_2O_2 regula directamente estas respuestas (Dat *et al.*, 2000).

Levine *et al.* (1994) fueron los primeros en demostrar la inducción de genes en plantas por H_2O_2 ; concretamente provocaron la inducción específica de glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa (GPX y GST) por la incubación de cultivos celulares de soja con 2 mM de H_2O_2 y comprobaron que el H_2O_2 era capaz de atravesar las membranas celulares y difundir a otros compartimentos celulares.

El uso de la tecnología transgénica ha ayudado a caracterizar al H₂O₂ como molécula señalizadora. Plantas transgénicas de patata que sobreexpresaban el gen de una glucosa oxidasa apoplástica fúngica contenían constitutivamente niveles elevados de H₂O₂, acumulaban ácido salicílico e incrementaban la producción de quitinasa ácida y los niveles de transcrito de peroxidasa aniónica (Wu *et al.*, 1995, 1997). De manera similar, plantas de tabaco deficientes en catalasa (Cat 1 AS), que acumulaban H₂O₂ en condiciones de alta intensidad luminosa, fueron utilizadas para investigar el papel del H₂O₂ durante la resistencia adquirida sistémica y localmente. La acumulación de proteínas ácidas PR tanto en hojas distales como locales protegía del estrés por H₂O₂ provocado por la alta intensidad luminosa, demostrando claramente que los niveles de H₂O₂ en la partes expuesta a la luz pueden activar la expresión de proteínas de defensa (Chamnonpol *et al.*, 1998).

En 2002, Tiwari *et al.* evidenciaron que el estrés oxidativo en mitocondrias incrementaba la respiración y generación de ROS produciendo una disminución de ATP, aumento de la permeabilidad mitocondrial y muerte celular programada.

Varios estudios indican una función señalizadora más general para los ROS, y en particular para el H₂O₂, durante la respuesta al estrés abiótico. Los niveles de transcrito de APX citosólica incrementaban significativamente en suspensiones de cultivos celulares de arroz por tratamientos con H₂O₂ o paraquat (Morita *et al.*, 1999). La adición de dietilditiocarbonato (un inhibidor de SOD que provoca la disminución de los niveles de H₂O₂) reduce la inducción de APX, mientras que la inhibición de catalasa o APX, que produce acumulación de H₂O₂, incrementa los niveles de transcrito de APX (Morita *et al.*, 1999). Estos resultados defienden que el H₂O₂ forma parte de la cascada de señalización que conduce a la inducción de la APX citosólica. Muchos otros artículos sobre la regulación de APX por paraquat o H₂O₂ han sido publicados apoyando la inducción del enzima por estas moléculas (Mittler and Zilinskas, 1992; Donahue *et al.*, 1997). Existen más evidencias acerca del papel señalizador de los ROS basadas en descubrimientos recientes en el campo de la

aclimatación de las plantas al estrés. Se ha comprobado que microplantas de patata tratadas con H_2O_2 son resistentes a un choque térmico a $42^\circ C$ durante 15 horas (Foyer *et al.*, 1997). Banzet *et al.* (1998) detectaron una acumulación de proteínas de choque térmico (HSPs), incluida la HSP22 mitocondrial, en cultivos celulares de tomate tras la adición de 2 mM de H_2O_2 , pero no en respuesta a agentes generadores del radical superóxido. La inyección del H_2O_2 en hojas de *Arabidopsis thaliana* inducía protección frente al blanqueamiento inducido por la luz (Karpinski *et al.*, 1999). Plantas de maíz tratadas con H_2O_2 ofrecen más resistencia al estrés por frío que plantas controles (Prasad *et al.*, 1994). Los tratamientos en plantas de trigo con distintas concentraciones de H_2O_2 y un inhibidor de la catalasa conducen a la síntesis dependiente de la concentración, de varios polipéptidos, similar a la que se produce cuando las plantas son expuestas a bajas temperaturas (Matsuda *et al.*, 1994). Adicionalmente, las heladas o el H_2O_2 inducen en tabaco un acúmulo transitorio de calcio (Price *et al.*, 1994).

Durante mucho tiempo, las propiedades señalizadoras de los ROS se consideraron propiedad particular del H_2O_2 , sin embargo, las evidencias 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 es inducido específicamente por $O_2^{\cdot -}$ 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 $O_2^{\cdot -}$ que por H_2O_2 (Jabs *et al.*, 1997). En plantas de *Cucúrbita maxima* se comprobó la elevada expresión de una secuencia de cDNA con homología por 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (WSA CS2) tras el tratamiento con $O_2^{\cdot -}$ (Watanabe and Sakai, 1998). En callos celulares de guisante crecidos con NaCl, se produce un incremento en la tasa de producción mitocondrial de $O_2^{\cdot -}$ 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 de peroxidasa (Olmos *et al.*, 1994).

2. PRODUCCIÓN DE ROS EN MITOCONDRIAS

Los orígenes de la mitocondria pueden situarse en un evento donde una célula procariótica fue invadida por otra procariótica para formar una línea celular conteniendo dos genomas independientes (Harvey *et al.*, 2001, Gray *et al.*, 1999, Schleffer, 2000). Con el tiempo, ambos genomas se han hecho codependientes y la mitocondria ha perdido su capacidad de sobrevivir fuera de la célula. Una transferencia sustancial de información genética desde la mitocondria al genoma nuclear tuvo lugar durante este tiempo.

La mitocondria es el orgánulo del metabolismo oxidativo de las células eucarióticas cuyo papel prioritario es la respiración oxidativa de ácidos orgánicos y la transferencia de electrones al O_2 vía cadena de transporte electrónico acoplada a la síntesis de ATP. Además lleva a cabo muchas otras funciones secundarias tal como la síntesis de nucleótidos, metabolismo de aminoácidos y lípidos, síntesis de vitaminas y cofactores, participación en procesos fotorespiratorios y exportación de intermediarios de ácidos orgánicos para la biosíntesis de la pared celular (Harvey *et al.*, 2005). Como Ernster y Schatz (1981) indicaron, la mitocondria contiene los enzimas que median la respiración celular, incluyendo la piruvato deshidrogenada, los enzimas del ciclo del ácido cítrico, los enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos y proteínas redox implicadas en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.

El número de proteínas presentes en la mitocondria de ciertas especies de plantas ya se sitúa por encima de 3000, la mayoría de ellas de codificación nuclear y que son enviadas a la mitocondria mediante mecanismos de importe. Se estima que tan sólo entre un 2% y un 5% de las proteínas mitocondriales son codificadas por el genoma mitocondrial (Gray *et al.*, 1999). Un gran número de pequeñas moléculas es transportado desde y hacia la mitocondria a través de proteínas transportadoras de membrana o canales. Finalmente, las señales celulares que coordinan la división celular, cambios en el desarrollo y respuestas al estrés arrastran a otras muchas proteínas mitocondriales que se regulan mediante estados de fosforilación y/o estados redox. A todo el directorio de estas proteínas presentes en la mitocondria se le conoce con el nombre de proteoma mitocondrial.

Muchas de las proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo son enviadas a la mitocondria a través de secuencias señales que residen en la porción N-terminal de la proteína. En teoría, esto puede ser predicho a través de programas bioinformáticos como el MitoProt, que analiza hasta 47 caracteres típicos en estos péptidos señales así como los sitios de corte (Claros and Vicens, 1996). Usando tales programas, miles de las proteínas codificadas por el genoma nuclear de plantas modelo tendrían un destino mitocondrial (Heazlewood *et al.*, 2004). Más recientemente, el programa TargetP ha sido capaz de dar otra serie de localizaciones ayudándose de los datos almacenados y conocidos en otras bases de datos como la Swiss-Prot (Emanuelsson *et al.*, 2000).

En la cadena respiratoria bacteriana, en torno al 0.6% del oxígeno consumido conduce a la formación de radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Imaly, 2003). Se estima que al menos un 1% del oxígeno consumido por la mitocondria de la planta puede derivar en producción de ROS. Este valor, un tanto menor que el dado para las mitocondrias de humanos (5%) (Moller, 2001), suele aumentar cuando las plantas se encuentran bajo estrés biótico o abiótico (Braidot *et al.*, 1999). Las mitocondrias de plantas producen superóxido y peróxido de hidrógeno a una velocidad igual o mayor que las mitocondrias de mamíferos, si se estima en valor absoluto y como porcentaje

de velocidad de transporte de electrones (normalmente 100-500 nmol O₂ consumido min⁻¹.mg⁻¹). La cadena de transporte electrónico mitocondrial de plantas contiene los complejos I-IV y presentan las mismas propiedades de transporte electrónico que las mitocondrias de otros organismos (Vedel *et al.*, 1999). Los complejos I, II, III y IV se corresponden con la NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, ubiquinol-citocromo bc1 reductasa y citocromo c oxidasa respectivamente. Se conocen también los inhibidores de algunos complejos; así por ejemplo la rotenona puede inhibir el complejo I, el mixotiazol y antimicina A inhiben el complejo III y el cianuro potásico es capaz de bloquear el complejo IV. Sin embargo, en plantas esta cadena de transporte electrónico contiene cinco enzimas que no están presentes en mitocondrias de mamíferos: una oxidasa alternativa (AOX) (Vanlerberghe *et al.*, 1997) que puede ser inhibida por SHAM y cuatro NAD(P)H deshidrogenadas (Moller, 2001), que no bombean protones hacia la matriz y que son catalogadas como flavoproteínas por lo que son lugares potenciales de síntesis de ROS. A pesar de ello se ha comprobado que estas deshidrogenadas no participan en la producción de ROS, ya que en experimentos con mitocondrias íntegras en las que se medía la producción de O₂⁻ y la oxidación de NADH, la generación de O₂⁻ fue completamente inhibida por KCN (Purvis *et al.*, 1995). Dos de esas cuatro NAD(P)H deshidrogenadas se sitúan en la cara externa de la membrana interna mitocondrial y reciben el nombre de NDex. Ambas requieren Ca²⁺ para su actuación si bien sólo una de ellas, la más próxima al complejo II, es capaz de oxidar NADPH. En la cara más interna de la membrana mitocondrial se encuentran las otras dos deshidrogenadas denominadas NDin y su distribución es idéntica a las NDex si bien sólo la Ndin (NADPH) necesita Ca²⁺. En situaciones de stress fisiológico la concentración citosólica de Ca²⁺ y poliaminas se ve aumentada lo que supone una activación de las NAD(P)H deshidrogenadas.

En mitocondrias de plantas, cuando el oxígeno interacciona con las dos oxidasas terminales, los complejos IV y AOX, se transfieren cuatro electrones y se produce agua (Moore and Siedow, 1991; Siedow, 1995). Sin embargo, el oxígeno puede interaccionar también con la forma reducida de otros componentes del

transporte de electrones, como por ejemplo las flavinas y ubiquinona, resultando en la formación de ROS de manera que se han descrito cantidades importantes de O_2^- en mitocondrias (Boveris, 1984; Purvis, 1997). Se ha comprobado que, en mitocondrias de pimiento verde, la inhibición de las dos oxidasas terminales inducía una elevada producción de ROS (Purvis *et al.*, 1995), mientras que el nivel de ROS producido disminuía cuando se activaba la AOX mediante la adición de piruvato (Purvis, 1997; Braidot *et al.*, 1999). Estos ROS son capaces de reaccionar con proteínas, lípidos y DNA, causando una disminución en las actividades, incremento en la permeabilidad membranal y mutaciones respectivamente (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Dos lugares principales de producción de ROS en la respiración activa de mitocondrias vegetales son los complejos respiratorios I y III, y la tasa de producción dependerá del nivel de reducción de la cadena de transporte de electrones. Así, en algunos casos, se comprobó que la producción de ROS estaba completamente inhibida en presencia de KCN, indicando que el complejo III era la única fuente de ROS antes de la adición de KCN (Boveris *et al.*, 1978; Puntarulo *et al.*, 1988). Años más tarde, Purvis *et al.* (1995) detectaron en otros casos una elevada producción de ROS en presencia de KCN, lo cual indicaba que el complejo I y/u otras deshidrogenadas son los principales sitios de producción de ROS. El complejo I ha sido aislado de mitocondrias de tubérculos de patata, remolacha y hojas de guisante (Rasmusson *et al.*, 1994, Agius *et al.*, 1998) y se ha comprobado que, dependiendo de la especie, es total o parcialmente sensible a rotenona (Rasmusson *et al.*, 1998). De hecho, el complejo I es capaz de generar ROS en presencia de rotenona debido a que contiene FMN (Palmer, 1976). Según Majander *et al.* (1994), la producción de electrones estaría bloqueada por la incubación de las mitocondrias con DPI, ya que este sustrato inhibe la propia flavina. Braidot *et al.* (1999) comprobaron que la producción de H_2O_2 en mitocondrias aisladas de tallos de guisante es principalmente formada durante la oxidación del sustrato a nivel del complejo I.

En general, las plantas muestran un tipo de respiración que es particularmente resistente al cianuro, una característica que ha sido reconocida desde hace muchos años y que es debida a la AOX, situada en la cara matricial de la membrana interna (Ribas-Carbó *et al.*, 1994). La existencia de esta oxidasa está ampliamente extendida en el reino vegetal, ya que se ha podido identificar en todas las plantas superiores que hasta la fecha han sido estudiadas, además de muchas especies de algas, hongos, levaduras y protozoos (Ordentlich *et al.*, 1991; McIntosh, 1994).

Esta AOX no atraviesa toda la membrana, no bombea protones hacia el otro lado de la membrana, y por tanto no permite la conservación de la energía en forma de ATP, por lo que la AOX es de naturaleza no fosforilante, al contrario que la citocromo c oxidasa con actividad bombeadora de protones (Babcock and Wikström, 1992).

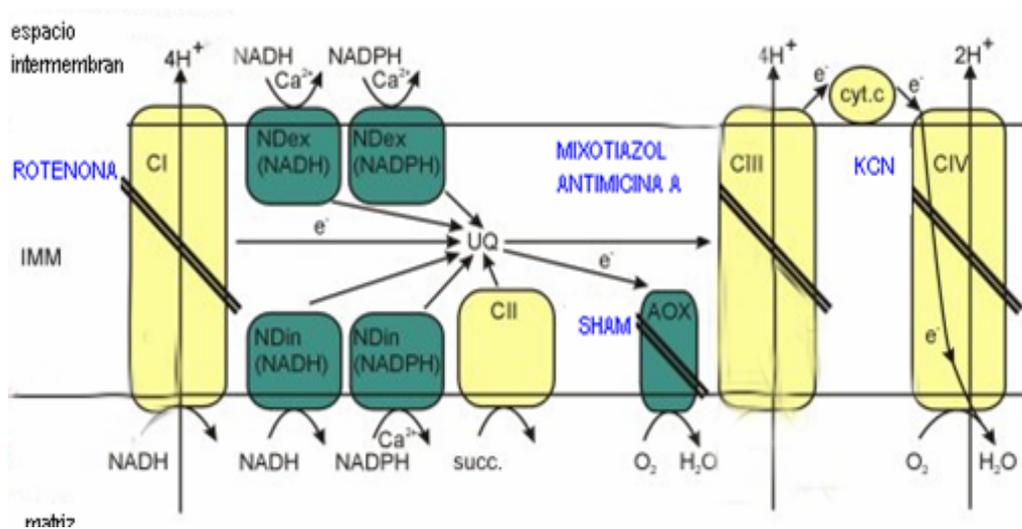


Figura 2. Representación de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC) de vegetales. En amarillo se representan los complejos I, II III y IV de la ETC y en verde las NAD(P)H deshidrogenasas y la oxidasa alternativa (AOX). En azul se denotan los inhibidores de los complejos y de la AOX.

La naturaleza no fosforilante de la AOX es la base de la función en la termogénesis de órganos reproductores de algunas plantas, cuya estrategia reproductiva consiste en el calentamiento del espádice floral varios grados por encima del ambiente, con el fin de volatilizar compuestos, como aminas primarias, que atraen insectos polinizadores (Meeuse, 1975; Raskin *et al.*, 1987; Skubatz *et al.*; 1990; Kumar *et al.*, 1990). El mecanismo molecular de este comportamiento termogénico está relacionado con una fuente de activación durante unas pocas horas de la respiración mitocondrial, y particularmente de la AOX, la cual se sintetiza en grandes cantidades en detrimento de la citocromo c oxidasa (Elthon *et al.*, 1989). El proceso termogénico se desencadena por el ácido salicílico, identificado como el “calorígeno” propuesto antiguamente (Raskin *et al.*, 1987), ya que esta molécula controla la expresión génica de la oxidasa alternativa (Elthon *et al.*, 1989).

Sin embargo, la AOX también está presente en órganos no termogénicos (hojas, raíces, órganos reproductores y de reserva) y frecuentemente se encuentra activa en condiciones normales (Millenaar *et al.*, 1998). Se han propuesto varias funciones para la AOX en el caso de tejidos no termogénicos, pero parece claro que su actividad conduce a una menor eficiencia energética para la planta (Azcón-Bieto *et al.*, 1983). La AOX se ha considerado como un mecanismo “sumidero” que actúa cuando el citocromo de la cadena está saturado de electrones, de manera que puede desviar el flujo de éstos de la cadena de transporte y utilizarlos para la reducción del O₂ a agua. Por lo tanto, por un lado previene la reducción del O₂ por los electrones de la cadena a O₂⁻ y por otro disminuye los niveles de O₂, sustrato para la producción de ROS en la organela (Palmer, 1976; Lambers, 1982; Moller, 2001). Más recientemente se ha demostrado que en presencia de piruvato, la AOX competirá con la cadena de citocromo insaturado por los electrones, previniendo así la reducción posterior de la ubiquinona (Hoefnagel *et al.*, 1995). En este sentido es interesante mencionar que genotipos de guisante que carecen de la AOX muestran tasas de crecimiento superiores a las de sus genotipos parentales sugiriendo que la AOX puede no ser esencial para la planta. Vanlerberghe y McIntosh (1997) defienden que en las

mitocondrias de plantas la AOX puede actuar como un “sumidero” de electrones procedentes de la ubiquinona reducida cuando la ruta del citocromo está saturada con electrones o restringida por la disponibilidad de ADP, previniendo así la formación de ROS. La capacidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial para su ajuste rápido mediante la activación de la AOX puede ser un mecanismo para prevenir la sobrerreducción de los componentes de la cadena respiratoria que, por otra parte, resultarían en la formación de ROS perjudiciales (Purvis and Shwefel, 1993; Wagner and Krab, 1995). Así, Purvis y Shewfelt (1993) sugirieron que la AOX ayudaría a minimizar la producción de ROS por la cadena de transporte de electrones. Poco después, descubrió que el H_2O_2 induce la síntesis de AOX en cultivos celulares de *Petunia* (Wagner, 1995). Posteriormente, Maxwell *et al.* (1999) demostraron que células que sobreexpresaban la AOX contenían, como mucho, la mitad de ROS que células controles, mientras que células en las que la expresión de la AOX había sido reducida, contenían cinco veces más ROS que células controles. Más recientemente, Rizhsky *et al.* (2002) detectaron una inducción de la AOX cloroplastídica en plantas transgénicas que carecen de APX y/o catalasa y en plantas normales en respuesta a una elevada intensidad luminosa.

Cualquier condición metabólica que conduzca a la acumulación de ubiquinona reducida, NADPH mitocondrial o piruvato, tiene el potencial de incrementar el flujo de electrones hacia la ruta alternativa. Estas condiciones pueden alcanzarse cuando existe un desequilibrio entre el metabolismo del carbono respiratorio y el transporte de electrones, como resultado de cambios en el suministro o demanda de carbono, poder reductor y ATP. Cambios rápidos en cualquiera de estos dos procesos acoplados, metabolismo del carbono y transporte de electrones, podrían ser contrarrestados por un fino y rápido control bioquímico de la oxidasa alternativa. Igualmente, cambios a mayor período de tiempo en el metabolismo del carbono o el transporte de electrones que resultan en desequilibrios podrían ser compensados por un control más burdo de la cantidad de proteína oxidasa alternativa presente. Por lo tanto, la función más

importante de la AOX es mantener el equilibrio entre el metabolismo del carbono y el transporte de electrones (Vanlengerhel and McIntosh, 1997).

El óxido nítrico (NO \cdot) es un radical libre ampliamente conocido por su función como mensajero tanto a nivel intracelular como intercelular y que presenta un amplio espectro de funciones reguladoras en los sistemas nervioso central, cardiovascular e inmunitario (Moncada *et al.*, 1991; Knowles and Moncada, 1994). En plantas, una de las moléculas diana del NO \cdot es la citocromo c oxidasa, resultando en una inhibición de la respiración celular. Neill *et al.* (2002) defienden que el efecto inhibitorio del NO \cdot sobre la respiración es muy perjudicial para la planta ya que no sólo disminuye la tasa de respiración sino que potencia la generación de O $_2\cdot^-$ por la reducción del pool de la ubiquinona. En respuesta a esta disminución en la respiración mitocondrial, parece ser que el NO \cdot induce la transcripción del gen AOX1a y la actividad AOX con el fin de catalizar la oxidación del ubiquinol y la reducción del oxígeno a agua, de manera que la AOX juega un papel muy importante en la tolerancia de las plantas a situaciones asociadas a una producción inducida de NO \cdot , como la asimilación de nitrógeno o un ataque por patógenos, tal y como se ha demostrado en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* (Huang *et al.*, 2002).

Las NDin (NADH) deshidrogenasas de la cara matricial de la membrana mitocondrial interna también pueden ayudar a minimizar la producción de ROS actuando como sumidero en condiciones donde la actividad del complejo I es inadecuado. Esto sería consistente con la inducción de NDin (NADH) en hojas de remolacha lavadas cuando la actividad del complejo I está disminuida por tratamientos con cloranfenicol (Moller, 2001).

Por otra parte, se han descubierto más recientemente una serie de proteínas denominadas desacopladoras presentes en mitocondrias vegetales (Laloi *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 2004), cuya activación por ácidos grasos disminuye la producción de ROS por mitocondrias vegetales (Casolo *et al.*, 2000), lo que indica que un ligero

desacoplamiento puede ser también un mecanismo para limitar la producción de ROS. Kowaltowski *et al.* (1998) demostraron cómo la inhibición de esas proteínas desacopladoras en mitocondrias de patata (PUMP) conducía a un aumento en los niveles mitocondriales de H₂O₂ mientras que sustratos tales como el ácido linoléico reducían la producción de este peróxido. Los autores también sugirieron el papel protector contra el estrés oxidativo mitocondrial desempeñado por las PUMP.

3. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como se ha mencionado en el capítulo 2 de esta introducción, la cadena de transporte electrónico puede producir ROS, principalmente debido a la presencia del ubisemiquinona que puede transferir un electrón al O₂ y producir superóxido (Halliwell and Gutteridge, 1989). La vida media de la ubisemiquinona incrementa si la cadena de transporte electrónico está sobrerreducida y es entonces cuando los mecanismos que regulan el flujo electrónico de la ubiquinona pueden reducir la producción de ROS. Aquí la actividad de la AOX ha sido más que demostrada en su capacidad de reducir la acumulación de ROS (Maxwell *et al.*, 1999). Un papel similar también ha sido propuesto para las proteínas desacopladoras mitocondriales (Kowaltowski *et al.*, 1998). Igualmente se ha hablado de la capacidad de las NDin (NADH) deshidrogenadas para mantener la cadena de transporte electrónico relativamente oxidada (Moller, 2001). Resumiendo, podemos considerar que la AOX, las NDin (NADH) deshidrogenasas y las proteínas desacopladoras suponen la primera línea de defensa frente a la producción de ROS.

Cuando por situaciones de estrés biótico o abiótico la producción de ROS se ve aumentada otros sistemas antioxidantes mitocondriales han de entrar en juego para intentar mantener el equilibrio fisiológico. Suponen la segunda línea de defensa frente a los ROS. Los sistemas antioxidantes pueden ser clasificados como enzimáticos y no enzimáticos. Los no enzimáticos son compuestos capaces de amortiguar a los ROS

mientras que los sistemas enzimáticos antioxidantes catalizan el proceso de detoxificación de ROS.

3.1. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Glutación y ascorbato: cuantitativamente, el ascorbato y glutación son los antioxidantes y tampones redox mayoritarios de la célula (Noctor and Foyer, 1998). Además, funcionan como co-sustratos en el ciclo ascorbato- y llevan a cabo muchas otras funciones fisiológicas. Sus concentraciones fisiológicas están en el rango de milimolar, con considerables variaciones entre tejidos y estados fisiológicos de las plantas (Smirnoff, 1996).

El **ascorbato** amortigua los aniones superóxido, oxígeno singlete y radicales hidroxilo. Regenera el tocoferol oxidado y actúa como donador de electrones en la depoxidación de violaxantina (Smirnoff, 2000). La forma oxidada del ascorbato, monodeshidro o deshidro-ascorbato (MDHA, DHA) es eficientemente reducida por la monodeshidro-ascorbato reductasa del ciclo del ascorbato-glutación. El **glutación** (GSH) es un tripéptido tiol, compuesto de γ -glutamilcisteinilglicina, y el mayor antioxidante basado en grupos tiol de la célula. Reacciona directamente con los ROS bajo oxidación de los grupos sulfidrilos de los residuos de cistina, en particular en reacciones catalizadas por la peroxidasa y -S-transferasa (Cummins et al., 1999). El oxidado (GSSG) es un dímero formado por dos moléculas de γ -glutamilcisteinilglicina unidas mediante puente disulfuro, que es nuevamente reducido por la NADPH reductasa (Alscher, 1989). La ización, en el caso de puentes disulfuro mixtos entre y el grupo sulfidrilos de una cisteína proteínogénica, protege contra la oxidación irreversible y regula funciones en las proteínas. Esta modificación posttranscripcional reversible es catalizada por las glutarredoxinas. (Lemaire, 2004). La formación de conjugados con juega también un papel importante en la detoxificación y secuestro de xenobióticos, una reacción catalizada por la -S-transferasa (Edwards *et al.*, 2000). Indirectamente, y como precursor en la síntesis de de la fitoquelatina, el desempeña

un papel importante en la detoxificación de metales pesados (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Aparte de estos dos prominentes antioxidantes, las células vegetales poseen muchos otros antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos como el **tocopherol y carotenoides**, los mayores antioxidantes lipofílicos de los tilacoides, además de **ácido lipóico, flavonoides** y varios **alcaloides y compuestos fenólicos** (Dietz, 2003).

3.2. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Superóxido dismutasas (SOD)

Catalizan la dismutación de dos radicales superóxido hasta peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular a través del ciclo de reducción y oxidación del metal de transición en el sitio activo (McCord and Fridovich, 1969). La concentración de SOD en la mayoría de las células es de 10^{-5} M y la tasa de reacción del enzima con el anión superóxido es de $2 \times 10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, unas 10.000 veces superior a la velocidad de dismutación espontánea del O_2^- a pH fisiológico (Fridovich, 1998). Tres tipos de isoenzimas de la SOD se encuentran en plantas, que difieren en su metal cofactor y en su localización. Uno de estos tipos, la Mn-SOD, tiene una localización típica mitocondrial, aunque posteriormente se han encontrado también en peroxisomas y glioxisomas (Sandalo *et al.*, 1987). Tanto la matriz mitocondrial de vegetales como la de humanos contienen Mn-SOD. Células de mamífero que sobreexpresaban la Mn-SOD mostraron un incremento en su resistencia al O_2^- generado por la adición de paraquat (Wenk *et al.* 1999). Cuando la Mn-SOD mitocondrial de planta fue expresada en líneas de levadura deficientes en Mn-SOD, las células recuperaron su resistencia al estrés oxidativo (Scandalios 1993). Igualmente, la sobreexpresión de la Mn-SOD de *Nicotiana plumbagnifolia* en mitocondrias de *Nicotiana tabacum* supuso una protección frente al daño oxidativo (Bradiot *et al.*, 1999).

Catalasas

Las catalasas son enzimas que normalmente se encuentran formando tetrameros y contienen un grupo hemo. Su función principal es la de proteger a la célula de los efectos deletéreos del H_2O_2 evitando su acumulación. Catalizan la reducción de dos moléculas de peróxido de hidrógeno hasta oxígeno y agua. La presencia de catalasa en mitocondrias vegetales es aún una incógnita, si bien, en 1980 se apuntaron los primeros indicios de su existencia en mitocondrias de maíz (Scandalios et al., 1980). Sin embargo, se asume que deben existir otros mecanismos preventivos de acumulación del peróxido de hidrógeno ya que éste es un potente inhibidor de la aconitasa (Verniquet *et al.*, 1991) y podría producir una disrupción del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

Enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

La detoxificación de H_2O_2 a través del ciclo que utiliza ascorbato y glutatión es llamada ciclo del ascorbato-glutatión. Esta ruta fue descrita por primera vez en cloroplastos, en los que las condiciones fuertemente reductoras asociadas al PSI, conducen a la producción de alteraciones importantes a través de la formación de especies activadas de oxígeno tales como el H_2O_2 y O_2^- (Elstner, 1991; Dalton *et al.*, 1993), y está implicada en la eliminación de las mismas, evitando así la formación de radicales hidroxilo. En este ciclo, el H_2O_2 es eliminado por la actividad ascorbato peroxidasa (APX) que utiliza el ascorbato como donador de electrones. El Monodeshidroascorbato (MDHA) formado, y a partir de éste el deshidroascorbato (DHA) resultante por dismutación espontánea, se utilizan para reciclar el ascorbato mediante las actividades enzimáticas monodeshidroascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa, respectivamente. La actividad MDHAR utiliza el NAD(P)H como donador de electrones mientras que la actividad DHAR regenera el ascorbato utilizando el poder reductor suministrado por el glutatión reducido (GSH). A su vez, el glutatión oxidado (GSSG) formado, es de nuevo reciclado hasta GSH por la acción de la actividad Glutatión reductasa (GR) en una reacción dependiente de NADPH, cofactor éste proveniente de la fotosíntesis por acción de la actividad

glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Junto a cloroplastos, citosol, mitocondrias, peroxisomas y lumen tilacoidal (Chew *et al.*, 2003, Ishikawa *et al.*, 1996, Jiménez *et al.*, 1997, Kieselbach *et al.* 2000) son los compartimentos celulares en los que se ha demostrado la actividad del ciclo ASC-GLU. Este ciclo juega un papel muy importante en la protección de las plantas frente al peróxido de hidrógeno resultante de una actividad fotosintética normal y también en la producción frente a situaciones de estrés ambiental que puedan generar ROS en la célula.

Guaiacol peroxidasas

Las guaiacols peroxidasas están involucradas en el catabolismo del peróxido de hidrógeno y están presentes en el citosol, vacuolas y pared celular, pero no en las organelas (Asada, 1992).

Glutación peroxidasas

La familia de las glutación peroxidasas comprende una serie de enzimas que utilizan GSH para reducir H_2O_2 , hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos (Halliwell and 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 glutación o tiorredoxinas (Gelhay *et al.*, 2004, Rodríguez Milla *et al.*, 2003).

Sistema Peroxirredoxina-Tiorredoxina

Las mitocondrias de todos los organismos eucariotas parecen contener al menos una Prx (Pedradas *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2003b; Banmeyer *et al.*, 2005). Las Peroxirredoxinas (Prx) llevan a cabo el catabolismo del H_2O_2 hasta H_2O en un sistema redox donde las Tiorredoxinas (Trx) les ceden los electrones. Debido a la importancia de ambas enzimas en el trabajo de esta tesis, en los próximos capítulos se desarrollará con detalle todo lo referente a las mismas, y en concreto, a aquellas que tienen una localización mitocondrial en guisante.

Es esencial estudiar las características de la Prx mitocondrial (PrxII F), la interacción y dependencia con el sistema tiorredoxina, así como su respuesta en aquellas situaciones en que la planta se ve sometida a condiciones de estrés ya que esta enzima se encuentra implicada en procesos tan importantes como la señalización celular. Las Prxs han sido últimamente establecidas como un punto clave, una encrucijada en el metabolismo que responde al equilibrio redox de los organismos. El trabajo que abordamos en la Memoria de esta Tesis Doctoral permitirá, mediante el estudio de las PrxII F de guisante, conocer funciones específicas de las Prx, respuesta a situaciones adversas e importancia en el mantenimiento del estado redox celular. Los resultados obtenidos en este sentido podrían, en sí mismos, mejorar nuestros conocimientos sobre la respuesta de las plantas a contaminantes ambientales, así como valorar la contribución de los distintos sistemas antioxidantes en el balance óxido-reducción. Por otra parte, estos resultados ayudarían a un mejor conocimiento sobre la inducción de genes relacionados con el estrés oxidativo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. PEROXIRREDOXINAS

1.1. GENERALIDADES

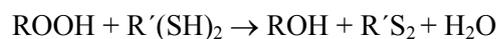
Las peroxirredoxinas (Prx) son enzimas peroxidadas de entre 17 y 22 KDa que catalizan la transferencia de electrones de grupos sulfhidrilos a peróxidos (Baier and Dietz., 1996b, 1997, 1999). En los últimos años se han aislado, clonado y secuenciado en distintos organismos de todos los reinos: levaduras, células animales y vegetales, protozoos, helmintos, y en la mayoría de arqueas y eubacterias, constituyendo filogenéticamente un antiguo grupo de enzimas que ejercen su función catalítica mediante la destoxificación de peróxidos tóxicos para la célula (Chae *et al.*, 1993; Prospéri *et al.*, 1993; Storz *et al.*, 1989; Lim *et al.*, 1998).

La Prx se descubrió inicialmente en levadura como una proteína de 25 kDa que proporcionaba protección a los componentes celulares frente al daño oxidativo producido por sistemas de oxidación que contenían un compuesto tiólico (Fe^{3+} , O_2 , RSH), pero no por sistemas de oxidación que contenían ascorbato (Fe^{3+} , O_2 , y ascorbato) (Rhee, 2005). La protección era posible debido a que la proteína de 25 kDa era capaz de reducir el H_2O_2 usando como reductor un compuesto tiólico. Debido a esto se le denominó "enzima antioxidante específica de tioles" (Kim *et al.*, 1988). Posteriormente recibió otros nombres como alquil hidroperóxido reductasa (Ahp), tiorredoxín peroxidasa (Tpx) y actualmente se las denomina peroxirredoxinas (Prx).

La primera Prx se clonó de bacterias tales como *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Storz *et al.*, 1989) y desde entonces se han aislado de muchos organismos. Por ejemplo, al menos cinco isoformas están presentes en los genomas de ratón y humano (Prx I, II, III, IV y V) (Seo *et al.*, 2000). Los lugares donde el nivel de expresión de

estas proteínas es alto, coinciden con aquéllos donde el metabolismo de oxígeno activo 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 con 14×10^6 copias en cada glóbulo rojo (Schröder *et al.*, 2000). Existen evidencias de que las Prx 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).

Las Prx 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; Bryk *et al.*, 2000, Rhee *et al.* 2005, Dietz *et al.*, 2006). Ensayos de mutagénesis dirigida sobre la cisteína peroxidática abolieron la actividad peroxidasa de estas enzimas (König *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2004; Lankameier *et al.*, 2006). Estas enzimas se caracterizan además porque no contienen ningún grupo hemo, por lo que para compensar la pérdida del grupo prostético necesitan un donador externo de electrones, que generalmente es la tiorredoxina (Trx) (Chae *et al.*, 1994a; Kwon *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998, Rhee *et al.*, 2005), aunque también pueden utilizar a la glutarredoxina (Grx) (Rouhier *et al.*, 2001, 2002a), glutatión (Hofmann *et al.*, 2002; Dietz., 2003a) y ciclofilina (Lee *et al.*, 2001, Bernier-Villamor *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006). La reacción general que catalizan sigue la siguiente ecuación:



Las Prx son unas enzimas abundantes que constituyen entre el 0.1 -0.8% de las proteínas solubles totales aunque su eficiencia catalítica es del rango de una o tres veces menor que la GPx o catalasa (Rhee *et al.*, 2005). Todas las Prx se presentan

como homodímeros y contienen un residuo de cisteína conservado en la región NH₂-terminal localizado en un ambiente estructural conservado y que es esencial para la actividad catalítica (Chae *et al.*, 1993; Baier and Dietz., 1996c; Verdoucq *et al.*, 1999; Rhee *et al.*, 2005).

En vegetales, las Prx pueden diferenciarse en cuatro subclases en función de su secuencia aminoacídica y mecanismo catalítico: las peroxirredoxinas de 1-Cys (Prx de 1-Cys), peroxirredoxinas de 2-Cys (Prx de 2-Cys), peroxirredoxinas relacionadas con la proteína YLR109 (Prx de tipo II) y peroxirredoxinas asociadas a la bacterioferritina (Prx Q).

Las seis isoformas de Prx de mamíferos hasta el día encontradas han sido clasificadas en tres subgrupos, designados como Prx de 2-Cys, Prx de 2-Cys atípicas, y Prx de 1-Cys. Las Prx de 2-Cys, 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 aminoacídicos. Las Prx de 2-Cys atípicas poseen únicamente la Cys N-terminal pero requieren de otra Cys adicional, no conservada y situada distalmente en la zona carboxílica. Las Prx de 1-Cys contienen una única Cys y ésta se sitúa en la región N-terminal (Rhee *et al.*, 2005).

Dentro de las Prx de 2-Cys, la PrxI y II tienen una localización citosólica mientras que la PrxIII sólo se halla en la mitocondria; la Prx IV está presente en el retículo endoplásmico y el espacio extracelular. 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).

En el ciclo catalítico de las 2-Cys Prx, el residuo de cisteína sensitivo al H₂O₂ (Cys⁵¹ en la Prx I de mamíferos) es selectivamente oxidado por el H₂O₂ hasta Cys-SOH, que reacciona con el residuo COOH-terminal conservado Cys-SH (Cys¹⁷² de la Prx I) 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). 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-SO₂H) (Yang *et al.*, 2002). Por el contrario, las Prx de procariotas, que carecen del motivo peptídico GGLG en el extremo COOH-terminal de la proteína, son totalmente insensibles a la inactivación por oxidación (Wood *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004).

Dado que los reductores fisiológicos como el glutatión o la Trx no son capaces de reducir la forma de ácido sulfínico de las Prx, la reacción de hiperoxidación era considerada como la inactivación permanente de la actividad peroxidasa (Chae *et al.*, 1994a; Georgiou *et al.*, 2003).

Otros estudios mostraron que las formas de sulfínico y sulfónico de las Prx aparecen en geles 2-D como dos spots de igual tamaño y distinto punto isoeléctrico (pI) y que esas diferencias de pI se deben únicamente a la oxidación de las cisteínas catalíticas (Cesaratto *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2003a,b). La forma reducida siempre se sitúa en la zona más básica del gel mientras que la forma de sulfénico o sulfínico lo hace en la posición más ácida. Así se ha sugerido que la oxidación de las Prx es un marcador de oxido-reducción altamente sensitivo, más incluso que los comúnmente usados para determinar el estado redox celular (glutatión total o contenido tiólico de proteínas total). (Cesaratto *et al.*, 2005). Estudios del estado redox en algunos tipos de Prx mediante geles bidimensionales han revelado que la reacción de hiperoxidación es actualmente reversible en las células hablándose de una retroreducción (Woo *et al.*, 2003a,b; Chevallet *et al.*, 2003; Cesaratto *et al.*, 2005). La hipótesis de retroreducción se contradice en cierto modo la idea de que las Prx oxidadas actúan como compuerta que modula la respuesta de las células a las concentraciones de peróxido intracelular. (Georgiou and Masip, 2003). La sulfínación de las Prx ha sido también propuesta como un mecanismo para la regulación del H₂O₂ (Woo *et al.*, 2003).

En el año 2003, Biteau *et al.* descubren en levaduras las **sulfirredoxinas** (Srx), enzimas responsables de la catálisis de la reducción de la forma superoxidada de la Prx. Las Srx son unas proteínas presentes en eucariotas con un residuo conservado de cisteína. La reducción de la forma sulfinica a manos de las Srx supone un proceso lento (k_{cat} 0.18/min) que requiere calcio, hidrólisis de ATP y un donador electrónico como el glutatión o Trx (Biteau *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Jonsson *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006) (figura 3). A principios de 2006 se abrieron las primeras investigaciones sobre Srx en plantas (Liu *et al.*, 2006), donde se atribuyó una localización cloroplastídica de la enzima y se relacionó con la Prx de 2-Cys.

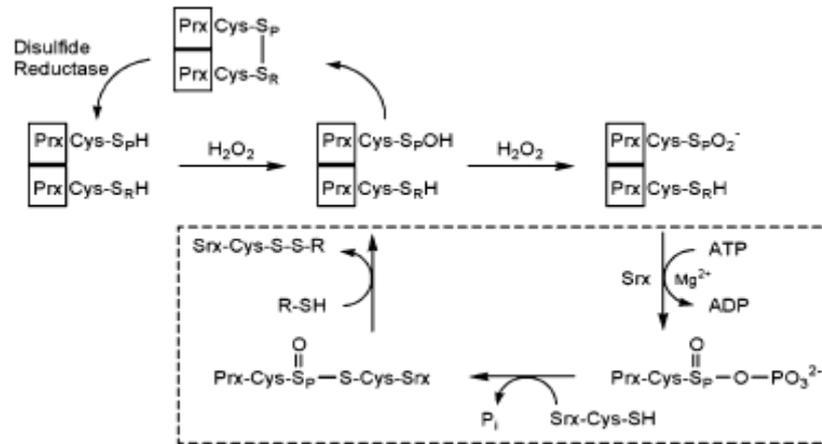


Figura 3. Ciclo redox Peroxirredoxinas-Sulfirredoxinas (Jonsson *et al.*, 2003)

Otras enzimas de acción similar a las Srx, las sestrinas, han sido descritas en mamíferos y tienen capacidad regeneradora de las Prx. Además la expresión de estas sestrinas se encuentra regulada por la proteína P53 (Budanov *et al.*, 2004).

La inactivación de las Prx 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).

2. PEROXIRREDOXINAS VEGETALES

Como anteriormente se ha comentado, las Prx de vegetales se han clasificado en cuatro subgrupos en función de su secuencia aminoacídica y mecanismo catalítico: las peroxirredoxinas de 1-Cys (Prx de 1-Cys), peroxirredoxinas de 2-Cys (Prx de 2-Cys), peroxirredoxinas de tipo II y peroxirredoxina Q. Los distintos grupos de Prx presentan distinta distribución tisular, diferente regulación transcripcional y diferentes propiedades bioquímicas y estructurales, lo que sugiere que presenten distintos papeles biológicos (Dietz *et al.*, 2003,2006; Horling *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2000). Concretamente en *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado representantes de los cuatro grupos (Horling *et al.*, 2002, Dietz *et al.*, 2006). La figura 4 muestra la relación filogenética de las Prx encontradas en *Arabidopsis thaliana*.

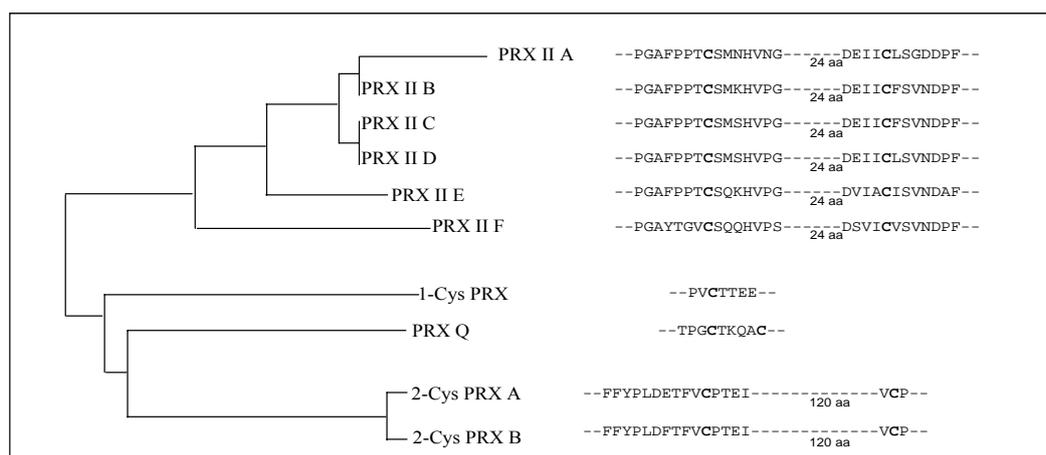


Figura 4. Árbol filogenético de las peroxirredoxinas de *Arabidopsis thaliana*

3. PRX DE 2-CYS

Las Prx de 2-Cys se encuentran ampliamente distribuidas entre todos los organismos. Se ha estudiado principalmente en levadura y células animales, en donde se le ha denominado Tiorredoxin peroxidasa (Tpx) debido a su vinculación con la Trx

en el proceso reductivo (Chae *et al.*, 1994a). En plantas fue el segundo miembro de la familia Prx identificado, se clonó primero de cebada y espinaca (Baier y Dietz, 1996 a,c) y posteriormente de *Arabidopsis thaliana* (Baier y Dietz, 1997), col china (Cheong *et al.*, 1999), centeno (Berberich *et al.*, 1998), *Phaseolus vulgaris* (Genot *et al.*, 2001), *Riccia fluitans* (Horling *et al.*, 2001) y guisante (Bernier-Villamor *et al.*, 2004).

Los miembros de este grupo se caracterizan por poseer dos residuos de cisteína que se corresponden con la Cys 47 y 170 de la Tpx de levadura. Los motivos peptídicos alrededor de las dos cisteínas, se encuentran altamente conservados, en el caso de la primera de ellas es DFTFVCPT y en la segunda es EVCPA.

3.1. LOCALIZACIÓN DE LAS PRX DE 2-CYS

Las Prx de 2-Cys constituyen en torno al 0.6% del total de proteínas del cloroplasto, lo que equivale a una concentración de 60 μ M (König *et al.*, 2002; Dietz, 2006). Un análisis proteómico comparativo de los cloroplastos del mesófilo y parénquima vascular se llevó a cabo para identificar nuevas proteínas y establecer diferencias funcionales entre los dos tipos de cloroplastos en plantas C₄. La Prx de 2-Cys se encontraba en mayor concentración en los cloroplastos del mesófilo que en los del parénquima vascular (Majeran *et al.*, 2005). Esta expresión preferencial de la Prx de 2-Cys está de acuerdo con los mayores requerimientos antioxidantes del mesófilo en las plantas C₄.

En plantas superiores la Prx de 2-Cys pertenece a una familia multigénica y se expresa ampliamente en todos los órganos de la planta madura, excepto en raíces donde su expresión es muy baja (Cheong *et al.*, 1999; Genot *et al.*, 2001).

En cebada la localización de la Prx de 2-Cys se vio mediante tres experimentos. En primer lugar durante el fraccionamiento de protoplastos de mesófilo

la Prx de 2-Cys se copurificó con los cloroplastos (Baier and Dietz 1997). En segundo lugar, en un sistema *in vitro* la proteína era post-traduccionamente importada a cloroplastos donde daba lugar a una proteína madura similar en tamaño a otras Prx de 2-Cys bacterianas y animales (Baier and Dietz., 1997). Por último en estudios inmunohistoquímicos en hojas de cebada la Prx de 2-Cys se detectó principalmente en cloroplastos donde se encontraba asociada principalmente a la membrana tilacoidal (König *et al.*, 2002).

En el caso de la Prx de 2-Cys de *Phaseolus vulgaris* se comprobó la localización de la proteína expresando en células de tabaco una construcción constituida por la unión del péptido señal de la Prx de 2-Cys al extremo 5' de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aqueoria victoria*, y se observó que se superponían perfectamente la fluorescencia verde de la GFP con la autofluorescencia roja de los cloroplastos (Genot *et al.*, 2001).

3.2. MECANISMO CATALÍTICO Y CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LAS PRX DE 2-CYS

Las Prx de 2-Cys existen funcionalmente como homodímeros formados por dos subunidades unidas por dos puentes disulfuro entre la cisteína más cercana al extremo amino (Cys peroxidática) de una subunidad con la cisteína más cercana al extremo carboxilo (Cys resolutora) de la otra subunidad. Su mecanismo de acción tiene lugar mediante un primer paso en el que la Cys peroxidática reducida de una subunidad es oxidada por un peróxido, dando como intermediario el ácido sulfénico (Cys-SOH) el cual interactúa con la Cys resolutora de la otra subunidad formando un puente disulfuro intermolecular en el homodímero y liberando agua (Figura 5).

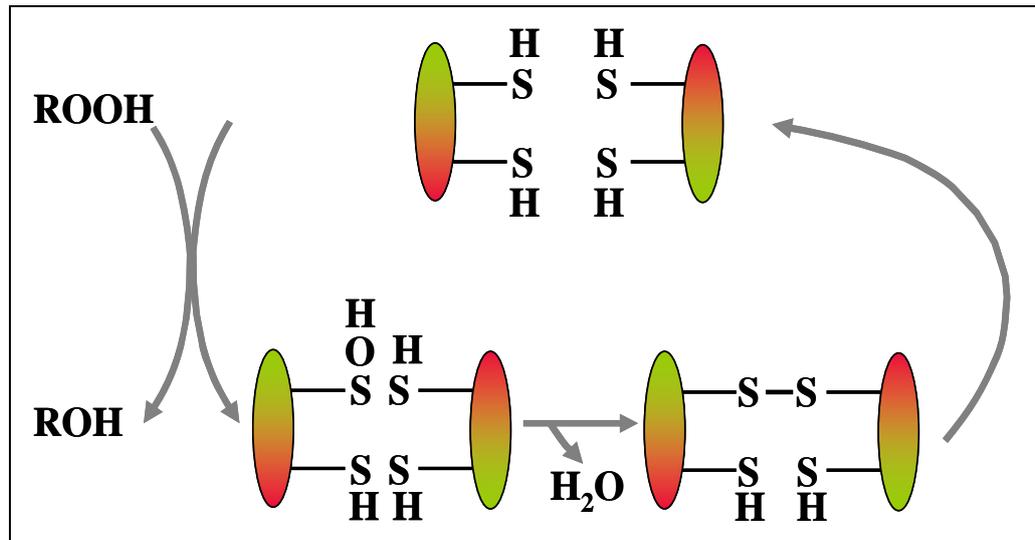


Figura 5. Mecanismo de acción de la Prx de 2-Cys.

La Prx de 2-Cys puede utilizar como donador de electrones no fisiológico al DTT, pero también se ha establecido para muchas Prx que las Trx sirven como donadores electrónicos fisiológicos para la regeneración de la forma activa. De esta manera la Trx une el estado redox de la proteína con el sistema NADPH o con otro donador electrónico. Así, *in vitro*, se ha visto que la Trx m y f de espinaca eran capaces de reducir la Prx de 2-Cys oxidada de cebada uniendo la reducción de la Prx a la cadena de transporte electrónica fotosintética (König *et al.*, 2002). También se ha observado una interacción directa de la Prx de 2-Cys de espinaca con una forma mutante de la Trx m (Motohasi *et al.*, 2001). En patata se ha visto la interacción entre un nuevo tipo de Trx cloroplastídica, una proteína de 32 kDa inducible por estrés, que reduce a la Prx de 2-Cys (Broin *et al.*, 2002) y, por último, recientemente se ha encontrado *in vitro* en *Arabidopsis thaliana* que la Trx f1, la Trx m1 y un nuevo tipo de Trx denominada Trx x son capaces de reducir a la Prx de 2-Cys, siendo la Trx x la más eficiente en esta reducción (Collin *et al.*, 2003).

En un ensayo con la Prx de 2-Cys de cebada (König *et al.*, 2003) en el que se comparó la actividad peroxidasa usando DTT o Trx de *E.coli* como donador electrónico, se observó que la actividad con DTT era aproximadamente la mitad de la que presentaba con la Trx lo que sugiere que ésta reduce más eficientemente a la Prx de 2-Cys.

En estudios recientes se ha publicado cómo la cilofilina (Cyp20-3), perteneciente a las peptidil-prolil-cis-trans isomerasas, es capaz de cederle los electrones a la Prx de 2-Cys de *arabidopsis* (Dietz *et al.*, 2006) si bien el precedente quedó asentado en 2004 cuando Bernier-Villamor y colaboradores mostraron tal interacción en un ensayo *in vitro* de protección del DNA con la Prx de 2-Cys de guisante.

En los últimos años se ha identificado una proteína cloroplastídica bifuncional con un dominio Trx y otro NADPH tiorredoxin reductasa (NTR) (Serrato *et al.*, 2004) que manifiesta una mayor eficiencia catalítica para regenerar a las Prx de 2-Cys (Pérez-Ruiz *et al.*, 2005).

Bajo condiciones altamente oxidantes, la Cys peroxidática es oxidada a ácido sulfínico (Cys-SO₂H) o sulfónico (Cys-SO₃H), y en este estado de “ sobreoxidación “, las dos cisteínas catalíticas que interactúan, que se encuentran localizadas en diferentes subunidades del dímero y separadas por más de 10 Å, no pueden formar el puente disulfuro. Como consecuencia de esto la enzima queda atrapada en una conformación que no puede ser reactivada por reducción típica. Sin embargo, recientes estudios han puesto de manifiesto cómo las sulfirredoxinas y sestrinas son capaces de regenerar específicamente este tipo de Prx de 2-Cys (Budanov *et al.*, 2004; Rhee *et al.*, 2005).

Se ha demostrado, por mutagénesis dirigida en Prx de 2-Cys que no son de vegetales, que la Cys peroxidática es esencial para la actividad peroxidasa (Chae *et al.*,

1994c; Montemartini *et al.*, 1999). Recientemente en vegetales, en concreto en cebada (König *et al.*, 2003), se ha visto mediante mutagénesis dirigida que la Cys peroxidática efectivamente es esencial para la actividad de la enzima. En estos mismos experimentos se ha evidenciado que la Cys resolutora no es imprescindible para la actividad de la Prx de 2-Cys aunque sí para la regeneración por Trx ya que el mutante Cys resolutora→Ser presentaba mayor actividad peroxidasa dependiente de DTT que la Prx de 2-Cys de tipo salvaje, mientras que no presentaba actividad cuando el donador electrónico era la Trx. Esto probablemente es debido a que en el mutante Cys resolutora→Ser, la Cys peroxidática se oxidaba a ácido sulfénico y podía ser reducido por el DTT más eficientemente (19 veces más) que el puente disulfuro formado en la Prx de 2-Cys de tipo salvaje. Sin embargo la formación del puente disulfuro entre las dos cisteínas de las dos subunidades del dímero es esencial para la regeneración por Trx, por lo que el mutante Cys resolutora→Ser era inactivo en el ensayo en que se utilizaba Trx como donador electrónico.

Las Prx presentan una amplia especificidad de sustrato, reducen un amplio rango de alquilhidroperóxidos incluyendo alquilhidroperóxidos de cadena larga y corta, fosfolipoperóxidos y peróxido de colesterol (Nogoceke *et al.*, 1997; Hillas *et al.*, 2000); asimismo, también reducen peróxidos reactivos de nitrógeno (Lim *et al.*, 1993; Bryk *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2003). Sin embargo la especificidad de sustrato de las peroxirredoxinas vegetales no ha sido estudiada todavía en detalle.

La actividad de las Prx hacia el H₂O₂ está bien establecida. Así, se ha visto, que la Prx de 2-Cys de col china (Cheong *et al.*, 1999) y de *Phaseolus vulgaris* (Genot *et al.*, 2001) protegen al DNA del daño oxidativo en la presencia de un sistema de oxidación funcional mixto consistente de Fe³⁺, O₂, y tioles; en presencia de este mismo sistema la Prx de 2-Cys de col china evitaba la inactivación de una enzima como la glutamina sintetasa.

La reducción de la Prx de 2-Cys se lleva a cabo, en bacterias y células animales, por el sistema Trx. La tiorredoxín reductasa (TR), Trx y Prx de 2-Cys forman una cadena redox que acopla la reducción de peróxidos a la oxidación del NADPH. La reconstitución de esta cascada redox puede realizarse *in vitro* (Cheong *et al.*, 1999; Dietz *et al.*, 2001). Utilizando la TR y la Trx de *E. coli* y como sustrato el H₂O₂ se vio que a concentraciones de 10 a 25 μM de H₂O₂ la actividad reductora de la Prx de 2-Cys de cebada (König *et al.*, 2003) era igual de alta que a concentraciones de 50 y 100 μM de H₂O₂. Del análisis cinético se estimó que la K_M (H₂O₂) era inferior a 2 μM. A concentraciones mayores de H₂O₂, 1 mM, la Prx de 2-Cys se inactivaba alrededor del 50%.

Recientemente se han realizado estudios con la Prx de 2-Cys de cebada, utilizando el mismo sistema con otros sustratos: el t-butil hidroperóxido (TBHP), hidroperóxido de cumeno e hidroperóxidos lipídicos complejos como hidroperóxido de ácido linoleico e hidroperóxido de dilinoleil fosfatidilcolina (König *et al.*, 2003) y se ha estudiado la actividad de la Prx de 2-Cys hacia los distintos sustratos, incluyendo el H₂O₂. Así se ha visto que la mayor actividad se presentaba cuando el sustrato era el TBHP con una k_{cat} de 15.7±0.8 min⁻¹, seguido por el H₂O₂ con una k_{cat} =13.6±1.2 min⁻¹. La reducción del hidroperóxido de cumeno era menor con una k_{cat}=10.7±0.84 min⁻¹, y los hidroperóxidos lipídicos complejos se reducían en una proporción bastante menor, k_{cat}=3.0±0.1min⁻¹ para el hidroperóxido de ácido linoleico y k_{cat}=0.88±0.14min⁻¹ para el hidroperóxido de dilinoleil fosfatidilcolina.

Por otra parte, en un sistema basado en la reducción de la Prx de 2-Cys con DTT o con Trx de *E.coli* (König *et al.*, 2003), se ha visto que la Prx se inactiva en mayor o menor grado en función del tamaño del sustrato y que esta inactivación es independiente del mecanismo de regeneración de la enzima (DTT o Trx). Así la cantidad de Prx inactivada era menor con H₂O₂ < TBHP < hidroperóxido de cumeno < hidroperóxido de ácido linoleico < hidroperóxido de dilinoleil fosfatidilcolina.

El H₂O₂ y el TBHP también son sustratos para la Prx de 2-Cys de cianobacterias. En ausencia de otros aceptores de electrones, la adición de cualquier peróxido inducía la formación de oxígeno en *Synechocystis* de tipo salvaje (Yamamoto *et al.*, 1999). La aparición del oxígeno liberado inducido por peróxido en la fotosíntesis estuvo acompañado de “*quenching*” de la fluorescencia de la clorofila a, lo cual indica una liberación dependiente de peróxido de la energización de los transportadores electrónicos tilacoidales.

También se ha visto *in vitro* que la Prx de 2-Cys de *Arabidopsis thaliana* es capaz de descomponer el peroxinitrito (Sakamoto *et al.*, 2003). Usando como sonda sensible a peroxinitrito la dihidrorodamina 123 se vio que la Prx de 2-Cys, previamente reducida con DTT, era capaz de proteger a la dihidrorodamina de la oxidación mediada por peroxinitrito, mientras que no era capaz de tal protección cuando la Prx se oxidaba previamente con H₂O₂.

3.3. ESTRUCTURA DE LAS PRX DE 2-CYS

Las Prx de 2-Cys son dímeros funcionales con una propensión significativa a oligomerizar. Estas enzimas ciclan entre el dímero y el estado decamérico con forma de toroide (Wood *et al.*, 2002). El dímero se caracteriza por una estructura compacta y de orientación paralela de las hojas β de ambas subunidades permitiendo la formación del puente disulfuro intermolecular durante la reacción catalítica (König *et al.*, 2003, Echalié *et al.*, 2005).

Desde 1998 se han publicado numerosas estructuras cristalinas correspondientes a Prx de 2-Cys: HBP23 de rata (Hirotsu *et al.*, 1999), TPxB o Prx II de eritrocitos humanos (Schröder *et al.*, 2000), TryP de *Crithidia fasciculata* (Alphey *et al.*, 2000) y AhpC de *Salmonella typhimurium* (Wood *et al.*, 2002), *Mycobacterium tuberculosis* (Rho *et al.*, 2006), *Plasmodium falciparum* (Boucher *et al.*, 2006).

Tres de las Prx de 2-Cys descritas (TPxB, TryP y AhpC) cristalizaron como complejos decaméricos con forma de toroide consistentes en la unión pentamérica de dímeros (un decámero $(\alpha_2)_5$). De ellas la TPxB y la TryP se encontraban en forma reducida y la AhpC en una forma oxidada metaestable. La AhpC de *Amphibacillus xylanus*, otra Prx de 2-Cys, también cristaliza como un decámero $(\alpha_2)_5$ (Kitano *et al.*, 1999), pero aún no se han dado informes sobre la estructura cristalina de la enzima. La cuarta Prx de 2-Cys resuelta, HBP23, cristalizó como un dímero α_2 en forma oxidada. Otra de las Prx de 2-Cys cristalizadas corresponde a una isoforma mitocondrial de *P. falciparum*; esta enzima se cristalizó como dímero oxidado con un puente disulfuro intermolecular aunque los estudios analíticos de ultracentrifugación mostraron, en función a los coeficientes de sedimentación, que en solución la forma predominante se correspondía con un decámero (Boucher *et al.*, 2006).

Las estructuras cristalinas de las formas reducidas (TryP de *Crithidia fasciculata* y TPxB de eritrocitos humanos), oxidada (HBP23 de rata) y metaestable oxidada (AhpC de *Salmonella typhimurium*) mostraron que la reducción del puente disulfuro induce un cambio conformacional en la estructura cuaternaria de una forma dimerica a una forma decamerica con forma de toroide dando las bases para establecer un ciclo catalítico estructuralmente detallado (Wood *et al.*, 2002, 2003b).

La topología esencial del monómero de las Prx de 2-Cys consiste en un elipsoide aplanado construido alrededor de siete cadenas de láminas β con alineamientos paralelos y antiparalelos. La lámina está situada entre cuatro o cinco hélices α . Contienen un plegamiento tipo Trx con elementos adicionales de estructura secundaria presentes como inserciones.

La dimerización resulta en una lámina β extendida que contiene 14 cadenas (7 de cada monómero) con la interfase formada entre las cadenas antiparalelas β_7 y β_7' . El dímero α_2 forma un elipsoide aplanado. Son homodímeros, y cada dímero contiene

dos sitios activos idénticos en los que el carboxilo terminal atraviesa la interfase del dímero para interactuar con la otra subunidad y formar el disulfuro redox activo. En este brazo carboxilo terminal se encuentra la Cys resolutora. Las interacciones en la interfase monómero-monómero tienen lugar mediante puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals.

La decamerización tiene lugar a través de la interacción de una subunidad con otras dos. Una interfase monómero-monómero produce un dímero y hay una interfase dímero-dímero, la cual se repite para formar el decámero heterólogo. Como consecuencia del ensamblaje de cinco dímeros se crea un anillo decamérico. Las interacciones que tienen lugar en la interfase dímero-dímero son principalmente de tipo hidrofóbico aunque también existen uniones por puentes de hidrógeno. Las dimensiones del anillo decamérico son de unos 120 Å de diámetro externo y unos 60 Å de diámetro interno (Alphey *et al.*, 2000).

3.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PRX DE 2-CYS

La expresión de los genes de la Prx de 2-Cys está bajo control del estado redox y del desarrollo (Kandlbinder *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006). El nivel de mRNA disminuye con la edad de la planta en cebada (Baier and Dietz., 1996b), *Arabidopsis* (Baier and Dietz, 1999b) y *Riccia fluitans* (Horling *et al.*, 2001). Independientemente de la disminución en la abundancia de mensajero, la proteína se acumulaba con la maduración del tejido y no cambiaba con la edad bajo condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, las respuestas de desarrollo de ambas, mRNA y proteína, todavía necesitan estudiarse con más detalle bajo condiciones de estrés oxidativo.

Regulación de la expresión de las Prx de 2-Cys por el estado redox.

Los cambios redox dependientes en la expresión del gen de la Prx de 2-Cys se han estudiado en *Riccia fluitans* (Horling *et al.*, 2001), que se tomó como modelo vegetal debido a la simple aplicación del protocolo para los efectores ascorbato y GSH, que constituyen los dos principales antioxidantes de bajo peso molecular, y además el glutatión oxidado (GSSG).

Se observó que cuando se aplicaba ascorbato al medio la cantidad de transcrito de la Prx de 2-Cys disminuía rápida y significativamente. Una caída severa de la abundancia del transcrito se observó tan sólo 2 horas después de comenzar el tratamiento. Veinticuatro horas después de transferir al medio ascorbato en una concentración de 10 mM, el transcrito de la Prx de 2-Cys no se detectaba. La disminución del mRNA de la Prx de 2-Cys inducida por ascorbato se impedía al pretratar el tallo con el inhibidor de la actividad proteinkinasa, la estaurosporina. Aparentemente, el ascorbato promueve una ruta de transducción de señales redox en la que se ve envuelta la fosforilación de alguna proteína y suprime la expresión de la Prx de 2-Cys.

Suplementando el medio con GSH se producía una disminución en la cantidad de transcrito a concentraciones de 0.1 mM, pero no se observaba una disminución mayor a concentraciones superiores de GSH. Igualmente, cuando se suministraba GSSG, también se producía una disminución del mRNA de la Prx de 2-Cys.

También se han realizado estudios de la regulación redox dependiente en cebada (Baier and Dietz., 1997), *Phaseolus vulgaris* (Genot *et al.*, 2001), col china (Cheong *et al.*, 1999) y *Arabidopsis thaliana* (Horling *et al.*, 2003).

Al contrario de lo que sucedía en *Riccia fluitans*, los tioles administrados a hojas de cebada disminuían el nivel de transcrito de la Prx de 2-Cys de una manera dependiente de la concentración (Baier and Dietz., 1997).

Cuando se establecen condiciones oxidantes, con la administración de metilviológeno, H₂O₂ o metales, la expresión de la Prx de 2-Cys sólo se estimula ligeramente y no se afecta por tratamientos con ozono, ácido abscísico o ácido giberílico (Cheong *et al.*, 1999; Genot *et al.*, 2001; Baier and Dietz., 1997).

Recientemente se han realizado estudios más completos de la regulación de la expresión de la Prx de 2-Cys en *Arabidopsis thaliana* (Horling *et al.*, 2003). Ésta presenta la particularidad de poseer dos Prx de 2-Cys, A y B, que se diferencian en tan sólo siete aa (Horling *et al.*, 2002). Cuando se trataron plantas de *Arabidopsis* con oxidantes y pro-oxidantes como H₂O₂, TBHP y diamida, sólo la Prx de 2-Cys A incrementaba ligeramente. Cuando se les aplicaba ascorbato, se producía una disminución del mRNA tanto de la Prx de 2-Cys A como de la B, siendo la respuesta dependiente del tiempo de incubación y de la concentración del efector. Se observó una ligera diferencia en la respuesta de cada una de las Prx de 2-Cys al ascorbato, siendo la Prx de 2-Cys B más sensible a concentraciones más bajas de ascorbato.

La pequeña respuesta a agentes oxidantes no deja de ser curiosa ya que el homólogo bacteriano de la Prx de 2-Cys, AhpC, se identificó inicialmente por su fuerte respuesta bajo exposición a TBHP y H₂O₂ (Morgan *et al.*, 1985).

En 2002, Broin *et al.* pusieron de manifiesto que la Prx de 2-Cys era diana de una proteína del tipo Trx, la proteína cloroplastídica de estrés inducida por sequía (CDSP32). Actualmente se hipotetiza que la interacción entre la CDSP32 y Prx de 2-Cys juega un papel en la regulación redox dependiente por asociación con proteínas diana y no mediante detoxificación catalítica de peróxidos (Dietz *et al.*, 2006).

Regulación de la expresión de las Prx de 2-Cys por luz.

En células vegetales, el estado redox celular está íntimamente relacionado con la fotosíntesis, por lo que se han estudiado los efectos en los cambios de intensidad de luz en la expresión de la Prx de 2-Cys en *Arabidopsis thaliana* (Horling *et al.*, 2003). El exceso de luz potencia las respuestas de aclimatación a distintos niveles metabólicos y genéticos con diferentes cinéticas. Así se obtienen respuestas rápidas como el estado de transición y la síntesis de violaxantina para redirigir la energía de excitación y evitar la disipación de energía (Dietz *et al.*, 2001). Incrementando excesivamente el flujo de fotones se inducen cambios en la expresión de genes plastídicos y nucleares, entre los que se incluyen las proteínas de los complejos de captación de luz y proteínas del centro de reacción (Escoubas *et al.*, 1995; Pfanschmidt *et al.*, 1999) y finalmente se obtiene una regulación positiva de genes de defensa antioxidantes tanto local como sistémicamente (Mullineaux *et al.*, 2000).

En el caso de la Prx de 2-Cys las plantas de *Arabidopsis* se sometieron tanto a altas como a bajas intensidades de luz (a un exceso o una disminución de 10 veces) (Horling *et al.*, 2003). Los niveles de mRNA de la Prx de 2-Cys A disminuyeron ligeramente cuando se sometió a altas intensidades de luz mientras que los de la Prx de 2-Cys B apenas se afectaron. Pero cuando se sometían a bajas intensidades de luz, ambas disminuían considerablemente a nivel transcripcional, siendo prácticamente imperceptibles entre las 4 y 8 horas de tratamiento. Sin embargo a nivel proteico, tanto a altas como a bajas intensidades de luz, la Prx de 2-Cys incrementaba.

De este estudio se puede concluir que la Prx de 2-Cys se expresa casi al máximo nivel bajo condiciones normales de fotosíntesis, así que sólo es posible una baja regulación positiva por exceso de luz. Por el contrario, puede presentar una regulación negativa cuando la presión de la excitación disminuye sustancialmente, por ejemplo cuando la actividad del metabolismo oxidativo es bajo. El hecho de que a nivel proteico, tanto a alta como a baja intensidad de luz, la expresión aumente resulta

contradictorio, pero los procesos que inducen la regulación de la expresión a bajas intensidades de luz aún se desconocen.

Regulación de la expresión de las Prx de 2-Cys por estrés salino.

Se sabe que la salinidad causa estrés oxidativo, y la tolerancia a sal está relacionada con la inducción de defensas antioxidantes (Hernández *et al.*, 2000; Shalata *et al.*, 2001). Horling *et al.* (2002) estudiaron la regulación de la expresión de la Prx de 2-Cys por estrés salino a corto plazo sobre plantas de *Arabidopsis*. Ésta es una planta mesófito sensible a sal que tolera exposiciones hasta de 50 mM de NaCl, pero desarrolla síntomas de toxicidad a concentraciones superiores. Cuando las plantas de *Arabidopsis* se sometieron a estrés salino se observó que se producía una gran disminución del mRNA tanto de la Prx de 2-Cys A como de la B, lo que puede observarse ya a las dos horas tras el tratamiento y de una forma dependiente del tiempo.

Regulación de la expresión de las Prx con la edad.

Determinaciones del nivel de transcrito de las Prx de 2-Cys en función del tiempo mediante arrays han evidenciado cómo la Prx de 2-Cys A presentaba una mayor intensidad que otras Prx (2-Cys B, Prx Q, Prx E o PrxII F). Sin embargo, los niveles del transcrito decayeron a partir de los 29 días de edad, hecho que se correlaciona con la pérdida de clorofila. Curiosamente el análisis por microarray con el “Genevestigator” (Zimmerman *et al.*, 2004, <http://www.genevestigator.ethz.ch>) mostró cómo los niveles de la Prx de 2-Cys A y B descendieron notablemente tras la infección de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *P. infestans* (Dietz *et al.*, 2006).

3.5. INACTIVACIÓN DE LAS PRX DE 2-CYS *IN VIVO* BAJO TRATAMIENTOS DE ESTRÉS

Bajo condiciones no reductoras, la Prx de 2-Cys reducida inicialmente se oxida a la forma disulfuro en la presencia de O₂ atmosférico (König *et al.*, 2002). En experimentos *in vitro* se ha visto que los derivados de ácido sulfínico de la Prx sólo se forman cuando la Prx es reducida por reductores como la Trx, pero simultáneamente tiene que haber presentes concentraciones altas de peróxidos, por ejemplo en una situación redox en las que hay actividades reductoras y oxidantes (Yang *et al.*, 2002). Tales condiciones redox aparentemente contradictorias se encuentran frecuentemente *in vivo* bajo condiciones de estrés. König *et al.* (2003) han estudiado el efecto que tales situaciones podían tener en la inactivación de la enzima de cebada. Para ello sometieron a plantas de cebada a tratamientos por estrés salino, tratamientos con frío (4°C) y luz continua o por sequía y alta luz, asimismo también se recogieron hojas senescentes. Posteriormente por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y *Western-blot* se analizó la aparición de formas monoméricas correspondientes a las formas sobreoxidadas y se vio que en el caso de las muestras sometidas a estrés salino se detectaba muy poca cantidad de monómeros, pero en las estresadas con frío y por sequía así como en las hojas senescentes la forma monomérica de la Prx se detectaba en cantidades significativas.

Por otra parte, cuando se sometían líneas transgénicas de patata, que no contienen una Trx cloroplastídica, a tratamientos de estrés fotooxidativo producido por metilviológeno, se observaba un aumento de la forma sobreoxidada inactiva de la Prx de 2-Cys (Broin *et al.*, 2003).

König *et al.* (2002) postularon que la acumulación de oligómeros inactivos de la Prx de 2-Cys asociados a membrana es redox dependiente y que la enzima actúa como un sensor estructural redox en la membrana tilacoidal. Sugieren que la forma reducida de la Prx de 2-Cys sólo se puede acumular si el potencial redox cae por

debajo de -315 mV y que la unión de la forma reducida a la membrana tilacoidal indica una alta presión electrónica en la cadena de transporte electrónico. Si la percepción de la energía luminosa excede la capacidad de utilización de la misma, la energía de excitación y los equivalentes de reducción generados hacen que la cantidad de especies de oxígeno reactivo aumenten, por ejemplo vía reacción de Mehler (Mehler., 1951) y los peróxidos formados son destoxificados por la Prx de 2-Cys, unida a la membrana tilacoidal, en el sitio de su producción. La enzima oxidada se oligomeriza y permanece unida, como la forma reducida, a las membranas tilacoidales (figura 6). La unión aumenta con la presión electrónica en la cadena de transporte electrónico fotoquímico. Un incremento en el potencial redox disocia los complejos oxidados de la Prx de 2-Cys, quedando la forma oxidada de la enzima como dímeros solubles en el estroma.

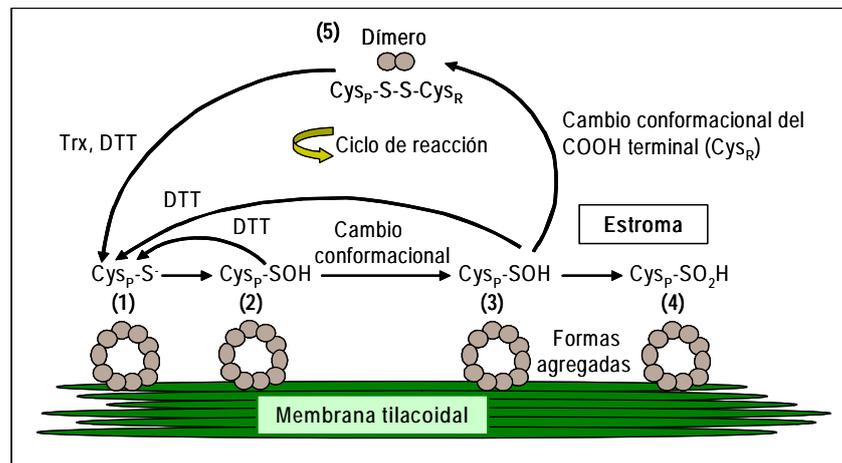


Figura 6. Modelo postulado por Köning *et al.* del mecanismo de reacción de las Prx de 2-Cys. La Prx de 2-Cys existe como un decámero reducido (1) y se oxida en dos pasos a la forma de ácido sulfénico (2 y 3). El decámero queda asociado a la membrana tilacoidal cuando tiene lugar la sobreoxidación (4). El ciclo normal catalítico comprende la formación del puente disulfuro con una cambio conformacional (5). La Trx o el DTT regeneran la forma activa (1). (Cys_p): cisteína peroxidática. (Cys_R): cisteína resolutora.

4. PEROXIRREDOXINAS DE TIPO II

4.1. GENERALIDADES

Las Prx de tipo II se descubrieron mediante un chequeo de proteínas que se unían a una Trx h modificada, primero en levadura (YLR109), y posteriormente por homología de secuencias en vegetales, en *Arabidopsis thaliana*, y en animales (Verdoucq *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 1999).

Estas proteínas poseen dos cisteínas conservadas que se encuentran separadas por menos aminoácidos que en las Prx de 2-Cys (sólo 24 aminoácidos las separan en *Arabidopsis thaliana*). La secuencia conservada alrededor de la primera cisteína suele ser VPGAFTPTCS como se puede observar en la figura 7, donde se muestra el alineamiento entre 5 Prx de tipo II de *Arabidopsis thaliana*. Las Prx tipo II son proteínas monoméricas y suelen tener unos 160 aa, si no se consideran los posibles péptidos de tránsito (Declerq *et al.*, 2001). Sus puntos isoeléctricos varían de unas a otras al igual que su localización (Choi *et al.*, 1999; Rouhier *et al.*, 2001; Horling *et al.*, 2002).

A este grupo pertenecen, en plantas superiores, diversas proteínas que difieren en su masa molecular, punto isoeléctrico y localización subcelular; así en *Arabidopsis thaliana* se han encontrado seis genes que codifican Prx de tipo II, de los cuales uno se cree que es un pseudogen (Prx A) y los otros cinco codifican las Prx B, C, D, E y F. Las Prx B, C y D se localizan en el citosol, la Prx E es cloroplastídica y a la Prx F se le dio una localización mitocondrial (Kruft *et al.*, 2001; Horling *et al.*, 2002; Bréhélein *et al.*, 2003; Finkemeier *et al.*, 2005, Dietz *et al.*, 2006).

AtPrxIIC	---MAPITVGDVVP----DGTISFFDEND-QLQTVSVHSIAAGKKVILFGVPGAFPTPTCS	52
AtPrxIID	---MAPITVGDVVP----DGTISFFDEND-QLQTVSVHSIAAGKKVILFGVPGAFPTPTCS	52
AtPrxIIB	---MAPIAVGDVVP----DGTISFFDEND-QLQTASVHSLAAGKKVILFGVPGAFPTPTCS	52
AtPrxIIE	----ASISVGDKLP----DSTLSYLDPSTGDVKTVTVSSLTAGKKTILFAVPGAFPTPTCS	52
AtPrxIIF	SKLAEGTDITSAAPGVSLQKARSWDEGVSSKFSITPLSDIFKGGKVVIFGLPGAYTGVCS	60
AtPrxIIC	MSHVPGFIGKAEELKSKGIDEIICFSVNDPFVMKAWGKTYPENKHVKFVADGSGEYTHLL	112
AtPrxIID	MSHVPGFIGKAEELKSKGIDEIICFSVNDPFVMKAWGKTYQENKHVKFVADGSGEYTHLL	112
AtPrxIIB	MKHVPGFIEKAEELKSKGVDEIICFSVNDPFVMKAWGKTYPENKHVKFVADGSGEYTHLL	112
AtPrxIIE	QKHVPGFVSKAGELRSKGIDVIAICISVNDAFVMEAWRKDLGINDEVMLLSDGNGEFTGKL	112
AtPrxIIF	QQHVPSYKSHIDKFKAKGIDSVICFSVNDPFAINGWAEKLGAKDAIEFYGDFDKGFHKSL	120
AtPrxIIC	GLELDLKDK--GLGIRSRRFALLDNLKVTVANVESG-GEFTVSSAEDIKAL	162
AtPrxIID	GLELDLKDK--GLGIRSRRFALLDNLKVTVANVENG-GEFTVSSAEDIKAL	162
AtPrxIIB	GLELDLKDK--GLGVRSRRFALLDLDLKVTVANVESG-GEFTVSSADDIKAL	162
AtPrxIIE	GVELDLRDKPVGLGVRSRRYAILADDGVVKVNLLEEG-GAFTNSSAEDMKAL	164
AtPrxIIF	GLDKDLSAA--LLGPRSERWSAYVEDGKVKAVNVEEAPSDFKVTGAEVILGQI	171

Figura 7. Alineamiento de 5 Prx de tipo II de *Arabidopsis thaliana*; AtPrxII C (At1g65970), AtPrxIID (At1g60740), AtPrxIIB (At1g65980), AtPrxIIE (At3g52960) y PrxIIF (Atg3go6050). Con letra roja y subrayado amarillo se encuentran las cisteínas características de las Prx de tipo II. El subrayado en gris representa otros restos aminoacídicos conservados.

La Prx II A de *Arabidopsis* es la más atípica de todas las Prx vegetales de tipo II pues presenta una secuencia proteínica predicha consistente en dos partes y a la que se ha estimado un peso de 63 KDa. El dominio N-terminal contiene una secuencia altamente conservada de las Prx tipo II, que es seguida por una región homóloga a una proteína F-Box y el extremo carboxilo-terminal se caracteriza por un alto contenido en cisteínas. Se conocen proteínas híbridas de Prx en procariotas, como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza*, *Nostoc Spec* o *Chromatium gracile* que contienen un dominio Prx y otro glutaredoxina (Rouhier and Jacquot, 2003). Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado ninguna proteína homóloga a la PrxII A en las bases de datos. Se han realizado numerosos ensayos a fin de encontrar la PrxII A pero ninguno ha dado fruto hasta la fecha. El grupo del Profesor Dietz en la universidad de Bielefeld probó numerosas combinaciones de cebadores que amplificaran esta proteína mediante RT-PCR con cDNA de hojas o raíces, hasta la fecha, sin resultado. Esto podría indicar que la PrxII A es efectivamente un pseudogen. Igualmente se pensaba de la PrxII D. Tras una corrección en la anotación de la

secuencia genómica fue posible detectar los transcritos de la PrxII D en hojas y raíces de *Arabidopsis*. Una anotación incorrecta en la predicción intrónica-exónica podría estar ocurriendo también en el caso del gen de la PrxII A por lo que no se descarta su existencia como proteína. En definitiva, para dilucidar si existe la denominada PrxII A se vislumbran numerosos intentos con técnicas de proteómica y biología molecular.

Las secuencias proteínicas de las PrxII B, C y D de *Arabidopsis* contienen 162 aa y tienen una masa molecular de 17.4 KDa. Con una identidad de entre el 93.2-98.8% en sus residuos aminoacídicos puede hablarse de una alta similitud entre ellas.

La Prx II E de *Arabidopsis* consta de 234 aa, con una masa molecular de 24.68 KDa y un péptido señal cloroplastídico de 70 aa situado en la región amino-terminal. Su secuencia aminoacídica sin el péptido señal presenta una similitud del 84.5% con respecto a la PrxII C.

La PrxII F de *Arabidopsis* consta de 199 aa, con una masa molecular de 21.2 KDa y un péptido señal predeterminado de 28 aa. Esta enzima se encuentra más distanciada filogenéticamente de otras Prx tipo II aunque la proteína madura presenta un 76% de similitud con la PrxII C.

4.2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PRX VEGETALES DE TIPO II

Analizando las secuencias proteínicas con los programas de predicción Target P o Psort, no se encuentran péptidos señales para las Prx tipo II B,C y D de *Arabidopsis*. En base a ello, se predice que su localización es citosólica. Sin embargo, estudios inmunocitoquímicos con anticuerpos específicos muestran cómo la PrxII C y PrxII E de *Arabidopsis* aparecen en el citosol y cloroplasto respectivamente. La PrxII B se ha encontrado en todos los tejidos en que se ha experimentado, tanto en A.

thaliana o álamo mientras que la PrxII C y D se encuentran casi exclusivamente en polen (Rouhier *et al.*, 2005).

Una de las Prx tipo II más estudiadas es la PrxII F de *Arabidopsis thaliana*. Primeramente, Krufft *et al.*, (2001) detectaron la PrxII F madura en un experimento de proteómica. La localización mitocondrial de la PrxII F de *Arabidopsis thaliana* fue probada por detección inmunológica con anticuerpos específicos frente a la misma y por detección en fraccionados mitocondriales de hojas de *Arabidopsis thaliana* en análisis por Western blot. Mediante comparación de los niveles de enzima en matriz y membrana mitocondrial se vio que la PrxII F se encontraba fundamentalmente en la matriz (Finkemeier *et al.*, 2005). Dietz *et al.* (2006) sugieren que las organelas que contienen su propio DNA (como es el caso de la mitocondria) dependen de la presencia de Prx de codificación nuclear y por tanto la fotosíntesis tendría una gran relevancia en la presencia de tres tipos diferentes de Prx en el cloroplasto.

La PrxII E fue detectada en cloroplastos y en fracción de tilacoides de *Arabidopsis thaliana* en dos estudios proteómicos (Peltier *et al.*, 2002; Peltier *et al.*, 2004). La localización plastídica fue demostrada posteriormente mediante Western blot de diferentes fraccionados celulares, con experimentos de importe con proteína PrxII E radiomarcada (Bréhélin *et al.*, 2003) y mediante inmunolocalización. A diferencia de otras Prx de 2-Cys o de la Prx Q, la PrxII E no se ha encontrado unida fuertemente a las membranas de tilacoides sino que predominaba en la fracción soluble del estroma (Dietz *et al.*, 2004). La Prx II E se expresa mayoritariamente en los tejidos reproductivos. Al igual que ocurría con la Prx de 2-Cys, la PrxII E se encuentra fundamentalmente en cloroplastos de mesófilo (Majeran *et al.*, 2005). Curiosamente, la PrxII C de álamo fue detectada mediante inmunolocalización en estructuras tipo plastídico del floema (Rouhier *et al.*, 2001). Esta localización podría explicar el reconocimiento de esta proteína frente a los anticuerpos de la PrxII E.

4.3. MECANISMO CATALÍTICO Y CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DE LAS PRX DE TIPO II

El primer paso en la catálisis es común para todas las Prx produciéndose un ataque nucleofílico del grupo tiol de la cisteína peroxidática al sustrato permitiendo así la formación del intermediario sulfénico (SOH). En un principio, se creyó que esta especie parcialmente oxidada reaccionaba entonces con la segunda cisteína formando un puente disulfuro intramolecular (figura 8.A). Sin embargo estudios de mutagénesis dirigida con una Prx de tipo II de álamo, donde la cisteína peroxidante se cambió hasta serina, mostró que sólo la primera de las dos cisteínas es esencial para la actividad catalítica (Rouhier *et al.*, 2002). Por tanto, el intermediario de ácido sulfénico formado en el sitio activo por la reducción del peróxido, sería reducido directamente por el grupo sulfhidriilo de un reductor como el DTT (figura 8.B). Se ha visto, que en el caso de las Prx de tipo II, en vegetales, este reductor puede ser la Trx, la glutarredoxina o el glutatión (Rouhier *et al.*, 2005; Finkemeier *et al.*, 2005).

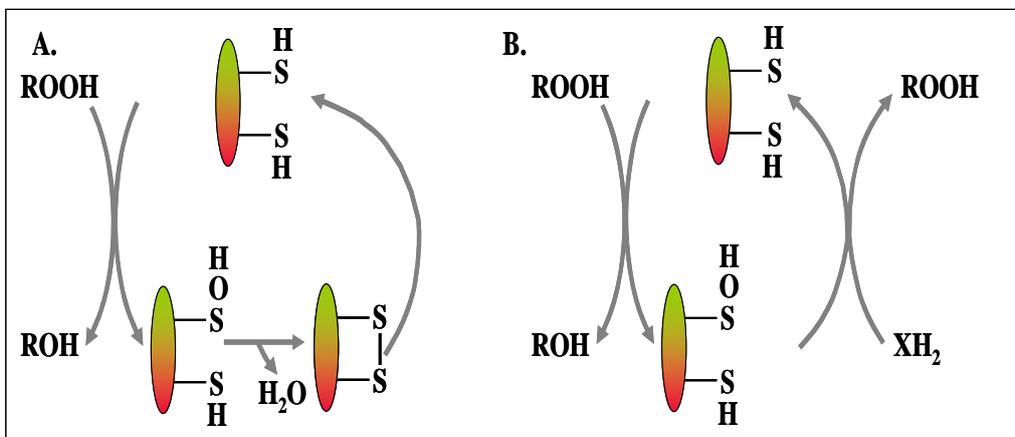


Figura 8. Posibles mecanismos de acción de las Prx tipo II. **A.** Mecanismo de acción supuesto para las Prx de tipo II. **B.** Mecanismo de acción de las Prx de tipo II propuesto por Rouhier *et al.* (2001).

La formación de un puente disulfuro intramolecular se ha constatado tanto en la Prx II F como en las Prx II B y E de *Arabidopsis thaliana* (Bréhélin *et al.*, 2003; Finkemeier *et al.*, 2005). Las formas oxidadas resueltas de las Prx en geles SDS-PAGE se presentan a una altura diferente de la observada para sus formas reducidas.

El grupo del Dr. Dietz tomó todas las Prx de tipo II recombinantes descritas para *Arabidopsis thaliana* que fueron sobreexpresadas con colas de histidina y purificadas en columnas de níquel a fin de realizar todos los ensayos enzimáticos y catalíticos. En test *in vitro* con DTT o tiorredoxina como regenerador reductivo de la peroxirredoxina oxidada, todas las Prx mostraron actividad reductora del peróxido de hidrógeno pero con fuertes diferencias cuantitativas y diferente especificidad para el DTT o tiorredoxina como donadores electrónicos en la reacción de regeneración. La mayor actividad peroxidasa de todas, con 156 moles de peróxido de hidrógeno por mol de Prx y minuto fue medida para la Prx II C en el test con DTT (Horling *et al.*, 2003). Actividades con menor rango se describieron para las Prx II B, E, F y Prx Q con unas cifras de 150, 57 y 70 moles de peróxido de hidrógeno por mol de Prx y minuto. Curiosamente la Prx Q se mostró incapaz de tomar poder reductor del DTT. La actividad peroxidasa de las Prx tipo II usando el sistema Trx mostraron unos valores muy bajos.

Cuando se compararon cinéticamente la Prx de 2-Cys B y la Prx de tipo II C de *Arabidopsis thaliana* (Horling *et al.*, 2003), usando como donador electrónico el DTT, se observó que la Prx de tipo II era 12 veces más activa descomponiendo el H₂O₂ que la Prx de 2-Cys, pero en ensayos basados en la reducción por Trx, la Prx de 2-Cys era más activa que la Prx de tipo II. Se cree que esta diferencia se debe a que la estructura disulfuro de la Prx de 2-Cys oxidada es una diana mejor para la transición bitiol/disulfuro de la Trx que la reacción de monoreducción de la Prx de tipo II.

En 2005 Finkemeier *et al.* demostraron cómo la PrxII F mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* podía ser reducida por DTT, glutarredoxina, ciclo NADPH-NTR-Trx y por glutatión en menor grado.

Una de las Prx más estudiadas en vegetales, la PrxII citosólica de álamo presenta una mayor preferencia hacia la glutarredoxina como donador de electrones si bien es capaz de tomar poder reductor de las Trx. (Rouhier *et al.*, 2001). Tests de actividad con la proteína PrxC76A obtenida por mutagénesis dirigida sobre la cisteína peroxidásica PrxII de álamo mostró una reducción del 75% de la actividad peroxidásica en presencia de tioredoxina y un 60% con glutarredoxina como donador electrónico. La introducción de un tercer residuo de cisteína en la posición 152 de la secuencia aminoacídica de la PrxII de álamo, similar a la Prx V de mamíferos resultó en una reducción ligera de la actividad con tioredoxina pero no con glutarredoxina. Posteriores ensayos de actividad con la PrxII de álamo mostraron que era capaz de reducir al peróxido de hidrógeno, t-butilhidroperóxido, fosfatidilcolin hidroperóxido y cumén hidroperóxido prácticamente con la misma eficacia (Rouhier *et al.*, 2004a). En este mismo trabajo se elaboraron dos mutantes T48V y R129Q donde se alteraban la treonina 48 y la arginina 129 respectivamente formadoras de la triada catalítica de las Prx y se estudió de forma comparativa la capacidad reductora frente a diversos sustratos. Ninguna de las proteínas mutantes era capaz de reducir el peróxido de hidrógeno o el terbutil hidroperóxido. En cambio los mutantes eran capaces de catalizar la degradación del cumen hidroperóxido aunque con menor eficiencia que la PrxII no mutada. Los autores sugerían que el proceso de regeneración tiol dependiente de la cisteína catalítica no era afectado por las mutaciones y que todos los sustratos no eran igualmente identificados en el sitio activo.

Para testar estos resultados, Finkemeier *et al.* (2005) midieron la preferencia de sustratos de la PrxII F. Así ensayaron el terbutilhidroperóxido, hidroperóxido, cumen hidroperóxido del ácido linoléico y el hidroperóxido de dilinoleoil fosfatidilcolina con unos índices de reducción relativa de aproximadamente 50, 40 y

2-14% respectivamente, mostrando una alta preferencia de la enzima por el peróxido de hidrógeno (con un valor relativo de 100%).

La Prx V de mamíferos es la enzima más semejante a las Prx tipo II de vegetales (con una similitud del 40%) pero la primera, aunque es capaz de reducirse por Trx, no acepta electrones ni del glutatión ni de la glutarredoxina (Seo et al., 2000; Rhee et al., 2001).

El genoma de *Arabidopsis* codifica más de 40 proteínas tipo Trx, unas 25 proteínas tipo glutarredoxinas y 24 ciclofilinas. Por tanto, se puede pensar que cada Prx tenga un patrón específico de reducción. Los donadores electrónicos óptimos aún necesitan ser identificados.

4.4. ESTRUCTURA DE LAS PRX DE TIPO II

Hasta la fecha se han podido resolver pocas estructuras de Prx tipo II; entre las conocidas se encuentran la PrxV humana, el dominio Prx de la PrxV híbrida de *Haemophilus influenzae* y la Prx D de álamo (Kim et al., 2003; Declercq et al., 2004; Evrard et al., 2004; Echalié et al., 2005).

La Estructura cristalográfica de la Prx V humana en su estado reducido revela una distancia mayor de 13 Å entre las cisteínas peroxidática y resolutora por lo que se hipotetiza un reacomodamiento estructural de la enzima para poder dar lugar a la formación de puentes disulfuro intramoleculares propios de este grupo de Prx (Declercq et al., 2001; Echalié et al., 2005). Sin embargo, la cristalización de la forma oxidada de esta misma proteína pone de manifiesto la formación de puentes disulfuro intermoleculares que podrían evolucionar hasta puentes disulfuro intramoleculares (Evrard et al., 2004; Rhee et al., 2005). Esto sería posible debido a que los dos puentes disulfuro del dímero oxidado están muy próximos entre sí.

En 2005, Echalié *et al.* publican la cristalización de la Prx II citosólica (Prx D) de álamo en su estado reducido resolviendo la estructura a 1.6 Å. El cristal contiene cuatro moléculas. Tres de ellas (llamadas A, B y C) interaccionan entre sí mientras que la cuarta molécula se encuentra separada por un canal solvente. Los contactos más fuertes se dan entre las moléculas A y B e implican dos puentes salinos (K54-E61 y K62-E156) y numerosos puentes de hidrógeno en las posiciones 65-68 de la hélice alfa α_3 en la molécula A y los residuos 156-160 de la hélice α_5 de la molécula B. Otro puente salino une las moléculas B y C mientras que la interfase AC implica tan sólo un puente de hidrógeno. La superposición de la estructura de la Prx de álamo con otras estructuras de diferentes subfamilias (Prx A, B y E que se corresponden con la Prx de 2-Cys, 1-Cys y Tpx bacteriana respectivamente) muestra un dominio conservado del núcleo proteico y más precisamente en el dominio Trx. Este dominio está completado por una α hélice y tres cadenas β en la Prx de álamo formando una hoja β plegada central de siete hebras rodeada de cinco α hélices (Figura 9). Dos hojas independientes β plegadas (β_6 y β_7) se encuentran en el loop conectando la hélice α_4 y la lámina plegada β_8 . Este loop es una de las diferencias de las Prx de *populus* con otras Prx cuya estructura se encuentra publicada. Así por ejemplo difiere en la α hélice encontrada para la PrxV humana, la horquilla β en la Prx V híbrida o en la Prx A. Además de las conformaciones diferentes del loop, las diferencias topológicas residen principalmente en la extensión C-terminal y en la presencia de una α hélice adicional (residuos 93-97 usando la numerología de la Prx de álamo) para las Prx A y B y en la región N-terminal para las Prx E.

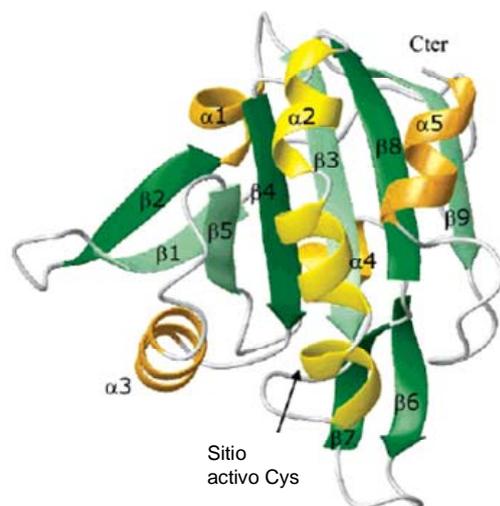


Figura 9. Estructura monomérica de la molécula A de la PrxII de álamo (Echalier *et al.*, 2005).

El sitio activo se divide aproximadamente en dos partes (Figura 10). La primera de ellas, expuesta al solvente, es polar y positivamente cargada mientras que la segunda es más hidrofóbica (residuos 41-47, 56-60 y 88 respectivamente). La posición de la cisteína catalítica C51 permite interacciones de la cadena con R129, un residuo muy conservado en las Prx (a una distancia de 3.3 Å) y con T48 (a 3.2 Å). Una molécula de agua (Wat282) podría incluso interactuar con C51 a una distancia de 3.4 Å. Una molécula de sulfato está presente en el sitio activo de las moléculas A y B de la Prx de álamo. Esta anión sulfato está estabilizada por interacciones con T50 y K121 y con una molécula de agua. Los mutantes T48V y R129Q de la Prx de álamo han mostrado que ambos residuos son necesarios para la reducción de sustratos tales como el peróxido de hidrógeno y el terbutilhidroperóxido pero no para la degradación del cummilhidroperóxido (Rouhier *et al.*, 2004a, Echalier *et al.*, 2005).

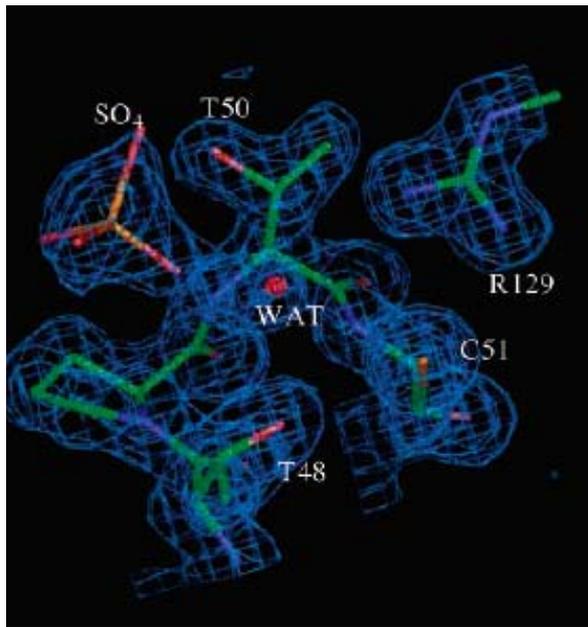


Figura 10. Disposición del centro activo de la Prx II de álamo (Echalier *et al.*, 2005).

La cisteína catalítica se encontraba reducida en el cristal pese a no utilizar agentes reductores para su formación lo que indica una baja sensibilidad de la enzima a la autooxidación. En la estructura de la PrxVI humana (B Prx), la cisteína catalítica estaba oxidada como ácido sulfénico. Un residuo de histidina (H39), junto con la posible presencia del ión Mg^{2+} era propuesta para estabilizar el ácido sulfénico y prevenir la sobreoxidación (Choi *et al.*, 1998). El sitio activo de la Prx de álamo también contiene un residuo de histidina (H55) pero en este caso, no tan próximo a la cisteína como en la Prx B. La H55 está implicada en la formación de puentes de hidrógeno entre R129 y S153 tal y como ocurre en las estructuras de la PrxV humana y PrxV híbrida de *H. influenzae* (Kim *et al.*, 2003, Echalier *et al.*, 2005).

Los datos que se obtienen mediante NMR son sensitivos para la reorientación total de las proteínas en solución y a las dinámicas locales de la proteína y puede por tanto aportar valiosa información sobre los estados de oligomerización de las proteínas. Mediante RMN Echalier *et al.* observaron que la PrxII de álamo estaba en

general bien estructurada desde la zona amino terminal a la carboxilo terminal y no presenta regiones altamente desordenadas en función a la difracción de rayos X. Los datos aportados por la RMN concluyeron en que la PrxII de álamo se encontraba en solución en su forma homodimérica.

La interfase del dímero Prx-Prx en la Prx D de álamo comprende un total de nueve residuos localizados en el loop $\beta 3-\alpha 2$, vuelta $\beta 4-\alpha 3$, hélice $\alpha 3$ y loop $\alpha 4-\beta 8$. (Figura 11) La superficie ocupa unos 742 \AA^2 por monómero y está estabilizada fundamentalmente por interacciones hidrofóbicas además de interacciones iónicas a través de puentes salinos. Los residuos T48, P49 y L 123 de un monómero interactúan con el residuo F83 del otro monómero, y F47 contacta mediante uniones de van der Waals con los residuos A87 y V84. Las interacciones electrostáticas implican el residuo D81 de un monómero y el R126 del otro monómero. Los residuos F47, T48 y P49 pertenecen al loop $\beta 3-\alpha 2$; D81 es parte de la vuelta $\beta 4-\alpha 3$; F83, V84 y A87 son residuos de hélice $\alpha 3$. Seis puentes de hidrógeno intermoleculares se observan entre S105 y Q119, G124 y S105, y R126 y D81. El dímero es muy diferente de los dímeros de las Prx de 2-Cys típicas o de las de 1-Cys. Sin embargo, un dímero homólogo ha sido descrito en la PrxV híbrida de *H. influenzae* (Prx D), que contiene un dominio Grx unido (Kim *et al.*, 2003). Esto sugiere que la forma dimérica está conservada para la interacción de la Prx de álamo con la Grx. Pese a que la Prx V humana fue documentada como monómero en la estructura cristalina (Declercq *et al.*, 2001), las interacciones Prx-Prx son prácticamente las mismas. Los residuos implicados en la interfase son conservados en las Prx de humanos, *H. influenzae* y álamo, excepto en el residuo L123, que es sustituido por residuos hidrofóbicos en la PrxV híbrida y en la PrxV humana. La interfase Prx-Prx en las tres Prx es aproximadamente perpendicular al plano de la hoja β central (Figura 11) y son completamente diferentes de la interfase dimérica de las Prx A y B donde las proteínas se asocian en el plano paralelo a la hoja β . En cambio es similar a la interfase entre dímeros de las Prx de 2-Cys en los estados de oligomerización (Echalier *et al.*, 2005, Dietz *et al.*, 2006).

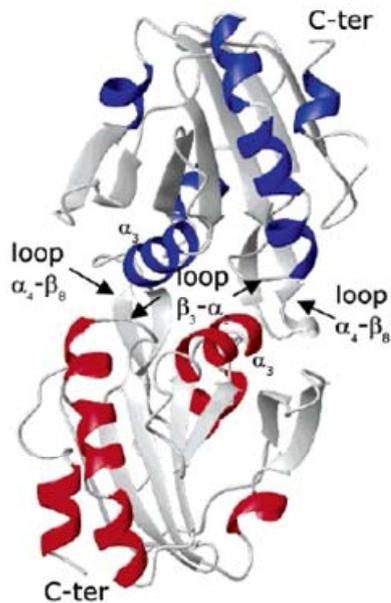


Figura 11. Posicionamiento del homodímero de la Prx de álamo mostrando la interfase Prx-Prx perpendicular a la lámina β central (Echalier *et al.*, 2005).

El análisis previo de 60 secuencias peptídicas de Prx de la subfamilia D llegó a obtener varias conclusiones. Los residuos F47, T48 y P49 implicados en la interfase están altamente conservados en todas las secuencias excepto para dos Prx mitocondriales (YTG) y Ahp1 de levadura (FSP). En general, D81 está muy conservado pero es reemplazado en Ahp2 por Asn. El residuo hidrofóbico F83 está altamente conservado o sustituido por Tyr o His. El residuo V84 está conservado excepto en dos Prx mitocondriales y Ahp1, donde es sustituido por Ala. A87 está menos conservada pero es generalmente Ala, Gly o Glut. L123 está conservado en un 38% de las Prx D o sustituida por Phe en un 40% de las secuencias. Finalmente, R126 está muy conservado pero en Ahp1 se encuentra W. Por tanto, debido a que los residuos de la interfase están altamente conservados en las Prx D (tipo II), es probable que todas estas proteínas presenten la asociación Prx-Prx perpendicular a la lámina β central.

Recientemente la estructura de una TPx de *E.coli* ha sido publicada en el estado oxidado, con un puente disulfuro intramolecular (Choi *et al.*, 2003)). La Prx E es un dímero no covalente estabilizado por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, con contactos Prx-Prx perpendiculares a la lámina β . Otras dos estructuras diméricas de Prx E se encuentran también publicadas en el PDB bajo los números de acceso 1Q98 (Tpx de *H. influenzae* en su forma oxidada) y 1PSQ (Tpx de *Streptococcus pneumoniae* en su forma reducida). Los residuos implicados en la interacción superficial están localizados en regiones similares a las Prx D. Sin embargo, los residuos están más o menos conservados en toda las Tpxs conocidas de bacteria (Choi *et al.*, 2003) sugiriendo que la mayoría de las Prx E son dímeros con una interfase Prx-Prx similar a las Prx D (Echalier *et al.*, 2005).

Las interfases Prx-Prx para las Prx A y B presentan una disposición paralela a la hoja β -plegada (Choi *et al.*, 1998; Alphey *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2002, Echalier *et al.*, 2005). Existe además otra interfase Prx-Prx encontrada en el toroide de la Prx A decamérica. Esta interfase se encuentra entre dos dímeros y está estabilizada por contactos hidrofóbicos que están conservados en las Prx A. La interacción superficial es similar a la interfase de los dímeros de las Prx D y E.

En resumen tenemos dos interfases Prx-Prx: la de los dímeros de las Prx A y B con una interfase paralela a la lámina B central y la interfase Prx-Prx de los dímeros de Prx D y E que usan una superficie perpendicular a la hoja B plegada. Este segundo tipo de interfase es también empleado para la oligomerización de los dímeros de Prx a en la estructura decamérica de toroide. Esta superficie de interacción no es accesible para las Prx B porque este es el sitio de interacción del dominio C-terminal con la estructura central. Los residuos que estabilizan la interfase en los dímeros de Prx A y B están localizados en la hebra β_9 y la hélice C-terminal (Prx A) o en el dominio C-terminal (Prx B). Estas tergiones C-terminales están ausentes en las Prx D y E. Tal diferencia en la secuencia proteica podría explicar por qué este tipo de interfase paralela a la lámina β central no se observa en las Prx D y E.

Así pues, las Prx B, D y E forman dímeros mientras que las Prx A presentan el juego dímero-decámero. Recientemente, el cambio de peso molecular de las especies a complejos de mayor peso molecular en las Prx A ha sido relacionado con una función peroxidasa-chaperona (Jang *et al.*, 2004)

4.5. ESTRUCTURAS GÉNICAS Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS PRX DE TIPO II

Los genes de las PrxII A, B, C y D se encuentran localizados en el cromosoma 1 y poseen dos intrones en sus secuencias génicas. Las secuencias intrónicas de las PrxII A,C y D tienen la misma longitud, mientras que la PrxII B es ligeramente más larga. Los genes de la PrxII E y F se encuentran en el cromosoma 3. La secuencia genómica de la PrxII E carece de intrones mientras que el ORF de la PrxII F está interrumpido por cuatro intrones, el tercero de ellos con aproximadamente 600 pb (Finkemeier *et al.*, 2005).

A pesar de la gran similitud entre las proteínas existen patrones órgano-estrés específicos de acumulación de los transcritos para cada isoforma. El análisis de la expresión de los niveles de Prx usando el conocido “Affymetrix chip array data sets” con la base de datos “Genevestigador and toolbox” (Zimmermann *et al.*, 2004; <http://www.genevestigator.ethz.ch>) permitió sacar algunas conclusiones de los patrones de acumulación de transcritos para las Prx de *Arabidopsis*. (Tesis Iris Finkemeier, 2005).

En un estudio reciente de las Prx de tipo II de *Arabidopsis thaliana* se ha visto el patrón de expresión de este grupo (Bréhélin *et al.*, 2003). También se han realizado estudios sobre la regulación de la expresión de la Prx de tipo II B, C, E y F a nivel de tejidos foliares, que mostraron que las Prx de tipo II B y C, que se localizan preferentemente en el citosol, junto con la F, cuya localización preferente es mitocondrial, muestran una regulación de su expresión en respuesta a cambios del

estado redox y a condiciones de estrés distintas a la que presentan las Prx cloroplastídicas (Prx de 2-Cys, Prx tipo II E y Prx Q) (Horling *et al.*, 2002, 2003).

Para facilitar el entendimiento de la regulación de las Prx de tipo II se hará un estudio separado de cada una de ellas atendiendo a las distintas condiciones oxidativas.

En el caso de la Prx de tipo II B, ésta se expresa en todos los tejidos de la planta (Bréhélin *et al.*, 2003). Los transcritos de la PrxII B presentan una elevada expresión en todos los órganos y tejidos de la planta. Mediante experimentos de RT-PCR sus niveles transcripcionales fueron ligeramente afectados tras someter las plantas a alta o baja intensidad lumínica, aplicación externa de ascorbato o tras la infiltración de hojas de *Arabidopsis* con el agente estresante peróxido de hidrógeno y diamida que oxidan los grupos celulares tiólicos. Únicamente cuatro horas tras la infiltración con butil hidroperóxido se observó un aumento de hasta tres veces del transcrito de la PrxII B. La inducción más notable tras los tratamientos de estrés a partir de los análisis del “array” fue la correspondiente a los tratamientos por calor, donde los transcritos aumentaban hasta el doble. Tanto en hojas jóvenes como en hojas viejas de plantas de *Arabidopsis* que fueron privadas nutricionalmente de nitrógeno se manifestó una disminución de los niveles transcripcionales de la enzima (Horling *et al.*, 2003; Kandlbinder *et al.*, 2004). En plantas K.O para la PrxII F se determinó mediante RT-PCR un aumento de 1.8 veces en los niveles de la PrxII B (Finkemeier *et al.*, 2005).

Las Prx de tipo II C y D se expresan casi exclusivamente en polen (Bréhélin *et al.*, 2003). Este patrón de expresión particular sugiere una función en el desarrollo para estas dos proteínas y, además, puede implicarlas en la protección de los componentes del polen, que están expuestos a un aumento en la producción de radicales libres durante la desecación (Van Bilsen and Hoekstra., 1993). Las Prx constituyen, por tanto, uno de los sistemas antioxidantes capaces de aliviar el estrés

oxidativo en tejidos secos (Hoekstra., 2001). Para los transcritos de las PrxII C y D se observó un interesante patrón de expresión en hojas de *Arabidopsis*, de mayor magnitud para la PrxII C. Mientras que ambos transcritos eran casi indetectables en hojas de *Arabidopsis* bajo condiciones controles, manifestaron una fuerte inducción tras varios tratamientos de estrés. Los niveles de transcrito de la PrxII C aumentaron muy notablemente tras la aplicación de ascorbato, tratamientos con peróxido de hidrógeno, terbutilhidroperóxido y diamida mientras que permanecieron inalterados en los cambios de intensidad lumínica. Tanto en hojas jóvenes como en hojas viejas de plantas de *Arabidopsis* que fueron privadas nutricionalmente de fósforo se manifestó un aumento de hasta 15 veces en los niveles transcripcionales de la PrxII C y de hasta 7.4 veces para la PrxII D (Horling *et al.*, 2003; Kandlbinder *et al.*, 2004). El análisis mediante el microarray “genevestigador” anota que los transcritos de PrxII D son además fuertemente inducidos por ozono, calor y tratamientos por estrés abiótico. Se puede hipotetizar que el promotor de la PrxII C y D está controlado por el estado redox y energético. Interesantemente, la PrxII C y D tienen mayores niveles transcripcionales en hojas y flores que se vieron única y levemente afectadas en raíces tratadas con Cadmio (Finkemeier *et al.*, 2005).

La Prx de tipo II E se expresa constitutivamente en todos los tejidos, pero se sobreexpresa en el tapetum de la antera y durante la formación de la semilla (Bréhélin *et al.*, 2003), sugiriendo que la función de esta proteína no está limitada al cloroplasto sino que también es activa en otro tipo de plástidos. En particular, los oleoplastos son plástidos presentes en el tapetum de la antera y contienen principalmente glóbulos de ésteres neutrales (Wu *et al.*, 1997; Ting *et al.*, 1998; Hernández-Pinzon *et al.*, 1999). Esta enzima puede estar envuelta en un mecanismo protector impidiendo un alto nivel de peroxidación lipídica en oleoplastos. La expresión de la PrxII E es diferente de otras Prx cloroplastídicas ya que tiene un nivel transcripcional más homogéneo en tejidos como en inflorescencia y además se expresa en raíces. Por tanto, la PrxII E parece ser importante en el metabolismo antioxidante de varios tipos de plástidos no directamente relacionados con la fotosíntesis. Los estudios realizados en *Arabidopsis*

thaliana (Horling *et al.*, 2002, 2003) muestran cómo la enzima presenta una regulación similar a la de las Prx de 2-Cys en tejidos foliares. El nivel transcripcional de la PrxII E aumentó cuatro horas después de someter a *Arabidopsis* a una alta intensidad lumínica y decreció a baja acepción de fotones. No hubo cambios en los tratamientos directos con peróxidos pero su expresión decreció fuertemente tras la adición externa de ácido ascórbico (Horling *et al.*, 2003).

La Prx de tipo II F se expresa en todos los tejidos de la planta si bien el contenido de esta proteína en raíces de *Arabidopsis* parece ser mucho mayor que en hojas (Kruft *et al.*, 2001; Bréhélin *et al.*, 2003, Finkemeier *et al.*, 2005). Esta enzima tiene un nivel transcripcional bajo pero constitutivo en todos los órganos de la planta. A diferencia de lo que ocurre en otras Prx, la PrxII F responde más débilmente a tratamientos por estrés. Cuando plantas de *Arabidopsis* se sometieron a tratamientos por estrés lumínico, salino u oxidativo, en general, los niveles de mRNA de la Prx de tipo II F a nivel de tejidos foliares no se afectaron. Esto puede interpretarse como un requerimiento constitutivo que indica la existencia de un nivel controlado del transcrito de la Prx de tipo II F (Horling *et al.*, 2002, 2003).

En raíces de *Arabidopsis* la PrxII F fue inducida por tratamientos con cadmio y reprimida por SHAM, pese a que ambos tratamientos deberían inducir las condiciones de oxidación (Finkemeier *et al.*, 2005). En el análisis obtenido a partir del microarray “Genevestigator” se anotaba una inducción en respuesta al estrés biótico y calor. En análisis de Western blot se ha observado una fuerte regulación de los niveles de proteína de la PrxII F. Esta enzima se acumuló tras los tratamientos con cloruro de cadmio en hojas de *Arabidopsis* si bien los niveles de proteína disminuyeron tras los tratamientos con SHAM; además, el contenido total de PrxII F es mayor en raíces que en hojas (Finkemeier *et al.*, 2005).

Un estudio proteómico sobre cultivos celulares de *Arabidopsis* tratados con altas concentraciones de peróxido de hidrógeno revelaron un incremento de hasta 3

veces en los niveles de PrxII F. Este hecho indica que la PrxII F está fuertemente regulada por mecanismos posttranscripcionales que aún han de ser investigados.

Dos líneas de plantas de *Arabidopsis* KO para la PrxII F fueron analizadas al detalle. Bajo condiciones normales de crecimiento no se apreciaron cambios fenotípicos respecto a plantas controles. Desde el punto de vista bioquímico la pérdida de PrxII F provocó un aumento de los niveles de actividad dependiente de ascorbato y glutatión acompañados de un incremento en los transcritos de la PrxII B citosólica y glutarredoxina. Fenotípicamente la pérdida de la enzima produjo una disminución del crecimiento de las raíces de plántulas de *Arabidopsis* cuando éstas eran crecidas en presencia de Cd₂Cl.

Los últimos avances publicados de regulación transcripcional sobre esta enzima muestra unos niveles de transcrito constitutivos en función de la edad de la planta por lo que se habla de una posible función antioxidante a modo de “HouseKeeping” a diferencia de lo que ocurre para las Prx de 2-Cys o la Prx Q cuyos niveles transcripcionales son mucho mayores pero que muestran un acentuado descenso en la fase de senescencia de las hojas, lo que probablemente está relacionado con la pérdida de clorofila (Dietz *et al.*, 2006).

4.6. FUNCIONES IN VIVO DE LAS PRX TIPO II

Los avances científicos sobre las funciones biológicas del grupo de las Prx de 2-Cys superan a los obtenidos para las Prx de tipo II. Aunque las Prx tipo II parecen tener diferentes funciones en animales que en plantas, las Prx de los primeros proporcionan indicios y rasgos de importancia en el metabolismo celular. Los genomas de mamíferos como los de humano o rata contienen seis genes de Prx que codifican para proteínas que se subdividen en tres subgrupos y que tienen diferentes localizaciones. De entre estas Prx de mamíferos, la Prxd5 es la única Prx tipo II descrita hasta el momento. Curiosamente, la presencia de un ión benzoato en

interacción con el residuo de cisteína peroxidático fue encontrado en la estructura cristalina y despertó la intriga ya que los iones benzoato son conocidos como eliminadores de radicales hidroxilo (Declercq *et al.*, 2001, Evrard. 2004). La Prxd5 desempeña funciones antioxidantes en diferentes tejidos como pulmón, cartílago y cerebro (Kropotov *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2002) y puede inhibir la apoptosis inducida por el p53 (Zhou *et al.*, 2000). Además, las formas citosólica y mitocondrial de la Prxd5 expresadas en levaduras protegen la célula del daño oxidativo inducido por paraquat (Nguyen-nhy and Knoops, 2003). Otros resultados muestran como la producción de ROS y RNS inducidas por alcohol se ve inhibida por la expresión de PrxV en embriones de *Xenopus laevis* (Peng *et al.*, 2004). Recientemente se ha puesto de manifiesto que la Prxd5 interacciona con factores de regulación y se piensa que está involucrada en la regulación de la síntesis del RNA en los complejos de transcripción (Kropotov *et al.*, 2004). Uno de los últimos trabajos en relación a esta enzima destaca su función antioxidante protegiendo al DNA mitocondrial del daño inducido por peróxido de hidrógeno (Banmayer *et al.*, 2005).

En plantas superiores como *Arabidopsis*, arroz y álamo se sabe que contienen al menos tres Prx tipo II localizadas en el citosol, mitocondria y cloroplasto. Los trabajos realizados por Finkemeier *et al.* (2005), donde obtuvieron líneas KO para la PrxII F, revelaron por primera vez una función in vivo de una Prx tipo II en la mitocondria de *Arabidopsis*. Dichas plantas K.O no mostraron cambios fenotípicos ni de crecimiento en comparación con las plantas controles silvestres bajo condiciones normales. Sin embargo, el crecimiento de las raíces de las líneas Knockout crecidas en placas estériles de agar complementadas con efectores de estrés oxidativo, como el cadmio (7.5 μ M) o SHAM (25 μ M), se vio fuertemente inhibido. Análisis microscópicos de las raíces revelaron cómo las mitocondrias de las plantas controles y de las plantas KO-PrxII F eran semejantes en forma y tamaño cuando no se hacía ningún tratamiento oxidativo. Interesantemente, las membranas de las mitocondrias correspondientes a los tratamientos hechos con cadmio eran más difusas y menos estructuradas en las líneas KO-PrxII F que en las plantas control no tratadas. Además,

la forma de algunas de ellas se vio deformada en comparación con las mitocondrias de las plantas control indicando fuertes efectos del cadmio en la función mitocondrial. Los autores de dicho trabajo concluían en que la pérdida de la PrxII F parecía deletérea para las raíces de *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés oxidativo.

Las funciones *in vivo* de las PrxII citosólicas B, C y D así como la plastídica PrxII E no han sido esclarecidas hasta la fecha. Los posibles donadores electrónicos *in vivo* aún están por confirmar.

5. PEROXIRREDOXINAS DE 1-CYS

5.1. GENERALIDADES

Los miembros de las Prx de 1-Cys se encuentran en una amplia variedad de especies, incluyendo arqueas, levaduras, nematodos, vegetales y mamíferos (Chae *et al.*, 1994b; Kang *et al.*, 1998). La primera Prx identificada en plantas fue la Prx de 1-Cys de trigo (Aalen *et al.*, 1994). Las Prx de 1-Cys son monoméricas, pero pueden formar homodímeros a concentraciones proteicas >1 mg/ml (Choi *et al.*, 1998). Este grupo se caracteriza por poseer una única cisteína conservada, correspondiente a la Cys47 de la Tpx de levadura siendo la secuencia aminoacídica conservada alrededor de esta cisteína PVCTTE. Algunas Prx de 1-Cys poseen otra cisteína (Cys91 de la Prx-VI en humanos) pero ésta no parece estar implicada en el mecanismo de acción de las mismas (Rhee *et al.*, 2001). Las Prx de 1-Cys de distintos orígenes muestran más de un 60% de similitud entre ellas. Generalmente estas proteínas presentan entre 216 a 220 aminoácidos, una masa molecular de unos 24 kDa y un punto isoelectrónico alrededor de 6.

El mecanismo de acción es a través de la oxidación de la cisteína del centro activo, durante el ciclo catalítico, a ácido sulfénico (Cys-SOH), pero la regeneración

de la proteína oxidada aún no está clara, ya que en ciertos organismos ni la Trx ni el glutatión son capaces de reducir la Cys-SOH del intermediario oxidado de la proteína (Kang *et al.*, 1998), pero en *Saccharomyces cerevisiae* se ha visto que la Trx puede cederle sus electrones (Pedrajas *et al.*, 2000), por otra parte, *in vitro*, un reductor como el DTT puede emplearse como donador de electrones no fisiológico, pero la regeneración *in vivo* de la Prx de 1-Cys aún es desconocida.

La Prx de 1-Cys en vegetales se identificó como una proteína relacionada con la latencia, expresándose en la capa de la aleurona y embrión de la cariopsis en cebada (Aalen *et al.*, 1994). Por inmunocitoquímica se constató su localización nuclear y más concretamente en el nucleólo (Stacy *et al.*, 1996, 1999). Otras Prx de 1-Cys de *Drosophila* y levadura han sido localizadas en el citosol, núcleo y mitocondria (Rhee *et al.*, 2001). El gen de la Prx de 1-Cys se expresa sólo en semilla y pertenece a una familia monogénica (Stacy *et al.*, 1996; Haslekas., 1998). Se ha visto que su expresión está regulada espacial y temporalmente. Los transcritos aumentan exclusivamente en la capa de la aleurona y en los embriones embebidos de semillas latentes, lo cual sugiere un papel para estas Prx en el control de la latencia, ya que se ha visto que el H₂O₂ es capaz de romper el fenómeno de latencia (Stacy *et al.*, 1996). Además, muchos pasos del proceso de germinación, tales como la desecación y el embebimiento, son críticos debido a la formación de especies de oxígeno reactivo. Como la Prx de 1-Cys presenta actividad peroxidasa *in vitro*, otra hipótesis que existe es que la Prx protege a los dos únicos tejidos que sobreviven al paso de desecación. Debido a que otros antioxidantes de la semilla, como la SOD y la catalasa, se encuentran en toda la planta, la especificidad de la Prx de 1-Cys en la semilla sugiere que posee un papel clave en este tejido (Haslekas., 1998). Para investigar la función exacta del gen de la Prx de 1-Cys, se han generado plantas transgénicas de tabaco (Lee *et al.*, 2000) y de *Arabidopsis* (Haslekas *et al.*, 2003) que sobreexpresan la Prx de 1-Cys de arroz y cebada respectivamente, asimismo también se generaron plantas de *Arabidopsis* con niveles reducidos de la Prx de 1-Cys (Haslekas *et al.*, 2003). La frecuencia de germinación de las plantas de tabaco transgénicas era similar a la de las

plantas control, pero las líneas transgénicas mostraban una mayor resistencia frente al estrés oxidativo, sugiriendo que el papel esencial de la Prx de 1-Cys es la protección frente a oxidantes. Por otra parte en las plantas de *Arabidopsis* con niveles disminuidos de la Prx de 1-Cys no se observaron diferencias con las plantas de tipo salvaje en su desarrollo y germinación, sin embargo en las líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban la Prx de 1-Cys sí se observó que germinaban más lentamente en la presencia de agentes estresantes como NaCl, manitol o metilviológeno que las plantas de tipo salvaje sugiriendo que la Prx de 1-Cys juega un papel importante en la inhibición de la germinación en condiciones desfavorables.

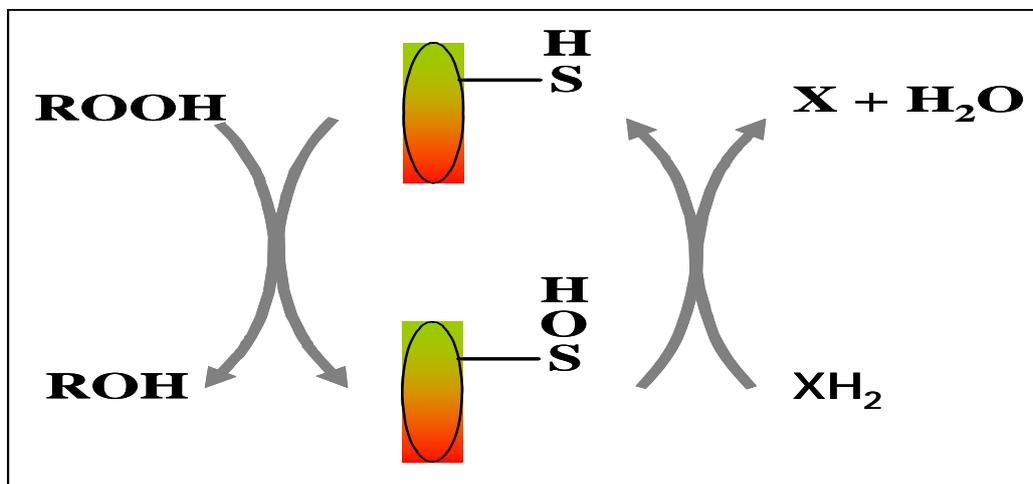


Figura 12. Mecanismo de acción de las Prx de 1-Cys.

6. PEROXIRREDOXINA Q

6.1. GENERALIDADES

La Prx Q fue primeramente descrita en bacterias como una proteína comigratoria de la bacterioferritina (BCP) (Jeong et al., 2000). En el mismo año, una peroxidasa homóloga a la BCP fue clonada a partir de *Sedum lineare* por Kong y

colaboradores (2000). Este grupo de Prx se han encontrado en bacterias (Andrews *et al.*, 1991) hongos y en plantas (Kong *et al.*, 2000; Lankemeyer *et al.*, 2006.), pero no en animales. También posee dos cisteínas, separadas por sólo cuatro aminoácidos. La secuencia alrededor de la primera cisteína es GPCTK. A esta clase pertenecen proteínas de unos 215 aa si se considera el péptido señal y de unos 150 aa si se considera la forma madura de la proteína. La Prx Q se presenta como monómero bajo condiciones normales aunque cuando se almacena largos periodos de tiempo tiende a oligomerizar (Rouhier *et al.*, 2004; Dietz *et al.*, 2006)

Los valores de abundancia relativa de esta proteína se cifran en torno al 0.3% de las proteínas totales presentes en el cloroplasto de *Arabidopsis*. La cantidad de enzima detectada es la misma tanto en hojas jóvenes como en maduras si bien su abundancia decae en la senescencia. La Prx Q se ha encontrado en todos los tejidos de *Arabidopsis* donde se ha buscado a excepción de raíces. El fraccionado de cloroplastos de *Arabidopsis* en fracción soluble y membranas ha mostrado una unión masiva de la Prx Q a las membranas tilacoidales. Los experimentos de Western blot sobre fraccionados del cloroplasto mostraron una unión de la Prx Q a las membranas BBY y fotosistema II mientras que en el fotosistema I o LHCII la señal fue inexistente (Lankemeyer *et al.*, 2006; Dietz *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción es a través de la formación de un puente disulfuro intramolecular (Kong *et al.*, 2000) (figura 13).

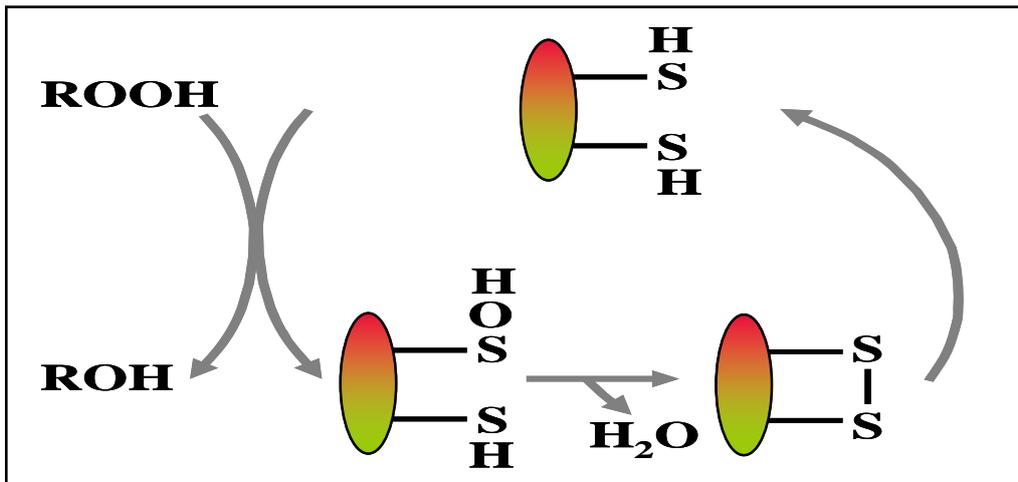


Figura 13. Mecanismo de acción de la Prx Q.

Estudios de mutagénesis dirigidos sobre la Prx Q de *Arabidopsis* han mostrado la importancia de las Cys110 y Cys115 catalíticas así como de la Thr107 y Arg181 que se encuentran conservadas (Lankemeier *et al.*, 2006).

En un test enzimático con Trxs citosólicas y cloroplastídicas de varias plantas, la Trx h3 de álamo y la Trx cloroplastídica regeneraron más eficientemente la Prx Q de álamo mientras que la glutarredoxina fue incapaz de llevar a cabo la reducción (Rouhier *et al.*, 2004). En 2004, Collin y colaboradores demostraron, utilizando proteínas exclusivamente de *Arabidopsis thaliana*, la eficiencia de reducción de la Prx Q por parte de varias tiorredoxinas plastídicas en el orden AtTrx y1>AtTrx y2>AtTrx x> AtTrx m4. En el presente año se determinó que la capacidad reductora *in vitro* del DTT sobre la Prx Q de *Arabidopsis* era francamente baja mientras que el uso de Trx x, una de las recientes Trxs identificadas en el cloroplasto (Collin *et al.*, 2004), incrementó la actividad enzimática unas 18 veces (Lankemeier *et al.*, 2006). La Prx Q de *Arabidopsis* era capaz de descomponer los peróxidos con una preferencia de sustrato H_2O_2 > Hidroperóxido de cumene >> Butilhidroperóxido >> hidroperóxido linoleico mientras que la reducción del hidroperóxido de dilinoleoilfosfatidilcolina era prácticamente nula.

En 2005, la Prx Q fue identificada por afinidad cromatográfica como diana de la proteína cloroplastídica inducida por sequía de 32 KDa (CDSP32) (Broin *et al.*, 2002) que parece estar involucrada en la protección del cloroplasto frente al estrés oxidativo (Rey *et al.*, 2005).

En cuanto a la regulación de la expresión de la Prx Q, se han realizado estudios en *Arabidopsis thaliana* (Horling *et al.*, 2002, 2003) y presenta una regulación similar al de las Prx de 2-Cys en tejidos foliares. Disminuye bajo estrés salino, por la aplicación de ascorbato y cuando se somete a bajas intensidades de luz, pero aumenta ligeramente a altas intensidades de luz y cuando se trata con oxidantes y prooxidantes como el TBHP y diamida respectivamente, por lo que se considera que presenta una regulación similar a la de las Prx de 2-Cys. Sin embargo se ha visto que cuando se aplica H₂O₂ aumenta considerablemente, por lo que se cree debe tener otra ruta de señalización que interfiere con su expresión independientemente de la luz y el ascorbato.

La sobreexpresión de la Prx Q de *Genciana triflora* en maíz mejoró la tolerancia frente a la infección por hongos y estrés oxidativo inducido por paraquat (Kiba *et al.*, 2005). En cambio, la interrupción del gen de la Prx Q en *Arabidopsis* no alteró los fenotipos de las líneas transgénicas respecto a las plantas salvajes en condiciones de crecimiento normales o bajo estrés. Sin embargo, al igual que las Prx de 2-Cys, las plantas deficitarias en Prx Q mostraron una disminución de la sensibilidad a oxidantes en test de cortes de hoja tal y como indicaron las medidas de fluorescencia de clorofila. En otro sentido, la ausencia de esta enzima provocó el reajuste de los niveles de otras proteínas y sistemas antioxidantes (Lankemeyer *et al.*, 2006).

Ya que recientemente se ha demostrado que la Peroxiredoxina PRDX 5 es capaz de proteger el DNA in vivo (Banmeyer *et al.*, 2005), Dietz *et al.* (2006) investigaron el efecto protector de la Prx Q sobre el gDNA en hojas de *Arabidopsis* de

plantas salvajes y KO para la Prx Q estresadas con MV o H₂O₂. Para ello compararon la intensidad de las bandas de DNA de 11.4 Kb amplificadas por PCR de largo recorrido tanto para plantas controles como para las plantas KO. Los resultados evidenciaron una disminución de la intensidad de las bandas amplificadas en las plantas KO tratadas con los efectores estresantes en comparación con las líneas salvajes evidenciando efecto protector de la Prx Q sobre el gDNA.

Otros estudios han puesto de manifiesto la implicación de la Prx Q frente a estrés biótico producido por patógenos (Rouhier *et al.*, 2004b; Kiba *et al.*, 2005.)

Al igual que las Prx de 2-Cys, determinaciones del nivel de transcrito de la Prx Q en función del tiempo mediante arrays han evidenciado cómo esta proteína se encontraba en una mayor cantidad que otras Prx (2-Cys B, Prx E o PrxII F). Sin embargo, los niveles del transcrito decayeron a partir de los 29 días de edad, hecho que se correlaciona con la pérdida de clorofila (Dietz *et al.*, 2006).

7.TIORREDOXINAS

7.1. GENERALIDADES

En 1960 la prestigiosa revista *The Journal of Biological Chemistry* publicó un trabajo sobre levaduras realizado por Simon Black y colaboradores en el cual se podía leer lo siguiente:

“... Described herein is an enzymatic system isolated from yeast which catalyzes the specific reduction of one of the four isomers of methionine sulfoxide to the corresponding thioether, methionine. This process utilizes TPNH and requires the participation of three separable protein fractions which are designated Enzymes I, II, and III...”

Se describieron tres fracciones proteínicas con la capacidad de reducir *in vitro* un isómero de sulfóxido de metionina, y otros disulfuros. Entre estas fracciones se encontraba una proteína, responsable indirecta de la reducción de este compuesto azufrado y probablemente de los otros disulfuros ensayados (Black *et al.*, 1960). Sin embargo, sería en 1964 cuando esta fracción enzimática fue bautizada con el nombre de tiorredoxina (Trx), en un trabajo presentado por Lauren *et al.* Estos, consiguieron aislar y describir una proteína homóloga en *E. coli* que mostraba capacidad para reducir a la enzima ribonucleótido reductasa, la cual cataliza la reducción de los monómeros precursores de las hebras de ADN, transformando ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos (Laurent *et al.*, 1964). El nombre de tiorredoxina aludía a su carácter redox vinculado a la presencia de grupos tiólicos, y bajo este epígrafe se inició un campo de trabajo que actualmente se encuentra en pleno auge.

Las tiorredoxinas (Trxs) son proteínas globulares con un peso molecular alrededor de 12-14 KDa. cuya función principal es reducir puentes disulfuro de otras proteínas (Jacquot *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2005). Tienen un motivo estructural característico formado por 4 hélices α rodeadas por una lámina β que se compone de cinco cadenas (Buchanan *et al.*, 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 cuyas estructuras han sido elucidadas hasta la fecha 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, también 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 10.000 veces mayor que el DTT a igualdad de pH (Holmgren, 1985).

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. 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 (figura 14a), 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. Son reducidas a través de la enzima ferredoxín-dependiente tiorredoxín reductasa, conformando un sistema cloroplástico, paralelo al existente en el citoplasma, y denominado como Sistema ferredoxina/tiorredoxina o FTS (Figura 14b) (Buchanan, 1991). Un último sistema, menos conocido ha sido descrito en las mitocondrias de levadura y mamíferos, y recientemente en plantas (Laloi *et al.*, 2001). En este sistema la Trx es reducida por una enzima homóloga a la existente en el citosol, la NADPH-dependiente tiorredoxín reductasa mitocondrial, aunque muchas incógnitas quedan pendientes sobre este sistema en plantas (Figura. 14a).

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).

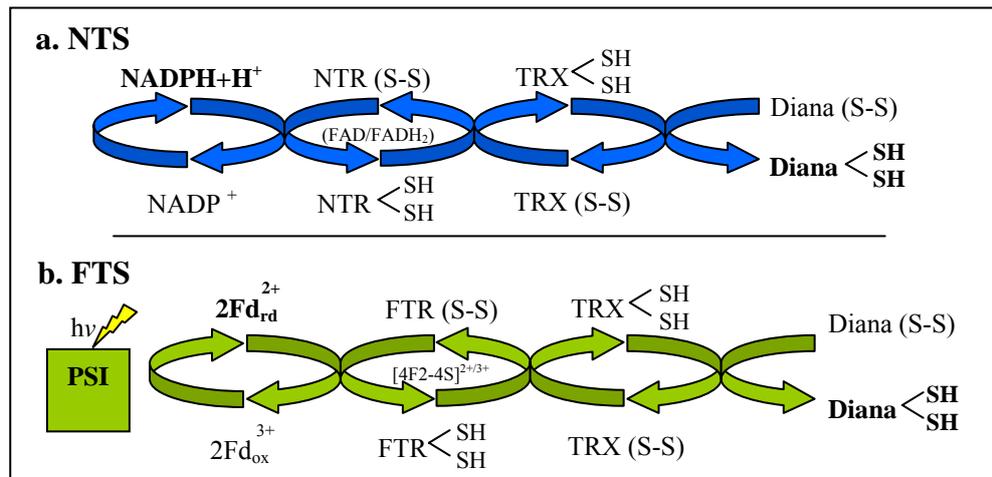


Figura 14. Sistemas de Trx descritos en los seres vivos. Las Trx (TRX) en su estado reducido rompen eficazmente puentes disulfuro de otras proteínas. (a) Sistema NADPH/tiorredoxina (NTS) presente en el citosol y en la mitocondria: Las moléculas de NADPH inician una cadena de transporte de electrones reduciendo a la enzima NADPH-dependiente tiorredoxín reductasa (NTR), que a su vez reduce el puente disulfuro del centro activo de las Trxs. (b) Sistema ferredoxina/tiorredoxina o FTS descrito en cloroplastos de organismos fotosintéticos. Las moléculas de ferredoxina (Fd) reducidas, procedentes de la cadena de transporte fotosintética, reducen a la enzima ferredoxín-dependiente tiorredoxín reductasa (FTR) que a su vez reduce a la Trx cloroplastídica.

7.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TIORREDOXINAS

La Trx es un potente agente reductor de puentes disulfuros de otras proteínas y su función redox está relacionada con tal actividad. Existen pocos casos conocidos en los que la Trx ejerce una función estrictamente estructural e independiente de su propiedad redox, por ejemplo el ensamblaje de fagos en *E. coli* (Feng *et al.*, 1999) o la formación de vacuolas en levaduras (Xu *et al.*, 1997).

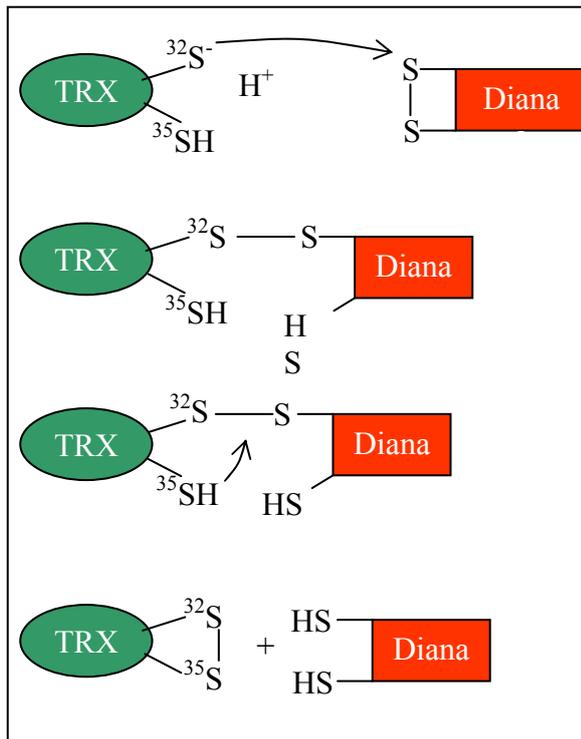


Figura 15. Mecanismo de acción de las Trx. El mecanismo molecular de las Trxs se realiza en dos pasos, en el primero el sulfuro de la cisteína más cercana al extremo N-terminal (C32) realiza un ataque nucleofílico sobre el puente disulfuro de la proteína con la que previamente ha interactuado. En un segundo paso, la segunda cisteína del centro activo (C35) ataca al puente mixto, dando lugar a una Trx oxidada y a la proteína diana en estado reducido.

Una vez que la Trx y su proteína diana se reconocen e interaccionan, tiene lugar el mecanismo de acción de las Trxs. 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). Normalmente, el valor del pK de los grupos tiólicos de las cisteínas están entre 8.0 y 9.0 (Lindley, 1960), sin embargo una de las cisteínas del centro activo de las Trxs posee un pK más bajo. Por ejemplo, en *E. coli* el pK del grupo tiol de la C32 es 6.75, mientras que la C35 posee un valor de 9.0 (Kallis and Holmgren, 1980). El bajo valor de pK de la C32 (la más próxima al extremo N-terminal y el más expuesto al medio), la convierte en muy reactiva a pH fisiológico. Además, el par de electrones desapareados del azufre (S) de esta cisteína la convierten en un buen nucleófilo a estos valores de pH. Este grupo tiol (realmente un grupo S^-) 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 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 (Figura 15). Este mecanismo de acción no es exclusivo de la Trxs, las Grx y otros reductores de puentes disulfuro reaccionan de forma similar. Incluso las proteínas NTR y FTR reducen el puente disulfuro de las Trxs oxidadas utilizando un ataque ditiol en dos tiempos (Gan *et al.*, 1990).

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).

7.3. TIORREDOXINAS MITOCONDRIALES

A finales de los ochenta aparecían las primeras evidencias de la presencia de Trx en mitocondrias de plantas y animales (Bodenstein-Lang *et al.* 1989).

En 1991, los experimentos de fraccionamiento celular realizados por Marcus y colaboradores pusieron de manifiesto la presencia de Trx h no sólo en citosol o retículo endoplasmático sino también en mitocondrias de vegetales, hecho confirmado posteriormente en investigaciones con álamo (Gelhaye *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha puesto en evidencia la existencia de un sistema Trx mitocondrial en *A. thaliana*, compuesto de un gen nuclear de *Trx* denominado *AtTRXo1* y de un gen de tiorredoxín reductasa NADPH-dependiente, *AtNTRA* que codifica una forma mitocondrial muy relacionada con las tiorredoxín reductasas procarióticas. Se describió también la existencia de un gen *AtTRXo2* cuyo producto proteínico no parece poseer ningún péptido señal que lo dirija a ningún orgánulo (Laloi *et al.*, 2001).

OBJETIVOS - OBJECTIVES

OBJETIVOS

Las Prxs son enzimas de una gran importancia biológica en plantas, no sólo por su implicación en procesos de defensa antioxidante sino también como posibles reguladores de rutas metabólicas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y los pocos estudios que hasta la fecha se han realizado sobre las peroxirredoxinas mitocondriales de vegetales, los objetivos que nos propusimos en el presente trabajo fueron:

1. Clonación y caracterización del gDNA y cDNA que codifica la PrxII F así como del cDNA que codifica la Trx O2, ambas enzimas mitocondriales de *P. sativum*.
2. Obtención de dos proteínas mutantes de la PrxII F en sus cisteínas catalíticas Cys-59 y Cys-84.
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 PrxII F.
5. Caracterización bioquímica de la PrxII F así como de las proteínas mutantes para aclarar la implicación de las cisteínas en los procesos catalíticos de las peroxirredoxinas.
6. Análisis de las propiedades de oligomerización de la PrxII F.
7. Estudio de la localización subcelular de la PrxII F mediante inmunocitoquímica y su subsublocalización dentro de la mitocondria.

8. Análisis de la regulación de la expresión de la PrxII F de *Pisum sativum* en condiciones de estrés oxidativo.

9. Estudio del comportamiento de las Peroxirredoxinas tipo II bajo distintas condiciones en geles bidimensionales.

10. Caracterización de la interacción de la Trx O2 con la PrxII F o sus variantes mutantes *in vivo* e *in vitro*.

11. Obtención de cristales de la PrxII F de *P. sativum* que permitan la determinación de su estructura tridimensional por difracción con rayos X.

OBJECTIVES

Prx are enzymes of a great biological importance in plants, not only for their implication in processes of antioxidant defence but also as possible regulators of metabolic routes.

Bearing these considerations in mind and the few studies currently available on the mitochondrial peroxiredoxins of plants, the objectives of the present work are:

1. Cloning and characterization of the gDNA and the cDNA encoding the PrxII F as well as the cDNA encoding Trx O₂, both mitochondrial enzymes of *P. sativum*.
2. Generation of two mutant proteins of the PrxII F in which their catalytic Cys-59 and Cys-84 are replaced.
3. Overexpression of the enzymes as recombinant proteins in *E. coli* and development of protocols for their purification.
4. Generation of polyclonal specific antibodies against the PrxII F.
5. Biochemical characterization of wild type and mutant PrxII F in order to clarify the implication of the cysteines in the catalytic mechanism of peroxiredoxins.
6. Analysis of the oligomerisation characteristics of PrxII F.
7. Study of the subcellular location of PrxII F by means of immunocytochemistry and its sublocalization within the mitochondria.

8. Analysis of the expression of the PrxII F of *P. sativum* under oxidative stress conditions.

9. Study of the behaviour of type II peroxirredoxins under different conditions in two-dimensional gels.

10. Characterization of the interaction of the Trx O2 with the PrxII F or its mutants *in vivo* and *in vitro*.

11. Growth of crystals of the PrxII F of *P. sativum* to initiate the determination of its three-dimensional structure by X-ray crystallography.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Los materiales y reactivos utilizados en el estudio fueron suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich (Madrid, España), Panreac, BioRad (Sevilla, España), GIBCO BRL (Barcelona, España), DIFCO (Madrid, España), Life Technologies (Barcelona, España), MERCK (Málaga, España), Roche (Sevilla, España), Invitrogen (Barcelona, España), Amersham Biosciences (Barcelona, España), Promega (Granada, España), Perkin-Elmer (Barcelona, España), Novagen, Qiagen (Barcelona, España), CLONTECH (Berlin, Alemania) y Hampton Research (Barcelona, España).

1. MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas de guisante (*Pisum sativum L. cv. Lincoln*). Las semillas fueron suministradas por la casa comercial Fito.

Condiciones de germinación de las plantas

Para la obtención de RNA, cDNA o gDNA de plantas de guisante, las semillas se dispusieron sobre vermiculita adecuadamente humedecida en bandejas de plástico. La germinación y crecimiento se realizó en cámara botánica a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PAR) de irradiación, en fotoperiodo de 16 horas y 25/20°C de temperatura día/noche. Se aplicó un riego periódico y el material foliar se recogió a los 14-21 días de germinación.

Para los tratamientos de estrés las semillas se trataron con H₂SO₄ durante 15 minutos y posteriormente se lavaron con agua y se dejaron germinar en placas Petri durante 3 días a 25 °C y oscuridad. Las semillas germinadas fueron transferidas a recipientes de plástico en contacto con una solución nutritiva formada por: (μM):

KNO₃, 1500; Ca(NO₃)₂, 700; MgSO₄, 500; (NH₄)₂HPO₄, 250; H₃PO₃, 11; Fe-tartrate, 12; MnSO₄, 1.3, ZnSO₄, 0.2; Na₂MoO₄, 0.3, CuSO₄, 0.8; pH 5.5. Las plantas fueron cultivadas 11 días en cámara de cultivo con un ciclo día/noche 12/12 h, a 23/18 °C, respectivamente, con una humedad relativa de 50% and 60% y una densidad de flujo fotónico de 170 μmol quanta m⁻² s⁻¹. Las soluciones fueron renovadas cada dos días.

2. ANIMALES

Se utilizaron conejos macho de la raza New Zealand de unos 2-2.5 Kg. de peso, suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra).

Acondicionamiento de los animales

Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con la normativa de la Universidad de Granada para la investigación con animales de experimentación.

Los conejos fueron colocados en jaulas suficientemente amplias para permitir su alimentación *ad libitum* en una habitación mantenida a 25°C iluminada de forma natural. Estos animales tomaron una dieta estándar R-01 ANI087.

3. BACTERIAS

Se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* en este estudio. Se relaciona a continuación cada cepa y el genotipo descrito para ella:

1. DH5 α : *E. coli* endA1 hsdR17 (rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D (lacZYA-argF) U169 (m80lacZDM15).

2. BL21 (DE3): *E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS (rB⁻ mB⁻) gal I (DE3).

4. VECTORES PLASMÍDICOS

Los vectores plasmídicos usados en el estudio y sus características se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de vectores utilizados en el estudio.

Vector	Tamaño (Kb)	Gen resistencia	Utilidad	Casa Comercial
pGEM-T	3.003	Ampicilina	Clonaje de productos de PCR	Promega
pET-3d	4.637	Ampicilina	Expresión de proteínas	Novagen

5. MEDIOS DE CULTIVO, ANTIBIÓTICOS Y OTROS REACTIVOS RELACIONADOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO

Medio LB (Luria Bertani) líquido

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	85 mM

Agua destilada c.s.p.	1L
Ajustar pH a 7.5	

Medio LB agar

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	85 mM
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada c.s.p.	1L
Ajustar pH a 7.5	

5.2. ANTIBIÓTICOS Y OTROS COMPUESTOS RELACIONADOS

Los antibióticos, así como algunos compuestos usados en la selección de clones positivos, se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Antibióticos y otros compuestos relacionados utilizados en el estudio.

Compuesto	Concentración en <i>stock</i>	Concentración en cultivo
Ampicilina	50 g/L	50 mg/L
Isopropil β -D-tiogalacto- Piranósido (IPTG)	1M	250 μ M-1 mM
5-bromo-4-cloro-3- indoil- β - D-galactopiranósido (X- gal)	20 g/L (formamida)	25 mg/L

6. MARCADORES DE PESO MOLECULAR Y TAMPONES DE CARGA

A continuación se detallan los marcadores de peso molecular y tampones de carga usados en el estudio, para DNA, RNA y proteínas.

6.1. DNA

DNA Molecular Weight Marker X.

Este marcador proporciona un rango de marcaje comprendido entre 0.075 y 12.2 Kb. Este marcador fue suministrado por Roche.

Marcador de 100 pares de bases.

Marcador de peso molecular que proporciona un rango de marcaje comprendido entre 0.1 y 1 Kb. Este marcador fue suministrado por BioRad.

DNA Low Mass Ladder

Marcador de peso molecular con un rango de marcaje comprendido entre 100 y 2000 bases. El marcador fue suministrado por GIBCO BRL.

Tampón de carga de DNA.

El tampón de carga se preparó concentrado (6x) siendo su composición la siguiente: 30% (v/v) glicerol y 0.25% (p/v) azul bromofenol-xileno cianol.

6.2. RNA

Tampón de carga de RNA.

La composición del tampón de carga fue la siguiente: 30% (v/v) glicerol, 50%(v/v) formamida, 15% (v/v) formaldehído y 0.25% (p/v) azul bromofenol-xileno cianol, tampón borato 1x (composición para una concentración 10x: ácido bórico 0.5

M, borato sódico 50 mM, sulfato sódico 100 mM, EDTA 10 mM) y agua bidestilada tratada con DEPC al 0.1% (v/v).

6.3. PROTEÍNAS

SDS-PAGE MWM Prestained Broad Range.

Marcador de peso molecular de proteínas utilizado en la electroforesis en geles de poliacrilamida suministrado por BioRad que comprende un rango de marcaje entre 7 y 200 kDa.

LMW Calibration kit for SDS electrophoresis.

Marcador de peso molecular de proteínas utilizado en la electroforesis en geles de poliacrilamida suministrado por Amersham Biosciences que comprende un rango de marcaje entre 14 y 94 kDa.

Kaleidoscope Prestained Standards.

Marcador de peso molecular de proteínas preteñido y usado en la electroforesis de poliacrilamida suministrado por Bio Rad que comprende un rango de marcaje entre 7.21 y 190.586 KDa.

See Blue Plus2 Pre-Stained Standard

Marcador de peso molecular de proteínas preteñido y usado en la electroforesis de poliacrilamida suministrado por Novagen que comprende un rango de marcaje entre 4 y 250 KDa

Tampón de carga de proteínas.

El tampón de carga de proteínas se preparó concentrado 2x, siendo su composición la siguiente: Tris HCl 0.25 mM (pH 6.8), 5% (p/v) SDS, 19.4% (v/v) glicerol, DTT 20 mM, 0.4% (p/v) azul de bromofenol. En el caso de la electroforesis en condiciones no reductoras el DTT fue suprimido del tampón de carga.

7. CEBADORES

Los cebadores utilizados fueron sintetizados en los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” (CSIC, Granada) y la casa ROCHE. En la tabla 3 se describen los cebadores, detallándose su utilidad en este trabajo.

Tabla 3. Relación de cebadores utilizados durante este estudio.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilidad
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación
Sp6	GATTTAGGTGACACTATAG	Secuenciación
Oligo dT	pd(T) ₁₂₋₁₈	Retrotranscripción y obtención de cDNA PrxII F y Trx O2
RACE	GTCCTAGTCGACGCGTGGCC	5'RACE
RACE-T	GGCCACGCGTCGACTAGGAC -T18	5'RACE
A	CTACAGAAAGCTCGCACTGG	Obtención cDNA PrxII F

B	CCAAAGCAAA-GCAGCAGAGAGATC	Obtención cDNA PrxII F y RACE
C	GATCTCTCTGCTGCTTTGCTTTGG	Obtención cDNA PrxII F
1-Prx-F	CAC/CATGGCAAAGGTTGCAACTGGAAGT	Clonaje pET3d RT-PCR Mutagénesis.
2-Prx-R	CCG/GATCCTCAAATTTGTCCAAAAATGGT	Clonaje pET3d, RT-PCR, Mutagénesis
Forward-Cys59Ser	TACAGGAGTTTCTTCAAGCAAAATGTTTC	Mutagénesis C59S
Reverse-Cys59Ser	GTTTGCTGAAGAACTCCTGTATATGC	Mutagénesis C59S
Forward-Cys84Ser	TTCTGTATTCTGTGGCTATTAATGATC	Mutagénesis C84S
Reverse-Cys84Ser	TAATAGCCACAGAAATAACAGAATCAACC	Mutagénesis C84S
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC	PCR Walking
AP2	CTATAGGGCTCGAGCGGC	PCR Walking
AC-F	AAGATCAAGGTCGTTGCACC	RT-PCR Actina
AC-R	TATAATGAGCTT-CGTGTTGC	RT-PCR Actina
1-Trx-F	CAC/CATGGGCCTTATCCTTGTTAATTCTGCG	Clonaje Trx pET3d
2-Trx-R	CCG/GATCCTAGTCCTTCTGAAGAGTTTC	Clonaje Trx pET3d

Prom 1	CTGATTCCATGAAGAACGGAAGACAG	PCR walking
Prom 2	GAAGTCGGTTGATTACAGAGGTTGC	PCR walking
I-F	ATGGCAACCTCTGTAATCAACC	Búsqueda intrones PrxII F
I-R	TCAAATTGTCCCAAAATGGT	Búsqueda intrones PrxII F
Prx A	CAGAAAGCTCGCAGCTGG	Aislamiento PrxII F
Prx B	GAGCAATGCAGCAGAGAGATC	Aislamiento PrxII F
Prx C	GATCTCTGCTGGTTGCTT	Aislamiento PrxII F
Prx D	CTTCTCAGCCCAAGCATTACAG	RACE 5'-PrxIIF
Prx E	CTACAGAAAGCTCGCACTGG	RACE 5'-PrxIIF
Trx A	TGGTGTGGACCTTGCAGG	Obtención cDNA Trx
Trx B	AAGAAATGCAGTGTGGCACA	Obtención cDNA Trx
Trx C	TCTGTGCCAACACTGCATTCTT	Obtención cDNA Trx
Trx D	AAACTGCAACCTGCTCAATGT	RACE 5'-Trx O
Trx E	CCTGCAAGGTCCACACCA	RACE 5'-Trx O

8. APARATAJE Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

8.1 CULTIVOS BACTERIANOS

Cabina estéril de flujo laminar BV100, Telstar.

Estufa de incubación Forma Scientific.

“Incubator shaker” Gallempkamp.

8.2. BIOLOGÍA MOLECULAR

Minicubeta para electroforesis horizontal convencional Mini Sub-Cell GT de BioRad.

Fuentes de alimentación Power-PAC 1000 y Power-Pac Junior de BioRad.

ChemiDoc System de BioRad.

Cycler de BioRad.

Termociclador para PCR Geneamp PCR System 2400 de Perkin-Elmer.

Multiblock termostatzado, Stuart-Scientific.

Espectrofotómetro UV 1603, Shimadzu.

Baño termostatzado SBS.

Balanza AND, modelo GR-202 y Mettler, modelo AE-240.

8.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Baño termostatzado SBS.

Espectrofotómetro UV 1603, Shimadzu.

Sistema de isoelectroenfoque IPGphor II de Amersham-Pharmacia Biosciences

Sistema de electroforesis vertical Mini-Protean System II, BioRad.

Fuente de alimentación Power-PAC 1000 de BioRad.

Fluorímetro: Photon Technology Intenational Quantum Master-200-4 Fluorometer

Microcalorímetro: VP-Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA)

Sistema de cromatografía FPLC y columnas cromatográficas, Amersham Biosciences.

Lector de placa Titertek Multiskan II Plus.

Homogeneizador mecánico, Heidolph.

Homogeneizador mecánico, Polytron.

Prensa French, SLM Aminco.

Sonicador SONICS VC130PB-1

8.4. CENTRÍFUGAS Y ROTORES

Ultracentrífuga refrigerada TL-100, Beckman

Microcentrífuga refrigerada de mesa 5415 R, Eppendorf.

Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B.

Rotores Sorvall SS-34 y GSA.

8.5. MATERIAL PARA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E.

Microscopio electrónico de transmisión ZEISS 10C.

8.6. MATERIAL PARA CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA

Placas de cristalización por difusión de vapor VDX, Hampton Research.

“*Screening*” de cristalización HR2-110, Hampton Research.

Cubreobjetos siliconados.

Difractómetro de rayos X: detector Platinum 200 CCD acoplado a un goniómetro de cuatro círculos Kappa con radiación Cu $K\alpha$ de un Micro-focus Microstar generador de ánodo rotatorio (Broker AXS)

8.7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los ordenadores utilizados para la elaboración y análisis de resultados incluyen PC Pentium III y IV. Se detalla a continuación los programas utilizados en ellos:

Windows 98 y XP, Microsoft.

Paquete Microsoft Office 97, 2000 y XP (Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Power point).

Programa para analizar geles de agarosa y fotografías Quantity One.

Programa para estudiar las secuencias nucleotídicas Chromas 1.45, Anthenuc y Antheprot.

Programa para la predicción de las características físicas ProtParam y programa para la predicción de péptidos señales y localización subcelular ChloroP, MITOPROT y PSORT, proporcionados por el servidor ExPASy (www.expasy.org).

Programa para la búsqueda de regiones de unión del DNA para los factores de transcripción proporcionado por el servidor PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>).

Programa para la búsqueda de intrones y exones de las secuencias de DNA facilitado por el servidor GENSCAN (www.genes.mit.edu/GENSCAN.html).

Programa para el alineamiento de las secuencias clustalw proporcionado por el servidor ebi (www.ebi.ac.uk).

Programas para la modelización de proteínas Rasmol versión 2.7.1 (Ras Win Molecular Graphics) y Swiss pdb-Viewer versión 3.7 (GlaxoSmithKline R&D y Swiss Institute of Bioinformatics).

Programa de análisis estadístico SigmaStat 2.

Bases de datos consultadas: PubMed, BLAST, dentro de la dirección de Internet www.ncbi.nlm.nih.gov y FASTA 33 dentro de la dirección de Internet www.ebi.ac.uk.

METODOLOGÍA

1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

1.1 PROPAGACIÓN DNA PLASMÍDICO

1.1.1 Preparación de bacterias competentes

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

Reactivos y soluciones utilizados:

Medio LB-agar (ver apartado **5.1** de la sección de Materiales).

Medio LB líquido (ver apartado **5.1** de la sección de Materiales).

Solución A. MgCl₂ 100 mM

Solución B. CaCl₂ 100 mM

Solución C. CaCl₂ 100 mM, 15% (v/v) glicerol.

Se sembraron las bacterias en una placa de LB-agar. La placa se incubó durante 12 horas en una 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, 1ml de este cultivo líquido se utilizó para inocular 100 ml de medio LB incubándose a 37°C en 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 minutos, para detener el crecimiento bacteriano, y se centrifugó a 4°C, y 3000 xg durante 10 minutos.

El precipitado resultante se resuspendió en 30 ml de la solución A fría. Se centrifugó a 4°C y 2100 xg durante 10 minutos.

El precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de la solución B y se dejó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se volvió a centrifugar a 4°C y 2100 xg durante 10 minutos.

Finalmente el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución C y se recogieron alícuotas de 100 µL que se guardaron a -80°C hasta su uso.

1.1.2. Transformación de bacterias competentes. Choque térmico

Reactivos y soluciones utilizados:

Medio LB líquido (ver apartado **5.1** de la sección de Materiales).

Medio LB-agar (ver apartado **5.1** de la sección de Materiales).

Bacterias competentes.

Antibióticos adecuados. (Ver apartado **5.2** de la sección de Materiales).

La técnica de transformación utilizada en este trabajo de investigación fue el choque térmico. La técnica comenzó con una incubación de 1 hora en hielo de una alícuota de 100 µL de las bacterias competentes con el DNA recombinante que se deseaba transformar. Posteriormente, se incubó la mezcla a 42°C durante 2 minutos en lo que se denomina choque térmico, que induce a las bacterias a aceptar moléculas de DNA.

Tras el choque térmico se añadió 1 ml de medio LB a la muestra y se incubó a 37°C durante 1 hora lo que permite a las bacterias expresar el gen que les confiere resistencia a los antibióticos usados. Por último, se sembraron las bacterias ya transformadas en medio LB-agar al que se añadieron los antibióticos y marcadores de selección adecuados.

Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas.

1.2. 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 dos protocolos diferentes de aislamiento en función del grado de pureza necesario y de la utilidad final del DNA obtenido.

1.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico mediante kits comerciales

Se utilizaron tres kits comerciales, “*Concert Rapid Plasmid Purification System*” (Gibco BRL), “*QIAPREP Spin Miniprep Kit*” (QIAGEN) y *Gen Elute 5-Minute Plasmid Miniprep Kit* (SIGMA). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante obteniéndose DNA libre de RNA. Este método se utilizó para obtener el DNA plasmídico con el que se llevaron a cabo procesos de secuenciación, clonación o digestión con enzimas de restricción.

1.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico mediante lisis por ebullición

Se utilizó el método de Sambrook *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Este método fue el de elección en la extracción de DNA plasmídico para el chequeo rutinario de colonias.

Reactivos y soluciones utilizados:

Solución STET. 8% (p/v) Sacarosa, 0.5% (v/v) Tritón X-100, EDTA 50 mM (pH 8.0) y Tris HCl 50 mM (pH 8.0).

Solución A. Lisozima (35 µg/ml) y Tris HCl 10 mM (pH 8.0).

Isopropanol.

Solución de RNasa (10 mg/ml).

Se centrifugaron 3 ml de cultivo en fase estacionaria en una microcentrífuga a 16000 xg. A continuación, se resuspendió el precipitado en 330 µL de solución STET, se adicionaron 10 µL de solución A y se hirvió durante 3 minutos. De esta manera se rompen las bacterias por la acción conjunta de la lisozima, el tritón y el calor. Posteriormente se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 16000 xg.

El precipitado resultante, que comprende al DNA genómico y a los restos celulares, se desechó y al sobrenadante se le añadieron 330µL de isopropanol frío para precipitar el DNA plasmídico, se mezcló bien mediante inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugó a 16000 xg durante 15 minutos y el precipitado se secó y se resuspendió en un volumen adecuado de agua estéril.

Para eliminar el RNA contaminante se adicionó RNasa (1 µg/µL) a las muestras, que fueron incubadas en un baño a 37°C durante 15 minutos.

1.3. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Las moléculas de DNA con un tamaño comprendido entre 200 bp y 50 Kb de longitud se pueden separar en geles de agarosa de diversa concentración. Este tipo de geles se someten a electroforesis horizontales en un campo eléctrico de dirección constante.

Reactivos y soluciones utilizados:

Agarosa.

Tampón de carga de DNA 6x (ver apartado 6.1 de la sección de Materiales).

Marcador de peso molecular (ver apartado 6.1 de la sección de Materiales).

Tampón TAE (Tris acetato 0.04 M (pH 8.0), EDTA 1mM).

Solución de bromuro de etidio al 2% (p/v) en TAE.

Se prepararon los geles en tampón TAE, pesando la cantidad adecuada de agarosa en función de la concentración del gel deseada. Esta concentración dependió del fragmento o fragmentos de DNA que se deseaba separar (Tabla 4). Posteriormente se calentó la mezcla hasta ebullición y se vertió en el molde dejándose solidificar.

Tanto las muestras de DNA como el marcador de peso molecular se mezclaron con tampón de carga y se adicionaron a los pocillos del gel.

A continuación se procedió a la electroforesis del gel a 70 V. Por último, se tiñó el gel en la solución de bromuro de etidio durante 5 minutos y se observaron las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta.

Tabla 4. Concentraciones de agarosa a utilizar en la preparación de geles destinados a la separación de DNA.

% Agarosa	Tamaño de DNA (Kb)
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

1.4. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Se cortaron los fragmentos de los geles de agarosa que contenían el DNA de interés y se procedió a la extracción del DNA de estos fragmentos. El método utilizado fue mediante la utilización de kits comerciales.

Se utilizaron dos kits comerciales para la purificación de DNA contenido en fragmentos de geles de agarosa. El primero fue el kit comercial “*Concert Rapid Gel Extraction System*” suministrado por la casa comercial Gibco BRL, y el segundo el kit comercial “*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit*” suministrado por la casa comercial Amersham Biosciences. El DNA se purificó en ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.5. PURIFICACIÓN DE DNA CON FENOL-CLOROFORMO

Reactivos y soluciones utilizados:

Fenol (pH 8.0):cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (v/v/v).

Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) (v/v).

Acetato sódico 3 M (pH 5.2).

Etanol absoluto.

Etanol al 75% (v/v).

Este método no permite la purificación de DNA si el volumen es pequeño por lo que cuando se trata de purificar DNA de soluciones inferiores a 100 μ L, lo primero que se hace es completar el volumen hasta 100 μ L con agua estéril. Posteriormente se le añade el mismo volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se agita y se centrifuga a 16000 xg durante 1 minuto, se recoge la fase acuosa y se repite el proceso dos veces más, una con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y otra con cloroformo:alcohol isoamílico, eliminándose así las proteínas contaminantes. Tras la

última extracción, para precipitar el DNA, se añade el 10% del volumen de acetato sódico 3 M (pH 5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incuba 1 hora a -20°C. Pasado este tiempo se centrifuga a 16000 xg durante 30 minutos y el precipitado se lava con etanol al 75% (v/v) para quitar los restos de sales que puedan quedar y pequeñas partículas orgánicas, se centrifuga 15 minutos a 16000 xg, se seca el precipitado y se resuspende en un volumen adecuado de agua estéril.

Se obtiene de esta manera un DNA de gran pureza y alta concentración.

1.6. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DE DNA

1.6.1. Reacciones de ligación

El proceso de clonación consiste en la obtención de un clon, entendido como un conjunto de “elementos” genéticamente idénticos entre sí y a su precursor. Cada componente individual de un clon contiene la misma información genética, el mismo genotipo, que el elemento de partida; por ello, se puede considerar que la clonación supone una amplificación genética.

Las reacciones de unión de DNA purificado a los vectores plasmídicos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón de ligasa (10x) (Tris HCl 60 mM (pH 7.8), MgCl₂ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM y 10% (v/v) PEG).

T₄ DNA ligasa.

DNA de interés.

Vector plasmídico adecuado.

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 T₄ DNA ligasa, A continuación, se añadió agua hasta completar un volumen de 10 μL y por último, se incubó la reacción en un baño a 10°C durante 18 horas.

1.6.2 Reacciones de digestión con enzimas de restricción

El tratamiento de DNA con enzimas de restricción es conocido como digestión.

Todas las reacciones de digestión realizadas en el estudio siguieron un mismo procedimiento que consistía en tratar el volumen adecuado de DNA, vector plasmídico o vector recombinante con 10-15 U del 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 horas a 37°C. En el caso de las digestiones realizadas con dos enzimas de restricción el tiempo de incubación se incrementó hasta 3 horas.

1.6.3. Reacciones de retrotranscripción. Obtención de cDNA

La retrotranscripción consiste en la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mediante la acción de una transcriptasa reversa obteniéndose como producto final cDNA.

Todas las reacciones de retrotranscripción realizadas en este trabajo se llevaron a cabo utilizando la retrotranscriptasa Superscript II RNasa H suministrada por la casa comercial Invitrogen. Para su utilización se siguieron las instrucciones del fabricante.

1.6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, o indirecta de un RNA (en este caso sería necesario una retrotranscripción previa), presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra íntegra original. Sin embargo es imprescindible que se conozca la secuencia de una parte de la región de DNA o RNA que se quiere amplificar aunque también se puede utilizar para amplificar DNA o RNA desconocido mediante el diseño de oligos degenerados o heterólogos.

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón 10xPCR.

dNTPs 10 mM (dCTP, dTTP, dATP, dGTP).

MgCl₂ 50 mM.

Taq polimerasa (Eco Taq Plus de Ecogen).

DNA molde (según el experimento a realizar).

Cebadores (según el experimento a realizar. Ver el apartado 7 de la sección de Materiales).

Todas las reacciones de PCR realizadas en este estudio se llevaron a cabo utilizando tampón de PCR 1x, dNTPs 0.4 mM, cebadores 0.4 µM, 2 mM MgCl₂ y 1 unidad de taq polimerasa y como molde DNA, gDNA o cDNA obtenido por retrotranscripción, para un volumen final de 25 µL.

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. De forma similar el número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento.

1.6.5. PCR sobre colonia

Tras la transformación con una mezcla de ligación, obtenemos una placa con una determinada cantidad de colonias, unas positivas (Vector + inserto) y otras no (Vector recircularizado). El realizar amplificación por PCR sobre colonias potencialmente positivas nos permite ahorrar tiempo (casi 1 día) 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 de dos maneras. La primera consistió en añadir la colonia directamente 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 la segunda opción fue necesario un paso previo en el cual la colonia fue depositada en un tubo de 0.5 ml con 5 µl de agua bidestilada. La suspensión se hirvió a 100°C durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm en centrífuga de mesa refrigerada, durante 3 min, utilizándose un µl del sobrenadante resultante como molde de la reacción de PCR. De esta forma se consiguen eliminar los restos celulares y la agarosa, que puede interferir en la función de la Taq polimerasa.

1.6.6. RT-PCR

En ciertas ocasiones se utilizó el kit de Promega “*Access RT-PCR System*”, que incorpora la transcriptasa reversa AMV para el primer paso de síntesis de cDNA, y para la amplificación la DNA polimerasa de *Thermus flavus*, sobre la que, aparentemente, la transcriptasa reversa AMV no tiene efectos negativos. Este sistema incluye un único tampón optimizado para ambas reacciones, lo que permite la reacción completa de RT-PCR de una sola vez en un único tubo. Las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante.

1.6.7. RT-PCR semicuantitativa

La RT-PCR es un método específico y sensible muy utilizado para medir transcritos de RNA y la detección de cambios en sus niveles de transcripción bajo diferentes condiciones experimentales utilizando siempre como referencia un gen constitutivo.

Los RNA de hojas y raíces de guisante fueron extraídos según se detalla en el apartado **2.1.** de la sección de metodología.

Para los estudios de RT-PCR semicuantitativa el RNA fue sometido a un pretratamiento para eliminar las impurezas de DNA con DNAasa I como a continuación se detalla:

Digestión del DNA: 5 µg RNA

1 µl DNAasa I Reaction Buffer

1 µl DNA-asa I, Qiagen (Barcelona, España)

Incubación de 25 minutos a temperatura ambiente.

Adición de 1 µl de EDTA 25 mM.

Incubación de veinte minutos a 70°C.

Enfriamiento las muestras durante cinco minutos 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 la temperatura de 37°C.

El número de ciclos mínimo de PCR al que se detectaban concomitantemente tanto la actina (gen constitutivo) como la PrxII F (gen de estudio) fue de 28. 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 28 ciclos. Una vez estandarizada la actina y conocidas las diluciones pertinentes del cDNA a tomar se realizaron las PCR de la PrxII F y actina de forma paralela.

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón 10xPCR.

dNTPs 10 mM (dCTP, dTTP, dATP, dGTP).

MgCl₂ 50 mM.

Taq polimerasa (Eco Taq Plus de Ecogen).

cDNA molde

Cebadores: ACF, ACR para actina y 1-Prx-F y 2-Prx-R (ver apartado 7 de materiales)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización del cDNA, de 3 minutos a 94°C, seguida de 28 ciclos que contenían una fase de desnaturalización a 94°C 30 segundos, seguida de una fase de hibridación a 55°C otros 30 segundos y finalmente un periodo de extensión de 30 segundos a 72°C.

1.6.8. Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5'RACE)

El procedimiento conocido como RACE es una técnica que permite la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de mRNA entre un sitio definido interno y secuencias desconocidas en el extremo 3' ó 5'. Es una técnica utilizada con diversas aplicaciones. El método ha sido revisado por Frohman (1993) y Loh (1991) y

aunque la estrategia general es la misma en todos los casos el protocolo varía entre los distintos usuarios. En nuestro caso usamos el procedimiento que se describe a continuación.

Reactivos y soluciones utilizados:

Superscript II retrotranscriptasa (Invitrogen).

RNasa H (Amersham Biosciences).

Kit de purificación de DNA ("*Concert Rapid Purification System*" de Gibco).

dATP 2.5 mM.

Transferasa de deoxinucleótidos terminal (*Amersham Biosciences*).

Cebadores RACE, RACE-T, Prx D y Prx E (ver apartado 7 de la sección de Materiales).

Reactivos específicos para PCR.

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' (en nuestro caso fue poliA) y un segundo paso en el que se llevan a cabo dos reacciones de PCR.

Obtención del cDNA

Se retrotranscribió mRNA de hojas jóvenes de guisante usando la Superscript II retrotranscriptasa. Con 20 μ L de la mezcla de cDNA/mRNA obtenida se llevó el volumen hasta 100 μ L con agua estéril y se trató con 1 unidad de RNasa H para degradar el mRNA y dejar sólo el cDNA. Se incubó 30 minutos a 37°C y se purificó el cDNA de cadena sencilla con el kit "*Concert Rapid Purification System*" resuspendiendo en 43 μ L de agua.

Para añadirle al cDNA la cola de poliA en el extremo 3' se tomaron 34 μ L del cDNA purificado y se le añadió 10 μ L de tampón 5x, 4 μ L de dATP 2.5 mM y 1 μ L de agua. La mezcla se incubó 3 minutos a 94°C, se enfrió en hielo y se le añadió 15

unidades de la enzima transferasa de deoxinucleótidos terminal (TdT). Se incubó 30 minutos a 37°C y se inactivó la enzima incubando 10 minutos a 70°C.

El cDNA así tratado contenía una cola de poliA en el extremo 3' y se guardó a -20°C hasta su uso.

Reacciones de PCR

El cDNA anteriormente obtenido se utilizó como molde para una primera reacción de PCR en la que los cebadores que se utilizaron fueron el cebador Prx E y el cebador RACE-T. Este cebador contiene una secuencia de poli-T más una secuencia adaptadora en el extremo 5'. El producto de esta PCR se usó como molde para una segunda reacción de PCR en la que como cebadores se utilizaron el cebador Prx D y el cebador 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 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos que contenían una fase de desnaturalización a 94°C 30 segundos, seguida de una fase de hibridación a 55°C otros 30 segundos y una fase final de extensión de 30 segundos a 72°C.

1.6.9. Mutagénesis dirigida

Las mutaciones que se realizaron en la PrxII F se llevaron a cabo mediante técnicas de PCR solapante con cebadores específicos que portaban la mutación que posteriormente produciría el cambio aminoacídico de cisteína (TGT) hasta serina (TCT). Se elaboraron dos mutantes. El mutante C59S que carecía de la cisteína 59 y el mutante C84S que carecía de la cisteína 84.

Los cebadores utilizados se pueden ver en el apartado 7 de la sección de materiales. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización del cDNA, de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que contenían una fase de desnaturalización a 94°C 30 segundos, seguida de una fase de hibridación a 60°C otros 30 segundos y una fase final de extensión de 30 segundos a 72°C.

Primeramente, para cada mutante se hicieron dos PCR de forma independiente tomando cDNA de hojas de guisante como molécula de molde. En la primera PCR se usaron los cebadores Reverse- Cys_{59Ser} / 1-Prx-F y Reverse-Cys_{84Ser}/ 1-Prx-F para el mutante C59S y mutante C84S respectivamente. En una segunda PCR se utilizaron las combinaciones Forward- Cys_{59Ser} / 2-Prx-R para la proteína C59S y Forward- Cys_{84Ser} / 2-Prx-R para la proteína C84S.

Seguidamente se procedió a una tercera PCR para cada mutante. En ésta se tomaba como molde una mezcla de los cDNA obtenidos para el mutante C59S o C84S en cada una de las PCR anteriores (2µl de cada mezcla). Los cebadores usados fueron la pareja 1-Prx-F y 2-Prx-R. Los productos de PCR obtenidos de este tercer paso se clonaron en vector pGEM-T y se secuenciaron.

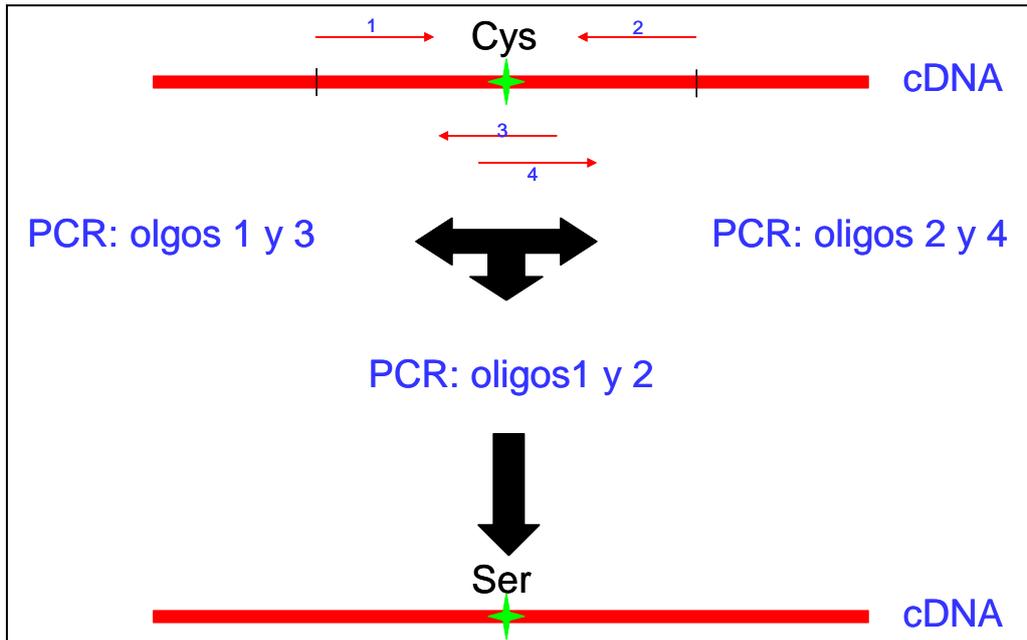


Figura 16. esquema del proceso de la mutagénesis dirigida por PCR solapante.

1.6.10. PCR Walking

El método de “PCR Walking” (Devic et al., 1997) permite amplificar un fragmento de DNA genómico, específico de una secuencia de la cual no se conoce uno de los extremos. Se ha utilizado para amplificar y conocer la secuencia en 5', desde el inicio de la secuencia traducible (5'-UTR y secuencias reguladoras en 5'-Upstream).

Pretratamiento del gDNA:

La extracción de gDNA se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.5 de la sección de metodología. Para el empleo de esta variante de PCR se utilizaron bancos de DNA molde, obtenidos tras la digestión de gDNA con una enzima de restricción. Posteriormente, a cada uno de los fragmentos de restricción se

les adicionó, en ambos extremos, adaptadores oligonucleótidos de secuencia conocida (figura 17). En nuestro trabajo hemos realizado 7 bancos diferentes, cada uno procedente del empleo de una enzima de restricción distinta (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaII*, *SspI*, *StuI* y *HpaI*).

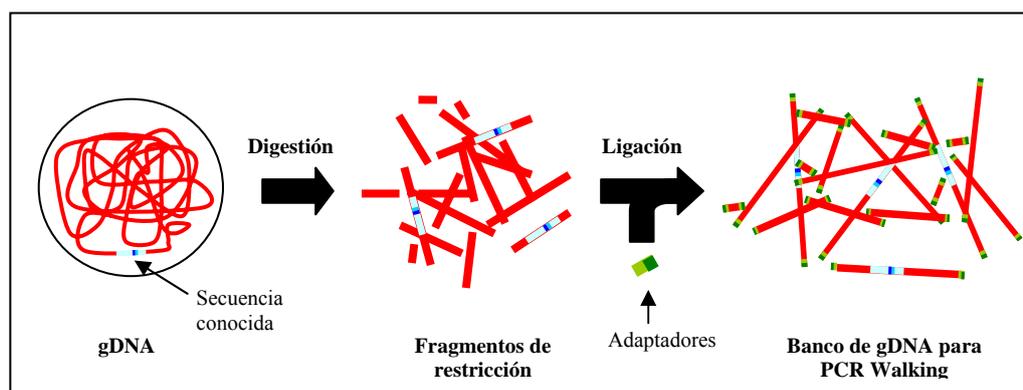


Figura 17. Síntesis del banco de DNA para PCR Walking

Reacciones de PCR:

La técnica se basa en la realización de 2 reacciones consecutivas de PCR (Figura 18). En la primera se utilizó un cebador (AP1) que es homólogo al extremo del adaptador, y otro que hibrida con la secuencia genómica que conocemos (Prom 1). Después, en la segunda PCR, utilizando el producto amplificado en la primera, se emplearon otras parejas de cebadores yuxtapuestas a las dos anteriores (AP2 y Prom 2). Esta segunda reacción permitió aumentar la especificidad del producto obtenido.

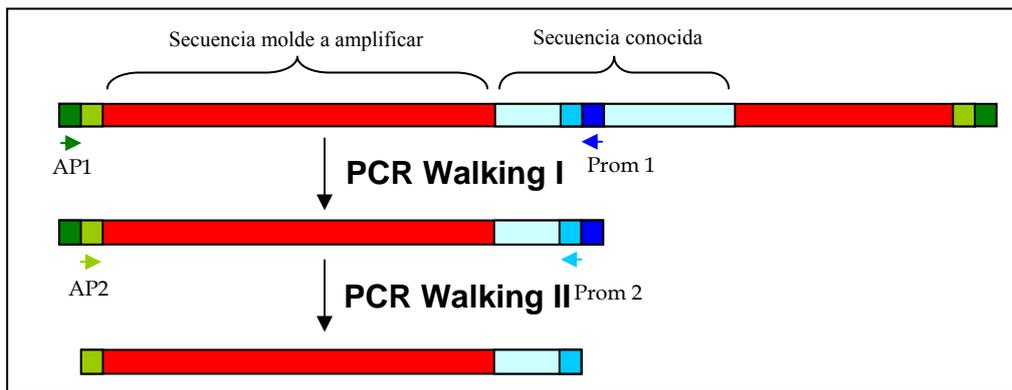


Figura 18. Fundamento de PCR Walking

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo mediante una primera fase de desnaturalización del cDNA, de 3 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos que contenían una fase de desnaturalización a 94°C 30 segundos, seguida de una fase de hibridación a 60°C otros 30 segundos y una fase final de extensión de 2 min a 72°C.

1.6.11. Búsqueda de intrones PrxII F

Para conocer la secuencia de intrones-exones de la Prx se procedió sencillamente a realizar una PCR con los oligos 1-PrxII-F y 2-PrxII-R. Las condiciones de PCR fueron exactamente las mismas que las que se utilizaron para PCR Walking (apartado 1.6.11.) El inserto obtenido de 1435 pb se clonó en pGEM-T y fue secuenciado. El la secuencia intrónica-exónica fue dilucidada gracias al programa bioinformático para el alineamiento de secuencias Clustalw proporcionado por el servidor ebi (www.ebi.ac.uk).

1.6.12. Secuenciación de DNA

La secuenciación se realizó 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 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction kit”, Perkin Elmer) (método de Sanger modificado). Las reacciones se realizaron utilizando Amplitaq FS.

2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA y gDNA

2.1. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDOS FOLIARES

La obtención de RNA sin degradar es esencial para el estudio de expresión y regulación génica. Con los dos métodos utilizados conseguimos aislar RNA nuclear intacto y una mezcla de RNA citoplasmático (m-, r-, y t-RNA).

El aislamiento de RNA utilizado en este trabajo se realizó en hielo para minimizar los efectos de las RNasas. Con el mismo fin todo el equipamiento y las soluciones utilizadas fueron tratadas con un inhibidor de RNasas, el dietil pirocarbonato (DEPC).

2.1.1. Extracción de RNA total mediante el método del fenol-SDS

Reactivos y soluciones utilizados:

Solución TLES: Tris HCl 50 mM (pH 9.0), ClLi 150 mM, EDTA 5 mM y SDS 5% (p/v).

Fenol:cloroformo 25:24 (v/v).

CILi 4 M.

Etanol absoluto.

Agua tratada con DEPC 0.1% (v/v).

Se cogieron 3-5 gramos de hojas y se redujeron a polvo con nitrógeno líquido utilizando un mortero de porcelana. La muestra se trató con 5 ml de solución TLES, y se homogeneizó en el mortero.

La mezcla resultante se pasó a un tubo Falcon, se la añadió un volumen de fenol:cloroformo y se agitó vigorosamente. Se centrifugó a 10000 xg y 4°C durante 5 minutos y se recogió la fase acuosa repitiendo la extracción con fenol:cloroformo dos veces más. De esta manera se lisaron las células y se eliminaron las proteínas contaminantes.

Tras la última centrifugación se pasó la fase acuosa a otro tubo Falcon y se añadió un volumen de CILi 4M, dejándolo incubando toda la noche a -20°C. El CILi permite mediante precipitación selectiva la separación del RNA de DNA y otras impurezas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla a 15000 xg y 4°C durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 0.5 ml de agua DEPC y se le añadió de nuevo un volumen de fenol:cloroformo, se agitó bien y se centrifugó a 15000 xg y 4°C durante 5 minutos.

Se recogió la fase acuosa y se le añadió dos volúmenes de etanol frío, dejándolo una hora a -20°C para que precipitara el RNA. Tras incubar se centrifugó a 15000 xg y 4°C durante 20 minutos. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v), centrifugando posteriormente. El precipitado resultante se secó y resuspendió en un volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

2.1.2. Extracción de RNA total con Trizol

El Trizol es un reactivo comercial suministrado por la casa comercial Invitrogen, compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidinio, que permite obtener en poco tiempo un RNA total de gran pureza. En este caso se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.2. EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO

Se utilizó el “*mRNA isolation kit*” de Roche, con el que se aísla mRNA poliadenilado utilizando oligo-dT biotina y partículas magnéticas de estreptavidina. Se siguieron las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se utilizó el método de extracción con tiocianato de guanidina debido al alto contenido de RNasa de los tejidos vegetales (Wadsworth *et al.*, 1988; Venugopalan and Kapoor., 1997). El protocolo seguido fue el siguiente:

Reactivos y soluciones utilizados

Tampón de lisis I. Tris HCl 0.1 M (pH 8.0), tiocianato de guanidina 4 M, DTT 1% (p/v), laurilsarcosina 0.5% (p/v).

Tampón de dilución. Tris HCl 0.1 M, CILi 5 M, EDTA 0.5 M (pH 8.0-8.5).

Tampón de lisis II. Tris HCl 0.1 M pH 7.5, CILi 0.3 M, EDTA 10 mM, dodecil sulfato de litio 1% (p/v), DTT 5 mM.

Tampón de lavado. Tris HCl 10 M (pH 7.5), CILi 0.2 M, EDTA 1 M.

Agua libre de RNasas.

Se colocaron de 100 a 500 mg de tejido en un mortero de porcelana previamente enfriado. Se añadió nitrógeno líquido y se redujo el tejido a un fino polvo. Sin dejar que se descongelara, se agregó tampón de lisis I en una proporción de 400 μ L de tampón por cada 100 mg de tejido. Se homogeneizó el tejido con el tampón, se pasó cuatro veces por aguja y jeringas estériles, y se depositó el homogenado en tubos Eppendorf de 2 ml.

Se centrifugó la suspensión durante 30 segundos a 11000 xg, y se transfirieron 400 μ L del sobrenadante a otro tubo que contenía 1.1 ml de tampón de dilución.

Se agregaron 1.5 μ L de oligo dT-biotina, y se dejaron los tubos en hielo mientras se preparaban las partículas magnéticas.

Para la preparación de éstas, alícuotas de 150 μ L de suspensión de las mismas se dispusieron en sendos tubos, que se colocaron en el separador magnético, descartándose el líquido de conservación. Las partículas se lavaron una vez con tampón de lisis II, y se volvieron a separar magnéticamente, desechándose el agua de lavado.

A los tubos con las partículas se le añadieron los extractos con oligo-dT biotina, mezclándose suavemente hasta dispersión total. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 5 minutos, seguido de 3 minutos más en el separador. Se descartó la solución sobrenadante, y las partículas se lavaron tres veces más con el tampón de lavado, separando las partículas y descartando el líquido cada vez.

Las partículas se resuspendieron en 25 μ L de agua libre de RNasas, calentándose la suspensión a 65°C durante 2 minutos. Se separaron las partículas magnéticamente, y la solución de mRNA se transfirió a un nuevo tubo.

Las partículas se podían reutilizar dos veces más. Para regenerarlas se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE RNA

La cantidad de RNA que contenían las muestras se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 40 μ g de

RNA). La pureza de las muestras obtenidas se determinó obteniendo la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm (la relación debe estar entre 1.8 y 2).

2.4. ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DE AGAROSA

Reactivos y soluciones utilizados:

Agarosa.

Formaldeído 37% (v/v).

Tampón de carga de RNA (ver apartado 6.2 de la sección de Materiales).

Solución de bromuro de etidio al 2% (v/v) en borato 1x.

Tampón Borato 10x. Ácido bórico 0.5 M, borato sódico 50 mM, sulfato sódico 100 mM, EDTA 10 mM.

Todos los reactivos utilizados, excepto la solución de EDTA fueron preparados en agua tratada con DEPC tal y como se recoge en el apartado 2.1 de esta sección de Metodología.

Se prepararon geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón borato 1x. Se calentó la mezcla hasta ebullición y se adicionó formaldeído, en frío, hasta una concentración final de 0.8% (v/v). Posteriormente, se vertió la mezcla en el molde dejándose solidificar.

Con el fin de desnaturalizar el RNA, se incubaron las muestras durante 10 minutos a 65°C antes de cargarlas en el gel. Las muestras contenían 5 µL de tampón de carga y 2 µL de una solución de bromuro de etidio, lo que nos permitía observar las muestras a la luz ultravioleta y comprobar así la calidad del RNA.

A continuación se procedió a la electroforesis del gel a 70 V durante aproximadamente dos horas en frío. El tampón utilizado para la electroforesis fue borato 1x.

2.5. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO (gDNA)

El gDNA extraído de hojas de guisante fue necesario para llevar a cabo la búsqueda de regiones promotoras así como para determinar la secuencia intrónica-exónica del gen de la peroxirredoxina mitocondrial de guisante.

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.

3. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se realizó partiendo de hojas de guisante. Se homogeneizó el tejido vegetal a una relación 1/4 (p/v) con tampón Tris HCl 25 mM (pH 7.5), MgCl₂ 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA Na₂ 0.5 mM. Se centrifugó posteriormente a 11000 xg durante 15 minutos, recogiendo el sobrenadante en el que se midió el contenido proteico y se analizó el contenido de proteínas específicas mediante *Western-blot*.

3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO

La concentración proteica de las diferentes muestras ensayadas en el estudio se determinó siguiendo el método colorimétrico de Bradford (1976), el cual se basa en la observación del cambio del máximo de absorbancia, de 465 a 595nm, 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, que en este caso fue albúmina sérica bovina, a dicho colorante.

Reactivos y soluciones utilizados:

Solución de Azul Coomassie R-250 en ácido fosfórico y metanol (BioRad).

Solución estándar de albúmina sérica bovina (50 µg/ml).

Las muestras se prepararon en un volumen total de 800 µL, completando con agua destilada. Se añadió a cada muestra 200 µL de la solución colorante y se agitó. Posteriormente se realizó la medida a 595 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos se extrapolaron en una curva patrón utilizando como estándar albúmina sérica bovina (50 µg/ml).

Ocasionalmente las proteínas fueron medidas en espectrofotómetro Nano Drop ND-1000 que realiza las determinaciones a una λ de 280 nm.

3.3. ELECTROFORESIS UNIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS

Reactivos y soluciones utilizados:

Acrilamida 30% (p/v)/bisacrilamida 0.8 % (p/v).

Tris HCl 1.5 M (pH 8.8).

Tris HCl 0.5 M (pH 6.8).

SDS al 10% (p/v).

Persulfato amónico al 10% (p/v).

TEMED.

Tampón de electroforesis: Tris HCl 0.025 M (pH 8.3), glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v).

La concentración de acrilamida/bisacrilamida del gel separador fue del 12.5% ó 15% (v/v) en función del experimento a realizar. Para el gel concentrador se utilizó

una concentración del 6% (v/v). En el caso de electroforesis en condiciones no reductoras el DTT se suprimió del tampón de carga. Los reactivos utilizados y las fórmulas de preparación para dos minigeles (Mini-Protean II, BioRad) se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 5. Concentraciones de los geles de poliacrilamida utilizados en el estudio.

Reactivo	Gel separador	Gel separador	Gel concentrador
	15%	12.5%	6%
Acrilamida 30% (p/v)/bis-acrilamida 0.8% (p/v)	5 ml	4 ml	0.6 ml
Tris HCl 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml	2.5 ml	
Tris HCl 0.5 M (pH 6.8)			0.75 ml
Agua destilada	2.35 ml	3.35 ml	1.62 ml
SDS 10% (p/v)	100 μ L	100 μ L	30 μ L
Persulfato amónico al 10% (p/v).	50 μ L	50 μ L	15 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L	3.6 μ L

El desarrollo electroforético se llevó a cabo en tampón de electroforesis, y a un voltaje constante de 150 voltios.

3.4. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional consiste en una separación secuencial de los polipéptidos según su punto isoeléctrico (pI) mediante un isoelectroenfoque (IEF) y posteriormente por su masa molecular mediante una electroforesis en gel (SDS-PAGE).

3.4.1. Preparación de la muestra

Tanto las proteínas procedentes de extractos crudos como las proteínas de mitocondrias se concentraron mediante precipitación con acetona a -20°C . Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 150 μl de un tampón de lisis compuesto por urea 8M, CHAPS 2% M/V, Tris 40mM y agua. El siguiente paso consistió en la limpieza de las muestras con el Kit 2-D Clean-Up Kit de Amersham Biosciences siguiendo el manual facilitado. Por último las proteínas se resuspendieron en 250 μl de tampón de lisis. La cantidad de proteínas presente en las muestras se cuantificó con el Kit 2-D Quant Kit de Amersham Biosciences. Seguidamente se adicionó 100 μl de tampón de rehidratación compuesto por urea 8M, CHAPS 2%(M/V), una pequeña cantidad de azul de bromofenol y agua.

3.4.2. Primera dimensión (IEF) en tiras con gradiente de pH inmovilizado

Se emplearon tiras IPG pH 4-7 de 11 y 18 cm de Bio-Rad y Amersham Biosciences prespectivamente que fueron rehidratadas de forma activa en la bandeja de IEF a 5 V y 20°C durante un mínimo de 14 h. En el caso de la PrxII F recombinante purificada se cargaron hasta 14 μg de proteína mientras que para las proteínas procedentes de extractos crudos de hoja o mitocondrias se tomó la cantidad de 650 μg . A fin de proteger la muestra y evitar su evaporación se cubrió la tira con un aceite mineral que no interfiere en el proceso. Previo al enfoque se colocaron los pequeños trozos de papel de filtro entre el electrodo y la tira y en los dos extremos de la misma.

El IEF se llevó a cabo en un aparato *IPGphor II System* con un programa de tres pasos: 1º) 15 min 250 V, 2º) 2 h para alcanzar a partir de los 250 los 8000 V, de forma lineal (rampa rápida) y el 3º) el tiempo requerido para aplicarle a la muestra a 8000 V/h un total de 35.000 V. En condiciones ideales la primera dimensión se desarrolló en un total de 7 h. Una vez finalizada se extrajo la tira y se incubó 10 min en tampón de equilibración (Tris-HCl 50 mM a pH 6.8, Urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, DTT 2% y azul de bromofenol 0.02 %) y se realizó la segunda dimensión. Si la tira IPG no se iba a utilizar en el momento se extraía de la bandeja, retirándose los restos de aceite mineral, para conservarla en seco a -20°C.

3.4.3. Segunda dimensión

Se preparó un gel SDS-PAGE con una concentración de poliacrilamida del 12,5%, con unas dimensiones de 14x21 cm y 1 mm de grosor. Se depositó el gel de tira IPG en la parte superior de su 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 que orientara a la hora de localizar las proteínas. Para el desarrollo electroforético se utilizó el equipo Protean con un voltaje de 200 V y una duración de 7 horas a 4°C.

3.5. TINCIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas después de la electroforesis se visualizaron 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.

3.5.1. Tinción de plata

Se hizo según una modificación del procedimiento descrito por Blum *et al.* (1987), que nos permite detectar concentraciones de proteína de 10-100 ng. El protocolo seguido fue el siguiente:

Fijación. El gel se sumergió, durante 30 minutos, con agitación en 100 ml de una solución de metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) y formaldeído 0.0185% (v/v). Es conveniente, en esta etapa, proteger el gel de la luz.

Lavados. Dos lavados, cada uno de ellos de 10 minutos, con 100 ml de etanol 50% (v/v).

Pretratamiento. Durante 1 minuto, con 100 ml de una solución de tiosulfato sódico 0.8 mM.

Lavados. Tres lavados de 20 segundos con agua destilada.

Impregnación con plata. Se mantuvo el gel, durante 10 minutos, en 100 ml de una solución de nitrato de plata 0.2% (p/v) y formaldeído 0.02775% (v/v).

Lavados. Dos nuevos lavados de 20 segundos con agua destilada.

Revelado. Se añadieron 100 ml de la solución de revelado, constituida por carbonato sódico 6% (p/v), formaldeído 0.0185% (v/v) y tiosulfato sódico 16 μ M. En el momento en que aparecieron las bandas de proteínas, se lavó el gel con agua destilada, e inmediatamente se añadió la solución de parada.

Parada. Adición inmediata de una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 12% (v/v). Se mantuvo el gel un mínimo de 5 minutos en la misma.

3.5.2. Tinción con Azul Coomassie

Con esta técnica se detectan concentraciones de proteína del orden de 0.1-1 μg . El gel fue sumergido en una solución de tinción compuesta por ácido acético glacial al 9.2% (v/v), metanol 45% (v/v) y Azul Coomassie R-250 al 0.25% (p/v) durante 15-30 minutos con agitación. La solución de tinción se eliminó entonces y se sustituyó por la decolorante que contenía ácido acético glacial al 15% (v/v) y metanol al 45% (v/v). Se dejó agitando de nuevo y se hicieron frecuentes cambios de solución para eliminar el colorante extraído (Garfin., 1990). Esto se hizo durante el tiempo necesario para que el fondo quedase claro y las bandas de proteínas patentes.

3.6. SECADO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Tras la tinción de los geles, éstos se secaron entre dos papeles de celofán, para su conservación. A tal fin, se lavaron con agua y se sumergieron en una solución de glicerol al 3% (v/v) y metanol 30% (v/v), durante 30 minutos, 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 iba sobre una bastidor y un marco de metacrilato. Se colocó encima de los geles 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 se sujetó un marco al otro con pinzas metálicas. Se dejó secar todo el sistema al aire.

3.7. SECUENCIACIÓN DE PROTEÍNAS

En aquellos casos donde fue necesario identificar inequívocamente una proteína se acudió a la secuenciación de las mismas. Dichos estudios fueron llevados a

cabo en el laboratorio de proteómica estructural. Instituto de Biomedicina , C.S.I.C., Valencia.

3.7.1. Digestión triptica y huella peptídica

Las banda de proteína escindida de un gel de poliacrilamida con SDS se degradaron con tripsina pancreática bovina (grado de secuenciación, Roche) en un digestor automático ProGest (Genomic Solutions). La mezcla de péptidos tripticos se dividió en dos alícuotas. Una de ellas, destinada a la obtención de la huella peptídica de la proteína nativa, se secó en un SpeedVac (Savant) y se disolvió en 5 μ l de una disolución acuosa de acetonitrilo al 50% y TFA al 0.1%. La otra alícuota se disolvió en 5 μ l de tampón Hepes 10 mM, pH 9.0, conteniendo DTT 50 mM, y se incubó a 65 °C durante 45 minutos. 0.85 μ l de cada una de las muestras se depositaron en una placa portamuestras, se dejaron secar a temperatura ambiente, y se les añadió 0.85 μ l de una disolución saturada de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en acetonitrilo al 50% y TFA al 0.1%. Tras dejar secar a temperatura ambiente, la composición ("huella") peptídica se determinó por espectrometría de masas con un espectrómetro de tiempo de vuelo Applied Biosystems Voyager-DE Pro utilizando las opciones de extracción retardada (delayed extraction) y modo reflectron. La asignación inicial de iones péptidicos a fragmentos de la proteína se realizó mediante el programa PAWS, que compara las masas experimentales con las masas de los péptidos tripticos teóricos.

3.7.2. Secuenciación de iones

La secuenciación de iones peptídicos se realizó utilizando un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal (QTrap, Applied Biosystems) dotado de un sistema de ionización por nanoelectrospray. Los iones monoisotópicos doble- o triplemente cargados seleccionados en el primer cuadrupolo (Q1) se

sometieron a fragmentación inducida por colisión con nitrógeno en Q2. La energía de colisión fue de 30-40 eV, el tiempo de llenado de la trampa iónica (Q3) fue de 250 ms, y la velocidad de barrido fue de 1000 amu/s. Los espectros de fragmentación fueron interpretados manualmente o utilizando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

3.8. CROMATOGRAFÍA ANALÍTICA DE FILTRACIÓN EN GEL

Se utilizaron dos columnas cromatográficas distintas, una de Superdex 75 HR y otra de Superdex 200 HR 10/30, integradas en un sistema FPLC de Amersham Biosciences. La calibración de la columna se realizó utilizando proteínas marcadoras estándar (Amersham Biosciences) de masa molecular y radio de Stokes conocidos: ferritina (450000 Da, 61 Å), catalasa (240000 Da, 52.2 Å), aldolasa (160000 Da, 48.1 Å), albúmina sérica bovina (66000 Da, 35.5 Å), ovoalbúmina (45000 Da, 30.5 Å), quimiotripsinógeno (25000 Da, 20.9 Å) y ribonucleasa (13.7 KDa, 16.4 Å).

4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. coli*

La metodología seguida consistió en la clonación de la secuencia codificante, de las proteínas maduras PrxII F, C59S, C84S y Trx O2 de guisante, en un vector de expresión y posterior expresión en *E. coli*.

Reactivos y soluciones utilizados:

E. coli BL21 (DE3).

Vector: cDNA de la PrxII F, C59S, C84S o de la Trx O2 (maduras) clonados en el vector de expresión pET3d.

Medio LB (ver apartado 5.1 de la sección de Materiales).

Medio LB-Agar (ver apartado **5.1** de la sección de Materiales).

Marcadores de selección: Ampicilina, (ver apartado **5.2** de la sección de Materiales).

IPTG (ver apartado **5.2** de la sección de materiales).

Tampón Tris HCl 50 mM (pH 7.5).

Se transformaron por choque térmico bacterias BL21 (DE3) las construcciones plasmídicas de los distintos insertos que codificaban para las proteínas maduras PrxII F, C59S, C84S y Trx O2 insertados en el vector pET3d. Se sembraron placas con LB-Agar suplementado con ampicilina para seleccionar los clones positivos y se dejaron incubando durante una noche a 37°C.

Una vez crecidas las colonias, la sobreexpresión de la PrxII F, sus variantes mutantes o Trx O2 se estudió empleando como medio de cultivo LB con ampicilina. Para ello se creció un preinóculo de células en medio LB con 0.1 mg/ml de ampicilina y a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0.6 y con él se inoculó un cultivo de mayor volumen. Este último se incubó a 37°C hasta que nuevamente alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0.6, momento en que se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, continuando el crecimiento durante 6 horas más. Las células se recogieron por centrifugación a 8000 xg, 15 minutos. El pellet celular se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Para resuspender las células después de su descongelación se utilizó Tris HCl 50 mM (pH 7.5). Los extractos crudos solubles se obtuvieron por rotura de las células con prensa French, pasándose dos veces a 60 MPa. El lisado se centrifugó durante 20 minutos a 15000 xg, a 4°C.

Los extractos se analizaron por electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida.

4.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El proceso de purificación de las proteínas recombinantes 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 la visualización y análisis del cromatograma.

Se controló el proceso de purificación por análisis electroforético y medida de actividad enzimática de las fracciones obtenidas de las columnas cromatográficas después de cada paso. Se empleó el método de Bradford para estimar el contenido proteico de cada etapa de la purificación

4.2.1. Purificación de la PrxII F y mutantes recombinantes

Reactivos y soluciones utilizados:

Sulfato amónico.

Cloruro sódico.

Tampón Tris HCl 25 mM (pH 8.0) (tampón A).

Precipitación con sulfato amónico.

Un ml de la proteína expresada se precipitó con sulfato amónico entre el 40% y el 95% de saturación y se resuspendió en 1 ml de tampón A. Posteriormente se dializó frente a este mismo tampón.

Cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-200).

La muestra dializada se inyectó a una columna de filtración en gel, Sephacryl S-200 (1.6 x 60 cm), equilibrada con tampón A que contenía 150 mM NaCl. Las

proteínas se eluyeron a un flujo de 1.3 ml/min y se recogieron fracciones de 2.5 ml. Para rastrear las enzimas se realizó análisis electroforético.

Cromatografía de intercambio iónico (Mono Q).

El pico que presentaba la mayor concentración de nuestra proteína se dializó frente a 2 litros de tampón A. La muestra dializada se inyectó a una columna Mono Q HR 5/5 que había sido equilibrada con tampón A, la columna se lavó con el mismo tampón a un flujo de 1 ml/min durante 50 ml y, seguidamente se aplicó un gradiente de NaCl de 0 a 1 M durante 40 ml, la elución se continuó con 10 ml con el mismo tampón con NaCl 1M. Se recogieron fracciones de 0.5 ml.

4.2.2. Purificación de la Trx O2 recombinante

Reactivos y soluciones utilizados:

Sulfato amónico.

Cloruro sódico.

Tampón Tris HCl 25 mM (pH 8.0) (tampón A).

Para la purificación de la Trx O2 recombinante de guisante se procedió en primer lugar a un calentamiento (80°C) durante 5 min. Las proteínas termolábiles precipitaron y se separaron de las proteínas en solución mediante centrifugación. La Trx O2 presente en la fase acuosa fue sometida a precipitación con sulfato amónico y cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-200) bajo las mismas condiciones en que fue purificada la PrxII F.

5. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

5.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES

Se prepararon anticuerpos frente a la PrxII F madura de guisante. Para ello se inyectaron a los conejos por vía intramuscular 1.25 mg de proteína recombinante purificada (ver apartado 4.2.1. de esta sección de Metodología), en cinco dosis de 250 µg cada vez, separadas por intervalos de 14 días. La proteína se homogeneizó con 1 ml de adyuvante completo de Freund en la primera dosis y de adyuvante incompleto en las cuatro restantes, usando un homogeneizador mecánico (Heidolph).

Las muestras controles de sangre se obtuvieron por extracción de la vena marginal de la oreja del conejo, realizándose una antes de empezar la inmunización (suero preinmune control) y otra antes de cada nueva inyección. En la quinta inoculación se consiguió el título adecuado, que fue determinado por ELISA. La sangría final se realizó por punción cardiaca. En todos los casos se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 5 horas, llevándose a 4°C durante toda la noche para la retracción del coágulo. Se centrifugó entonces a 3000 xg, durante 20 minutos y a 4°C, recogiendo el suero.

5.2. ELISA

Se llevó a cabo según Engwall (1980) y Hermoso *et al.* (1987) en placas microtiter de 96 pocillos de fondo plano (Dinatech Laboratories *Inc.*). Esta técnica se utilizó tanto para la determinación del título de anticuerpos del suero como para la búsqueda de la PrxII F y Trx O2 en matrices mitocondriales.

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón de fijación: Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM (pH 9.6), azida sódica al 0.02% (p/v).

Tampón PBST: PBS ($\text{H}_2\text{KPO}_4\text{-HNa}_2\text{PO}_4$ 20 mM (pH 7.4), NaCl 0.15 M), con Tween 20 al 0.05% (v/v).

Tampón PBSA: PBS con albúmina sérica bovina al 0.1% (p/v).

Tampón PBSTA: PBST con albúmina sérica bovina al 0.1% (p/v).

Solución sustrato: ortofenilén-diamina 0.04% (p/v) y H_2O_2 0.04% (v/v) en tampón citrato-fosfato 0.1 M (pH 5.0). Es de preparación extemporánea.

Solución de H_2SO_4 4N.

Anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la PrxII F de guisante.

Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma).

Se utilizó la técnica no competitiva, siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

Fijación. Se fijó el antígeno (proteína) sobre los pocillos, depositando en cada uno de ellos una solución de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antígeno en tampón de fijación y se incubó a 37°C durante 3 horas o bien toda la noche a 4°C .

Lavados. Se lavaron los pocillos tres veces con tampón PBST, utilizando 360 μL por pocillo cada vez, y dejando estar 3 minutos cada lavado.

Bloqueo. Los posibles enlaces inespecíficos se bloquearon agregando a cada pocillo 360 μL de PBSA y se dejó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Anticuerpo primario. Se eliminó el PBSA y se añadió a los pocillos 200 μL de diluciones seriadas 1/5 del suero en tampón PBSTA. Se incubó a 37°C durante 1 hora.

Lavados. Se realizaron una nueva serie de lavados como los descritos anteriormente.

Anticuerpo secundario. Se le añadió a cada pocillo 200 µL de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa frente a IgG de conejo diluido 1/10000 con tampón PBSTA, y se incubó a 37°C durante 1 hora.

Lavados. Se hizo como las veces anteriores.

Sustrato. Se le añadieron a cada pocillo 200 µL de la solución sustrato, preparada extemporáneamente, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Parada. Se detuvo la reacción por adición de 100 µL de H₂SO₄ 4N a cada pocillo.

Lectura. Se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas Titertek Multiscan II Plus.

5.3. WESTERN BLOT

El ensayo de *Western-blot* se emplea para detectar y cuantificar la cantidad de una proteína presente en una muestra. Para ello, las proteínas son sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida adicionado de SDS (SDS-PAGE) separándose en función de su tamaño y posteriormente son transferidas a una membrana. La detección de las proteínas en la membrana o filtro se realiza gracias a la unión específica de un anticuerpo frente a la proteína a estudiar. De forma similar al marcaje y detección de sondas de ácido nucleico, se puede marcar directamente el anticuerpo o detectarlo mediante la unión de una proteína ligante (o anticuerpo secundario) marcada a su vez, tanto empleando isótopos como técnicas no radiactivas.

5.3.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v).

Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), utilizando el sistema de transferencia Miniprotean System II (BioRad). La transferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia durante 1 hora, utilizando una corriente de 150V.

5.3.2. Hibridación y análisis de blots de proteínas

Reactivos y soluciones utilizados:

PBS: H₂KPO₄-HNa₂PO₄ 20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM.

Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS.

PBST: H₂KPO₄-HNa₂PO₄ 20 mM (pH 7.4), NaCl 15 mM, Tween 20 al 0.05% (v/v).

Anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la PrxII F o Trx 02 de guisante.

Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma).

Kit de de detección: “*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*” (PerkinElmer Lifesciences).

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se procedió al bloqueo de la misma durante 2 horas a temperatura ambiente o una noche a 4°C en solución de bloqueo. Tras este período de incubación, se añadió anticuerpo frente a la PrxII F o Trx 02 de guisante en una dilución 1:7500 en solución de bloqueo, y se incubó durante dos horas y media a temperatura ambiente o una noche a 4°C.

A continuación se lavó la membrana 3 veces en PBST durante 10 minutos cada vez y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG frente a conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1:10000 en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo la membrana 3 veces en PBST durante 10 minutos.

Por último se llevó a cabo la detección utilizando el kit de detección basado en una reacción de quimioluminiscencia.

5.4. INMUNOCITOQUÍMICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

5.4.1. Preparación del tejido

Reactivos y soluciones utilizados:

Fijador: glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón cacodilato sódico 0.05 M (pH 7.4).

Tampón cacodilato sódico 0.05 M (pH 7.4).

Soluciones de etanol de 30%, 50%, 70%, 90% y 100% (v/v).

Resina Unicryl.

Se cortaron secciones de 1 mm de la parte central de hojas jóvenes de guisante crecidas durante 14 días tras tres horas de iluminación.

Los cortes se fijaron con glutaraldehído al 2.5% (v/v) en tampón cacodilato sódico 0.05 M (pH 7.4) durante 2 horas a vacío, y posteriormente se realizaron tres lavados de 30 minutos con tampón cacodilato sódico 0.05 M (pH 7.4) a 4°C. Las muestras se deshidrataron por pasos sucesivos en soluciones crecientes de alcohol, entre el 30% y el 100% (v/v), y se incluyeron en Unicryl. Los cortes ultrafinos se obtuvieron con un ultramicrotomo y se recogieron en rejillas de níquel.

5.4.2. Inmunolocalización

Reactivos y soluciones utilizados:

PBS: H_2KPO_4 - HNa_2PO_4 20 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM.

Solución de bloqueo: albúmina sérica bovina al 5% (p/v) en PBS.

Acetato de uranilo al 0.1% (p/v).

Citrato de plomo al 2% (p/v).

Anticuerpo primario policlonal de conejo frente a la PrxII F de guisante.

Anticuerpo secundario: anti-IgG de conejo marcado con partículas de oro coloidal de 15 nm.

Los ensayos se realizaron por flotación de las rejillas sobre gotas de volumen adecuado de los reactivos en papel de 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 durante 1 hora. Posteriormente las rejillas se transfirieron a una solución de anticuerpo frente a la PrxII F de guisante en una dilución 1:150 en solución de bloqueo, y se incubó durante dos horas. Se lavaron a continuación las rejillas con PBS 5 veces, durante 5 minutos cada vez y se incubaron durante dos horas con anti-IgG marcada con oro coloidal diluida 1:10 en solución de bloqueo. Tras la incubación, las rejillas se lavaron de nuevo con PBS 6 veces durante 3 minutos cada vez, y después se lavaron con agua bidestilada dos veces, durante 3 minutos.

Las rejillas se secaron y finalmente las secciones se tiñeron con acetato de uranilo al 0.1% (p/v) en agua bidestilada durante 20 minutos, se lavaron con agua bidestilada, se secaron y, por último, se post-tiñeron con citrato de plomo al 2% (p/v) durante 1 minuto y se lavaron de nuevo con agua bidestilada.

Paralelamente se prepararon controles sustituyendo el primer anticuerpo por IgG preinmune a la misma concentración.

6. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

6.1. ENSAYO DE PROTECCIÓN DE DNA

La actividad antioxidante de la PrxII F recombinante de guisante y de los Mutantes C59S y C84S se determinó en un ensayo de protección de DNA frente al

daño producido por las especies de oxígeno reactivo producidas como consecuencia de la reducción de Fe (III) por DTT.

Reactivos y soluciones utilizados:

FeCl₃ 3.3 μM, es de preparación extemporánea.

DTT 10 mM, es de preparación extemporánea.

DNA plasmídico (PEYFP): 1μg

BSA, PrxII F, C59S o C84S recombinante de *P. sativum* (20μg).

Reactivos específicos para electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se incubó una mezcla compuesta por FeCl₃ 3.3 μM, DTT 10 mM, PrxII F, C59S, C84S, o albúmina (20 μM), en Tris-HCl 25 mM (pH 8) en un volumen final de 20 μl. La mezcla de reacción se incubó durante una hora y tras la adición del vector plasmídico PEYFP (CLONTECH) se incubó 9 horas más a 37°C. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio.

6.2. ACTIVIDAD PEROXIDASA DEPENDIENTE DE DTT

Este ensayo está basado en la capacidad que tienen las Prx de utilizar al DTT como donador de electrones y así poder reducir hidroperóxidos. Se llevó a cabo el ensayo como describe Thurman *et al.* (1972) con algunas modificaciones.

Reactivos y soluciones utilizados:

Tampón Tris HCl 250 mM (pH 8.0).

DTT 50 mM, es de preparación extemporánea.

Prx de *P. sativum* recombinante.

H₂O₂ 100 μM, es de preparación extemporánea.

Ácido tricloroacético al 10% (p/v).

Sulfato ferroso amónico 10 mM, es de preparación extemporánea.

Tiocianato potásico 2.5 M.

Con el fin de reducir los puentes disulfuros formados entre los residuos de cisteína catalíticos se inició el ensayo con una mezcla de preincubación que contenía en un volumen de 300 μL, 50 μM Tris HCl (pH 8.0), 4 mM DTT y diferentes concentraciones de las Prx recombinantes. Después de 10 minutos de preincubación a 37°C se añadieron 300 μL de H₂O₂ 100 μM y se incubó nuevamente 10 minutos a 37°C. La reacción se paró añadiendo 150 μL de una solución de ácido tricloroacético al 10% (p/v). El precipitado de proteína se eliminó mediante una breve centrifugación y se añadió a la mezcla de reacción 200 μL de sulfato ferroso amónico 10 mM y 100 μL 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. MICROCALORIMETRÍA

Isothermal titration Calorimetry (ITC) – Los análisis fueron llevados a cabo en un microcalorímetro VP-Microcalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) a la temperatura de 25°C. Las proteínas PrxII F, C59S, C84S fueron dializados frente a Tris-Cl 25 mM pH 7.5, 0.1 mM DTT.

Las concentraciones de proteínas fueron determinadas mediante ensayo de Bradford excepto para los sueros a los que no se les hizo la determinación del contenido proteico. Cada titulación consistió en un serie de inyecciones de 1.6 μl de PrxII F, C59S o C84S (a una concentración de 65 μM) en una disolución de 2 μM de Trx. Las medias de cambios de calor observado en la inyección de Prx al tampón fueron restadas de las titulaciones de Trx con Prx. El ajuste de los datos resultantes se hizo utilizando el modelo de “One binding site” de ORIGIN. De este ajuste se obtienen directamente los parámetros ΔH (cambio de entalpía) y K_A (constante de asociación, $K_A=1/K_D$). A partir de estos parámetros se calcularon los cambios de la energía libre de Gibbs (ΔG) y los cambios de entropía (ΔS) 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.

Los sueros pre y postinmune fueron dializados frente al tampón Tris-Cl 25 mM pH 7.5, 0.1 mM DTT, diluidos dos veces en el mismo tampón e introducidos en la célula del microcalorímetro. Ambas muestras fueron valoradas con inyecciones de 1.6 μl de Prx 183 μM . Considerando que aproximadamente un 2% de las proteínas de un suero se corresponden con los anticuerpos específicos para una determinada proteína, se estimó que la concentración de anticuerpos específicos para la Prx era de 10 μM . Debido a esta estimación los valores termodinámicos obtenidos han de ser considerados con cautela.

8. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS TIOL

La determinación de los grupos sulfhidrilo (-SH) de proteínas se determinó a fin de saber si los grupos tiol se encontraban expuestos al medio y para ello se acudió al conocido Test 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.

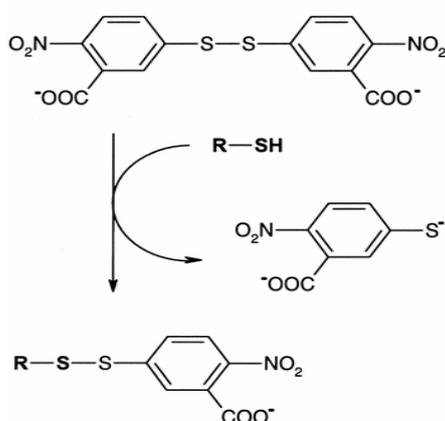


Figura 19. Reacción del DTNB con los grupos SH libres

Reactivos

DTNB

Tampón fosfato 100 mM pH 7.5

PrxII F o Mutatantes

Agua bidestilada

Se incubó la proteína en cuestión (PrxII F, C59S o C84S) a una concentración de 60 μ M con 2mM de DTNB en tampón fosfato 100 mM pH 7.5, en un volumen

final de 1 ml. Seguidamente se midió la absorbancia de la mezcla a 412 nm y el contenido total de grupos tiol libre se calculó asumiendo un coeficiente de extinción molar (ϵ) del TNB de $14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

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).

Reactivos

Ácido tricloroacético (TCA)

DTT reducido (disuelto en agua): 100 mM

DTT oxidado (disuelto en etanol): 100 mM

MOPS 500 mM pH 7

Proteína 100 μg

Monobromobimane (MBB) 250 mM en Acetonitrilo

Procedimiento:

Preparar 18 tubos a los que se agregan cantidades crecientes de DTT reducido sobre concentraciones decrecientes de DTT oxidado siguiendo un esquema de la tabla 6

Añadir a cada vial 100 μg de proteína (200 μl) y MOPS 100 mM (100 μl).

Incubar la mezcla 3 horas a temperatura ambiente.

Adicionar a cada vial 22 μl de MBB (10 mM).

Incubar 30 min en oscuridad y temperatura ambiente.

Añadir 500 μL de TCA al 20% a cada vial.

Incubar 30 min en hielo.
 Centrifugar 15 minutos a 4°C.
 Eliminar bien el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µL de TCA al 1%.
 Incubar 10 min en hielo.
 Centrifugar 15 min.
 Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 500 µL de TCA al 1%.
 Incubar 10 min en hielo.
 Centrifugar 15 min.
 Secar el pellet durante 5 min manteniendo los viales invertidos.
 Resuspender el pellet en 1 ml de Tris-Cl 100 mM pH 8, y SDS al 1%.
 Incubar 30 min.
 Medir en espectrofluorímetro: la excitación y absorción tuvieron lugar a 380 y 450 nm respectivamente.

Tabla 6. Gradiente de DTT oxidado /DTT reducido

DTT Ox (µl)	100	100	99	98	96	94	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5	2.5	0
DTT red (µl)	0	0	1	2	4	6	10	20	30	40	50	60	70	80	90	95	97.5	100

10. AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS

Para la purificación de mitocondrias se siguió el método descrito en LJS Methods, 21/02/00. El proceso se llevó a cabo en cámara fría y todos los materiales y reactivos usados se encontraban a la temperatura de 4°C

Reactivos

Tampón de extracción: manitol 0.3 M, TES-NaOH 50 mM (pH 7.5), BSA 0.5% (p/V) PVP-40 0.5%, EGTA 2mM y cisteína 20 mM (añadida extemporáneamente).

Tampón de gradiente 2x: manitol 0.6 M, TES 20 mM (pH 7.5) y BSA 0.2% (p/V).

Tampón de lavado: manitol 0.3 M y TES-NaOH 10 mM (pH 7.5).

Solución de percoll al 20%: tampón de gradiente 2x (15 ml), Percoll (6ml) agua (9 ml).

Solución de percoll al 28%: tampón de gradiente 2x (10 ml), Percoll (5.6 ml) agua (4.4 ml).

Solución de percoll al 50%: tampón de gradiente 2x (2.5 ml), Percoll (2.5 ml) agua (4.4 ml)

Se homogenizaron 100 g de hojas de guisante o de tubérculos de patata en 100 ml de tampón de extracción en una exprimidora. El estrujado se filtró a través de una membrana de miracloth. Dicho filtrado se centrifugó en tubos de 250 ml a 1500 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 18.000 xg otros 15 minutos. El pellet obtenido se resuspendió muy suavemente en 1 ml de tampón de lavado 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 40.000 xg durante 30 minutos. Tras la centrifugación podía verse un halo blanco en el fondo del gradiente de 28% de percoll correspondiente a las mitocondrias. Todo el volumen que descansaba sobre éstas fue eliminado mediante succión y las mitocondrias se tomaron suavemente con una pipeta de 5 ml a la que se le adaptó una punta cortada en su extremo a fin de hacer la zona de succión más ancha y evitar la rotura de las mitocondrias. Posteriormente éstas fueron transferidas a otro tubo limpio al que se añadieron 25 ml de tampón de lavado y la mezcla centrifugó a 18.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y las

mitocondrias se volvieron a lavar con otros 25 ml de tampón de lavado en las mismas condiciones. Finalmente las mitocondrias se resuspendieron en Tris-Cl 25 mM pH 7.

11. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA DEL TRIPTÓFANO

Cuando en las proteínas se producen cambios conformacionales, éstos pueden llegar a ser determinados mediante la observación de un cambio en la fluorescencia intrínseca de los grupos triptófano de dichas proteínas. Esta técnica pudo ser utilizada para la PrxII F y las proteínas mutantes C59S y C84S ya que poseen varios triptófanos en su secuencia aminoacídica.

Todas las muestras se dializaron frente al tampón Tris-Cl 25mM pH 8. Se trabajó a una concentración proteínica de 5µM disuelta en el mencionado tampón y se midió en un fluorímetro a 25°C. Las muestras fueron excitadas a 295 nm y la emisión de fluorescencia se recogió entre 300 y 400 nm. A los valores obtenidos se les resto la fluorescencia emitida por el propio tampón.

12. ENSAYOS *IN VIVO*

12.1. TRATAMIENTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Los tratamientos de estrés oxidativo se llevaron a cabo en los cultivos hidropónicos descritos en el apartado **1** de la sección de materiales. Los estreses se realizaron sobre plantas de diez días con diferentes agentes: NaCl (25 y 50 mM) y

Cd₂Cl (10µM) durante 10 días y sólo 12-24 horas para los tratamientos en frío a 4°C. Cada tratamiento realizado sobre cultivo hidropónico albergó dos controles, con y sin aireación. Las soluciones fueron renovadas cada dos días.

Se recogieron posteriormente muestras de hojas o raíces a distintos tiempos tras el tratamiento aplicado: 0, 6, 12, 24 y 48 horas. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

13. CRISTALIZACIÓN Y RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA PRXII F RECOMBINANTE

Los experimentos de cristalización se realizaron por el método de difusión de vapor en “gota colgante” (Chayen., 1998) a 293 K en placas de 24 pocillos DVX (Hampton Research). Se utilizaron para el “*screening*” los reactivos correspondientes al kit de Hampton Research 2-110 y se siguieron las instrucciones del fabricante.

La enzima utilizada en las pruebas de “*screening*” se encontraba purificada a homogeneidad a una concentración de 10 mg/ml en tampón Tris HCl 20 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM.

Los experimentos de cristalización se realizaron por el método de difusión de vapor en “gota colgante”. El método consiste en el establecimiento de un intercambio de masa en fase gaseosa entre un pequeño volumen en el que se encuentra contenida la proteína en presencia de un agente precipitante, y un gran volumen en el que se encuentra el agente precipitante a una concentración más elevada (normalmente es 2x). La gota que contiene a la proteína pierde paulatinamente volumen y se concentra a una velocidad suficientemente ralentizada como para entrar lentamente en la zona de nucleación del diagrama de fases, formar unos primeros núcleos de cristalización, y

finalmente hacerlos crecer desplazándose a lo largo de la línea de sobresaturación (Chayen., 1998, MacPherson., 1999) (figura 20).

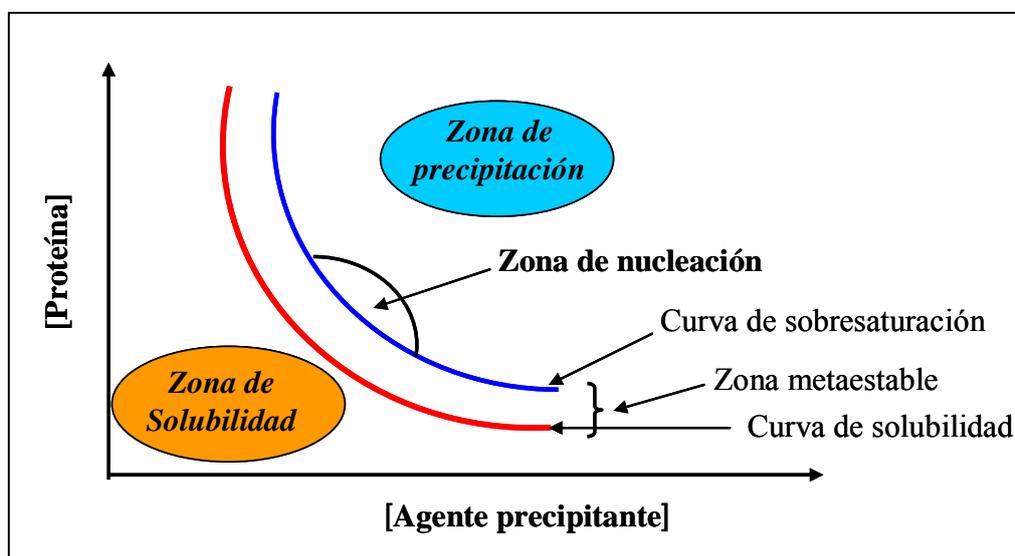


Figura 20. Diagrama de fases en el proceso de cristalización de proteínas.

Existen diferentes aproximaciones al problema de la búsqueda de condiciones de cristalización. Para el establecimiento de éstas en el caso de la PrxII F de *P. sativum* se utilizó el kit de Hampton Research 2-110, basado en un diseño de reactivos al azar que permite la exploración de 50 combinaciones diferentes de agentes precipitantes y aditivos a distintos valores de pH.

Los experimentos de “*screening*” se realizaron a una concentración de enzima de 10 mg/ml y a una temperatura de 20°C. Se utilizó un tampón de baja fuerza iónica (20 mM) debido a que uno de los parámetros a rastrear en la búsqueda de condiciones de cristalización es el pH, de ahí que sea importante que el pH del tampón de la proteína sea fácilmente desplazable por el de las condiciones del kit.

La recolección de los datos fue llevada a cabo a 100 K de un cristal crioprotectado mediante unos minutos de incubación en una solución que contenía 20% de glicerol (v/v), citrato 100 mM pH 5.6, 5 mM DTT, 20% (m/v) de PEG 2000 y 1% (v/v) de 2-propanol. Las imágenes obtenidas mediante la difracción por rayos X fueron grabadas en el detector Platinum 200 CCD montado en un goniómetro de 4 círculos Kappa con radiación Cu K α de un micro-focus Microstar generador de ánodo rotatorio (BrukerAXS) ubicado en los laboratorios de Estudios Cristalográficos de la unidad CSIC-Universidad de Granada. Los datos se procesaron con *SAINTE* y llevados a escala con *XPREP* (Broker, Madison, WI, USA). El reemplazamiento molecular fue llevado a cabo con *AMoRe* (Navaza, 1994) usando las coordenadas generadas por el servidor *EasyPred3D* web Server 1.0 (Lambert *et al.*, 2002) como modelo de búsqueda.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

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

Con estos cebadores se diseñó una primera reacción de PCR, utilizando como molde cDNA de hojas jóvenes de guisante, y se obtuvo una banda de unas 344 pb (figura 22.A) que se clonó en pGEM-T y se secuenció. Tanto la secuencia nucleotídica obtenida como la secuencia aminoacídica deducida se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos y se observó que presentaba una alta homología con la enzima PrxII F conocida (figura 22.B).

La secuencia obtenida nos sirvió para diseñar a partir de ella cebadores homólogos que permitieran dilucidar el resto de la secuencia. Así para obtener el extremo carboxilo se utilizó el cebador Prx C, correspondiente a la secuencia peptídica DLSAGLL, y un oligo dT. El extremo amino se obtuvo mediante 5'RACE usando como cebadores internos los cebadores Prx D y Prx E, correspondientes a las secuencias peptídicas TVNAWAEK y DKFKAKGV respectivamente. En las reacciones correspondientes al 5'RACE se obtuvo finalmente una banda de unas 700 pb (figura 23.A) y en la reacción de PCR para obtener el extremo carboxilo se obtuvieron dos bandas que diferían tan sólo en unas 93 pb, presentando unas 309 y 402 pb respectivamente (figura 23.B).

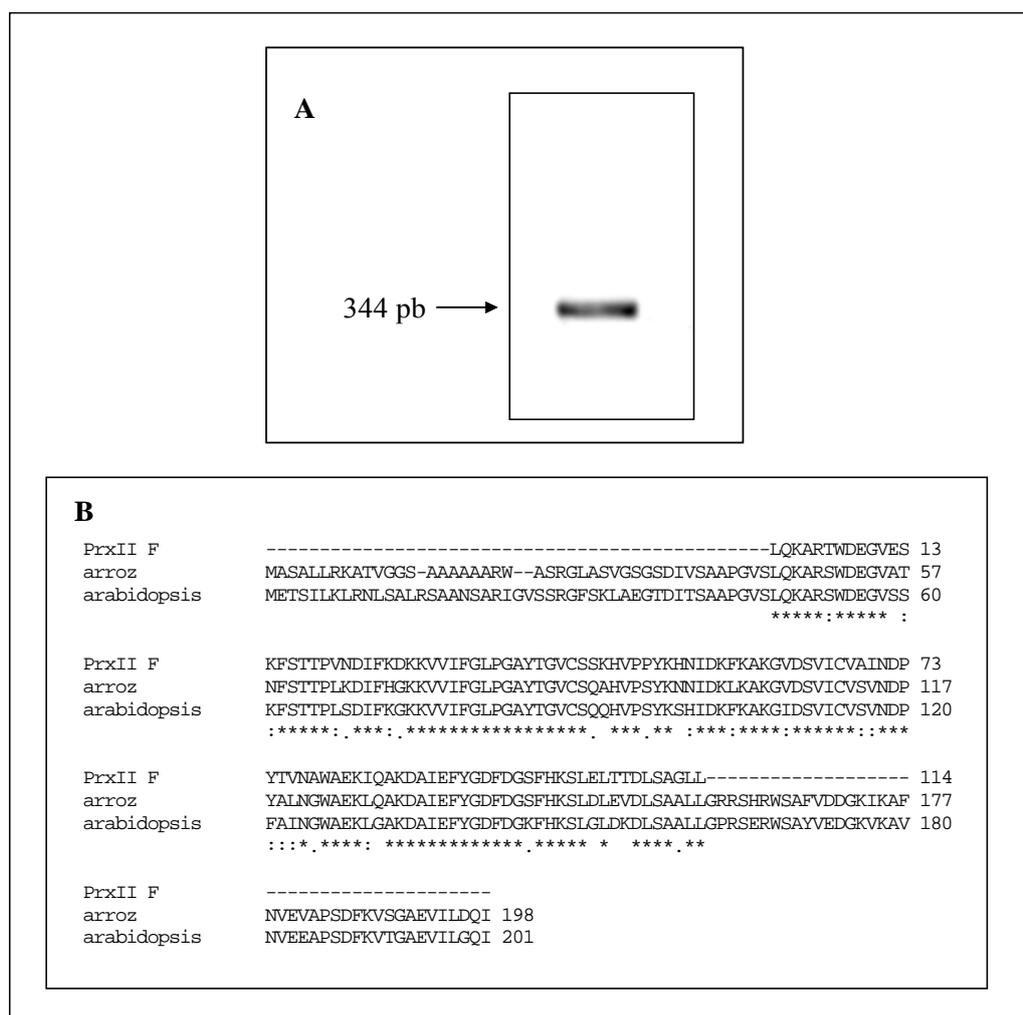


Figura 22. A. Producto obtenido mediante PCR de cDNA de hojas de guisante utilizando los cebadores Prx A y Prx B. **B.** Secuencia aminoacídica deducida del producto de la reacción de PCR y comparación con las secuencias correspondientes a otras PrxII F.

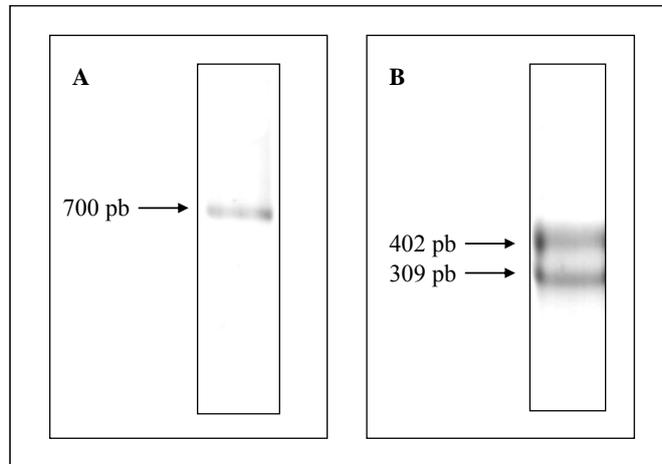


Figura 23. A. Producto obtenido en el 5'RACE. **B.** Productos obtenidos en la reacción de PCR de cDNA de hojas jóvenes de guisante utilizando los cebadores Prx C y el oligo dT.

Las bandas obtenidas en la reacción de PCR con el oligo dT diferían en tamaño y en la distinta posición en que se encontraba la cola de poliadenilación. Así la banda de mayor tamaño presentaba 93 pb más que la otra. En la figura 24 se muestra únicamente el alineamiento de extremo 3'UTR.

```

Corto  ACTTTCTGTTGATTTATAGGAATCTAACAAGTCTTCAATAAACTTGTCTTCATCAATGAC 60
Largo  ACTTTCTGTTGATTTATAGGAATCTAACAAGTCTTCAATAAACTTGCCTTCATCAATGAC 60
*****

Corto  AAGTGTTTAATAAAAACAAAACATATATGGAAGTAGAAAAAGCAGCAGAAAATTACCTTC 120
Largo  AAGTGTTTAATAAAAACAAAACATATATGGAAGTAGAAAAAGCAGCAGAAAATTACCTTC 120
*****

Corto  AAGGTGGATACCAAGTTTGCTCTAA-----
Largo  AAGGTGGATACCAAGTTTGCTCTAATACCATTTCAGATATCTTTTCTTTCCAATTGAGAT 180
*****

Corto  -----
Largo  TATGCTCTTGAAGTTACTGTATCTGTTATTGCAAATGCATCTTATTGAAGTGTGTTTGA 240

Corto  AAAAAAAAAAAAAAAAAA 164
Largo  AAAAAAAAAAAAAAAAAA 257
*****

```

Figura 24. Comparación de las secuencias de los dos extremos 3'UTR denominados “corto” y “largo” obtenidas para la PrxII F mediante PCR de cDNA de hojas de guisante usando los cebadores Prx C y dT.

Tal y como se refleja en la figura 25, la región aminoacídica codificante de ambos fragmentos (corto y largo) presentaba gran homología con otras PrxII F.

```

PrxII F          DLSAGLLGIRSERWSAYVVDGKVKALNVEESPVDKVSQAETILGQI
arabidopsis     DLSAALLGPRSERWSAYVEDGKVKAVNVEEAPSDFKVTGAEVILGQI
arroz           DLSAALLGRRSHRWSAFVDDGKI KAFNVEVAPSDFKVSGAEVILDQI
                ****.* **.***.*: * **.*: **.* **.*: **.*: **.* **.*

```

Figura 25. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del extremo carboxilo terminal deducida de los productos obtenidos en la reacción de PCR de cDNA de hojas de guisante utilizando los cebadores Prx C y oligo dT con otras PrxII F de vegetales.

La secuencia de DNA obtenida del 5'RACE presentaba un codón de iniciación a partir del cual se codificaba una secuencia aminoacídica con baja homología respecto a las enzimas PrxII F conocidas (figura 26).

PrxII F	MATSVINRLRSSSTTKSLSSVLHGIRSYAKVATGTDILSAASNVS LQKARTWD	53
arroz	MASALLRKATVGGSA AAAAARWAS-RGLASVSGSDI VSAAPGVSLQKARSWD	52
maiz	MAATLARRA---GRSAATTLWGAA-RGFASVG--SDIVSAAPGVSLQKARSWD	47
arabidopsis	MSILKLRNLSALRSAANSARIGVSSRGFSKLAEGTDITSAAAPGVSLQKARSWD	53
	*: . . : : . * . : . . : ** ** . ***** : **	

Figura 26. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida del producto de 5'RACE (Amino) con otras PrxII F de vegetales conocidas.

2. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO DE LA PRXII F DE *P. sativum*

Para conocer la región promotora de la PrxII F se acudió a la técnica de PCR Walking que nos permite “caminar” sobre el DNA genómico (gDNA) sin necesidad de utilizar un segundo oligonucleótido específico. Diseñamos dos parejas de oligos homólogos, y reversos. Las dos reacciones consecutivas de dicha técnica consiguieron reamplificar varios fragmentos. En la figura 27 pueden verse las bandas de PCR obtenidas según el banco de gDNA digerido que se usó como molde. Todos los bancos de gDNA usados dieron al menos un producto de PCR excepto el gDNA que fue digerido con la enzima Pvu II donde no apareció ninguna banda.

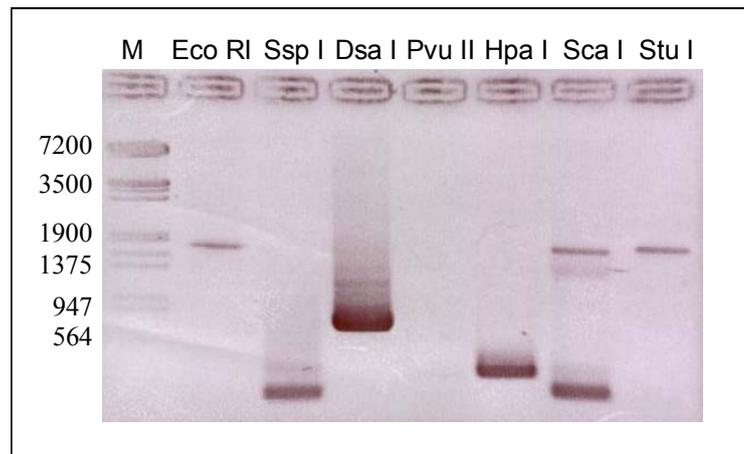


Figura 27. Resultado del PCR-Walking. En la primera calle se sitúa el marcador de peso molecular (M) y en las siguientes las bandas que aparecieron en cada PCR-Walking según el banco de DNA digerido que se usó.

Cada una de las bandas que apareció fue cortada del gel, purificada con kit, clonada en pGEM-T y secuenciada. Los alineamientos de las secuencias revelaron cómo el gDNA contenido en las bandas de bajo peso se encontraba también formando parte del gDNA de las bandas de mayor tamaño por lo que se aseguraba una especificidad a la hora de seleccionar la región promotora.

Mediante esta técnica se pudo llegar a conocer una región promotora de 1755 pb aguas arriba del codón de inicio de la transcripción “ATG”. La figura 28 muestra la secuencia genómica del promotor de la PrxII F.

```

CGCCCGGGGAGGTTTCGTTGACTTATATTTGCATATTTTGATTATCTTTAGTCTCAATATTGCCTAGCCT
TCACGAGTGTTCACAAATTAATAGATGACTAGAGATAGTGTGGAAATGAATGTTGGACTCACAAAACACA
TAAACGAAATTAACAACATAGTTAGAAGAAACAATTGCATATTGTAGATCAACCATGGCAGCTTCGGGG
GTGGACGAAAGATTTTCATCTCGAAGGTGTAGGAGCAGCTACATGGAATAGAGGTGCATCCACCATTGT
CAAGTTTGAGATATGCAGAAATCCCTTTACAACTTGTCTTTCTTAATGGTGGTTGCTCCGATGGCGGT
CGAAAAACAGAAAGGGAGGCTTTACGACTGTTCTGTTGGAGAAGGAGAATGTCCGGTGAGAGACTTAG
TTATGGTAAGGACGTGAGAACGAAGATATATGAAAGGAAAAATGTCTCAAAAGAGGGGGAGATGACCAC
CATAAAGGTGGAAGGAGAGGGTCACCATGGAGGTGGGTGGAACCACCACACCCTAGAGGGTTAGGGGGG
ATTTTTTAGAGAGAAAGGGAAGCATCTCTCTAGAAATTTTTAATCCATGTCTATGTCTATGATCATTAAT
GATTATTAATTACAACAAAAATAAGGCAAAGTACACAAAAAGAAAAATATCACATATAACATAGAGGGTA
GAAATTCACAACACAAGTTAGACTTTCCCATCTTCTTATGGGTTTTACTTCGGTTGATCTATTTTTGTTT
TTTTCTTCTTGGGTCGTGACTAACCCTAATTATACATTTTTTATAAGTAGCATTATTTCATTTTAAATA
AATTAATTAATTTTTCAAGTAAAAATAACTATCTTCTTTTACAATAGATGTCATGTTTTTTTATCTT
AAATTATTTGTCCCTTTAAAATAGCAATGTGATCTTTATTTATTTCTTCCATTAATTTATCTCTATTTAT
TGTATTTTAATTTATTTAACTACTTTCATATCTATTTAACAATAGTTATTTTGGTATTCTCTCTGACCA
AATTAAGTGTGCAATTGTAAGAAAAATATCTCAAAACAATGTGCTTTTAGTTTCCAATGCAATTT
AAATCTTGATCTTCCAATTATATCTTTAATTAATACTCCTAATTTACTATTTCTCTCACTTTGCATTA
TGATGATTTGAATACACCAATAACCAATTAGAATAGTTTGAAAATTATATTCTTCTTTTACTTATAAT
ATTTTTTAATATATGTGAAAGTTTCAAGTATGACTATTATTTTAGTTTAGAATGAAAAGAGTAAATAAC
ACTTATTTTATTATTGAAATCAACAGAATTAGTCATTATATAATAAATCTGAAAATAATATTTATTGTT
AGATGGAGGAGTGTAAAGTTAACTTACAAAGAGTTGCATAATTTGTTTTGTGAGATGAGGAGTCTTAAG
TTAACTTACAAAGAGTTGCATAATTTACCATAAATAATTTGTGCGATGATAAAATATTTAATCAGAAAA
ATATGTAATAGTAATAAACAGAGCCCTTCAATATTTATTACAAATAATTGTCCTTCATAATCTAACGCTAT
TATTATATTCTCATTAATCTCCGTGCTCCACGAGCAGTAACAACAATAATTAACAAAACAGAACCGA
ATGTTTTGGAATGTAACAGATCTGGTCTGATCCATCACATCACACAATCACCACAACCTCTGCGAATTTA
CCGAT
    
```

Figura 28. Secuencia promotora de 1755 pb de la PrxII F dilucidada mediante el alineamiento de los distintos fragmentos obtenidos por PCR-Walking.

La presencia y localización de secuencias intrónicas se llevó a cabo mediante PCR de gDNA de hojas de guisante con la pareja de cebadores 1-Prx-F y 2-Prx-R tal y como se describe en el apartado **1.6.11** de la sección de metodología. El fragmento de DNA obtenido, de 1435 pb fue clonado en pGEM-T y secuenciado.

La figura 29 muestra la secuencia nucleotídica de gDNA de la PrxII F de guisante de la región codificante compuesta de exones e intrones.

```

ATGGCAACCTCTGTAATCAACCGACTTCGTTCTTCCTCAACCACAAAATCACTGTC TTCGTTCTTCATG
GAATCAGGTCTTACGCAAAGGTTGCAACTGGAAC TGATATACTCTCTGCTGCATCCAATGTTTCTCTACA
GAAAGCTCGCACTTGGGATGAAGGTGTTGAATCCA AATTCTCCACTACCCCTGTCAACGACATCTTCAAG
GTTCTCTCTACCATTTTTCTTCCAATTTCAATACCCTTTTGTTCATCACTAATGGGTGTTTTTTTT
CTTTGATTTGATGTTGCAGGATAAAAAAGTTGTGATCTTTGGTCTCCAGTAAGTTAACTTGACAATTTT
TTTATAACATAGTAATTTTTAATGTAGTGGTTTTTATTTATGTTTTGGTTGTTTTTAGGGTG CATATA
CAGGAGTTTGTTC AAGCAAACATGTTCCCTCCTTATAAGCATAAATTTGACAAGTTTAAAGCTAAAGGGGT
TGATTCGTATTATTGTGTGGCTATTAATGATCCATA TACTGTGAATGCTTGGGCTGAGAAGATTCAAGCC
AAAGATGCTGTGAGTGTTTTTCTCATGCTTCTTCTCTCTAT TATTAATGGCTTTATATGCTTTGTGAT
TGGTCTCTTATCTTGTAGTAGAACCAAATTGTTCA GTTTCTGTTCCATATTTCTAGCATCACAAACA
TAGGATTAGGATCATTTCAAAGTGAACGCGTTTCCA ATTGAGTTGGGGATGTTCTTGTGCTGCATTGT
CATTTTGTAGTGCTAGTCACTGACTCATGAGTTTGTAG ATGATAATGCAGCAAAGTAATACACTCTTTTA
AACATATTCAGCACTCTTCTTTTACTACCTTAATAGAA GAATTTTCAGTGTATGTAAGATTGTGAGTCA
CCGCGTAGGATCGAGCCATCTCACGTTTCAA AACTACTCTTCCGTGTGACGATGTGATGTTTCTTTTCAA
AGGGAAGTGAATTGAGTGATTCTGTTTCTTTTCTTTTCTTTTCCAGATTGAGTTCATATGGGGACTTTGAT
GGGAGCTTTCACAAAAGCTTGAATTA ACTACTGATCTCTCTGCTGGTTTGTGTTGGAATTCGATCGGAAA
GGTATGTTATATACCCTCCTTGAAC TAAGATCAAGCTCATTGACACAAACATTTGTTTTGAGGTTTGAAT
GACTTCGCTTTAAAAAGAAGTAAAGTAGTGAAGGAATCACTAACAGTTAATGGTTAGAACACAAAACAT
GTGTTTTATCTTTCAATATAGTGAATTCAGATTTC AATTCTCATAAGAGTAACTGTTGTTTGGTGTAGA
TGGTCAGCATATGTGGTAGATGGAAAAGTGAAGGC TTTAATGTTGAAGAATCTCCATCTGATGTCAAAG
TTTCTGGAGCAGAGACCATTTTGGGACAAATTTGA

```

Figura 29. Secuencia genómica de la PrxII F. En rojo se marcan las regiones intrónicas y en azul los exones.

3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA PRXII F DE *P. sativum*

La secuencia de cDNA obtenida (figura 30) posee 764 u 857 pb según se considere una u otra cola de poliadenilación. La secuencia aminoacídica deducida origina una proteína de 199 aminoácidos con una masa molecular de 21476.3 Da y un punto isoelectrico de 8.43. El codón de iniciación se encuentra en la posición 1 y el codón de parada en la posición 600. Existen dos mRNA distintos con señales de poliadenilación típicas en las posiciones 838 y 743 respectivamente.

En otras PrxII F vegetales descritas se ha visto que pese a tener una localización mitocondrial, son de codificación nuclear por lo que en su extremo amino terminal llevan un péptido señal característico de proteínas que son importadas y

procesadas en la mitocondria. En este sentido se utilizaron los programas MITOPROT y PSORT para predecir si la proteína es o no mitocondrial y cuál es el péptido señal. El resultado concluyó en que se trata de una proteína inmadura; el programa MITOPROT dio una probabilidad de 0.86, con un péptido señal de 28 aminoácidos que posteriormente se escindiría en la membrana mitocondrial dando lugar a una proteína madura de 172 aminoácidos, 18753 Da y un punto isoeléctrico de 5.92, la cual es similar en tamaño a otras PrxII F conocidas. Efectivamente este péptido señal presenta todas las características típicas de los péptidos señales mitocondriales: de 20 a 50 residuos, argininas y lisinas por un lado y aminoácidos hidrofóbicos por otro.

La secuencia aminoacídica de la proteína inmadura (figura 30) muestra también las dos cisteínas conservadas correspondientes a las posiciones 87 y 112 de la proteína inmadura o 59 y 84 de la proteína madura; asimismo presenta las secuencias peptídicas conservadas alrededor de estas dos cisteínas: DSVIC y KKVIVIFGLPGAYTGVC.

El análisis comparativo de la PrxII F de *P. sativum* (PsPrxII F) con otras PrxII F análogas encontradas en las bases de datos indica la conservación de ciertos residuos aminoacídicos tal y como se observa en la figura 31.

Si se alinea la secuencia de la PrxII F de guisante con Prx tipo II de distinto origen se observa una conservación aminoacídica mucho menor, si bien siguen existiendo dominios conservados y otros con gran homología (figura 32). Las cisteínas catalítica y resolutora se encuentran conservadas en todos los casos.

1	ATG GCA ACC TCT GTA ATC AAC CGA CTT CGT TCT TCC TCA ACC ACA AAA TCA CTG TCT TCC
1	<u>M A T S V I N R L R S S S T T K S L S S</u>
61	GTT CTT CAT GGA ATC AGG TCT TAC GCA AAG GTT GCA ACT GGA ACT GAT ATA CTC TCT GCT
21	<u>V L H G I R S Y A K V A T G T D I L S A</u>
121	GCA TCC AAT GTT TCT CTA CAG AAA GCT CGC ACT TGG GAT GAA GGT GTT GAA TCC AAA TTC
41	<u>A S N V S L Q K A R T W D E G V E S K F</u>
181	TCC ACT ACC CCT GTC AAC GAC ATC TTC AAG GAT AAA AAA GTT GTG ATC TTT GGT CTC CCA
61	<u>S T T P V N D I F K D K K V V I F G L P</u>
241	GGT GCA TAT ACA GGA GTT TGT TCA AGC AAA CAT GTT CCT CCT TAT AAG CAT AAT ATT GAC
81	<u>G A Y T G V C S S K H V P P Y K H N I D</u>
301	AAG TTT AAA GCT AAA GGG GTT GAT TCT GTT ATT TGT GTG GCT AIT AAT GAT CCA TAT ACT
101	<u>K F K A K G V D S V I C V A I N D P Y T</u>
361	GTG AAT GCT TGG GCT GAG AAG ATT CAA GCC AAA GAT GCT AIT GAG TTC TAT GGG GAC TTT
121	<u>V N A W A E K I Q A K D A I E F Y G D F</u>
421	GAT GGG AGC TTT CAC AAA AGC TTG GAA TTA ACT ACT GAT CTC TCT GCT GGT TTG CTT GGA
141	<u>D G S F H K S L E L T T D L S A G L L G</u>
481	ATT CGA TCG GAA AGA TGG TCA GCA TAT GTG GTA GAT GGA AAA GTG AAG GCT CTT AAT GTT
161	<u>I R S E R W S A Y V V D G K V K A L N V</u>
541	GAA GAA TCT CCA TCT GAT GTC AAA GTT TCT GGA GCA GAG ACC AIT TTG GGA CAA AIT TGA
181	<u>E E S P S D V K V S G A E T I L G Q I STOP</u>
601	ACTTTCTGTTGATTTATAGGAATCTAACAAGTCTTCAATAAACTTGCCTTCATCAATGACAAGTGTTTAATAAAACAAAA
682	ACATATATGGAAGTACGAAAAAGCAGCAGAAAAATTACCTTCAAGGTGGATACCAAGTTTIGCTCTAA*TACCAITTCAGATA
761	TCTTTTCTTTTCCAATTGAGATTATGCTCTTGAAGTTACTGTATCTGTTATTGCAAAATGCATCTTATTGAAGTGTTTTGAA
840	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 30. Secuencia cDNA-aminoacídica que codifica la PrxII F de guisante. El péptido señal mitocondrial se encuentra subrayado. En rojo se representan los aminoácidos y en negro las bases nucleotídicas. El asterisco azul (*) indica la señal de poliadenilación encontrada en el producto de menor tamaño en la reacción de PCR realizada con los cebadores Prx C y oligo dT. También en azul se representa la secuencia de poliadenilación encontrada en el producto de mayor tamaño obtenido en la reacción de PCR anteriormente indicada. La numeración corresponde a la proteína inmadura.

Resultados

PsPrxIIF	-MATSVINRLRSSSTTKSLSSVLHGI--RSYAKVATGTDILSAASNVSLOKARTWDEGVE	57
LePrxIIF	-----L--LSYASISVGS DVTVAAPNVSLQKARSWDEGVS	33
TaPrxIIF	-----ATRA---GGSPAAALWAAA--RGFASVG--SDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVA	46
HvPrxIIF	--MASALARRA---GGSPAAALWAAA--RGFASVG--SDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVA	51
OsPrxIIF	METASALLRKATVGGSAAAAAARWAS--RGLASVSGSDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVA	58
AtPrxIIF	-MAMSILKLRNLSALRSAANSARIGVSSRGGFSLAEGTDITSAAPGVSLQKARSWDEGVS	59
BnPrxIIF	-MAMSILKLRNSPALRSAANSARIGVLSRAFSKLSSEGTDITSAAPGVSLQKARSWDEGVS	59
PpPrxIIF	-MAAFMVRQRGQGLWKNAMAMGQQYMLRQMGSAAKIDLES---DVALQEARTWDEGVS	56
PsPrxIIF	SKFSTTPVNDIFKDKKVVIFGLPGAYTGVCSKSHVPPYKHNIDKFKAKGVDSVICVAVND	117
LePrxIIF	SKFSTTPIKDIFKGNVVIIFGLPGAYTGVCSMQHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVND	93
TaPrxIIF	TKFSTTPPKDIFHGKVVIFGLPGAYTGVCSQSHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVND	106
HvPrxIIF	TKFSTTPPKDIFHGKVVIFGLPGAYTGVCSQSHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVND	111
OsPrxIIF	TNFSTTPPKDIFHGKVVIFGLPGAYTGVCSQAHVPSYKNNIDKFKAKGVDSVICVAVND	118
AtPrxIIF	SKFSTTPLSDFKGNVVIIFGLPGAYTGVCSQSHVPSYKSHIDKFKAKGIDSVICVAVND	119
BnPrxIIF	SKFSTTPSLDGFKGNVVIIFGLPGAYTGVCSQSHVPSYKSHMDKFKAKGIDSVICVAVND	119
PpPrxIIF	TKFSTTPVSEIFKGNVVIIFGLPGAYTGVCSQSHVPSFLNNSDKLKSAGIDSVICVAVND	116
PsPrxIIF	PYTVNAWAEKIQAKDAIEFYGDFDGSFHKSLDLTDLTDLAAGLLGIRSERWSAYVVDGKVK	177
LePrxIIF	PYTMNGWAEKIQAKDAIEFYGDFDGSFHKSLDLTDLTDLAAGLLGIRSHRWSAYVVDGNV	153
TaPrxIIF	PYVLNGWAEKIQAKDAIEFYGDLGDSFHKSLDLTDLTDLAAGLLGRRSHRWSAFVDDGK	166
HvPrxIIF	PYVLNGWAEKIQAKDAIEFYGDLGDSFHKSLDLTDLTDLAAGLLGRRSHRWSAFVDDGK	171
OsPrxIIF	PYALNGWAEKIQAKDAIEFYGDFDGSFHKSLDLTDLTDLAAGLLGRRSHRWSAFVDDGK	178
AtPrxIIF	PFAINGWAEKIQAKDAIEFYGDFDGFHKSLGLDKDLAAGLLGPRSERWSAYVEDGKVK	179
BnPrxIIF	PYTINGWAEKIQAKDAIEFYGDFDGFHKSLGLDKDLAAGLLGPR-----	164
PpPrxIIF	PYTMNAWAEKIQAKDKIKFYGDFDGGK-NKSLGLDLTDLAAGLLGPRSQRYAAVVDGKIK	175
PsPrxIIF	LNVEEAPSDVKVSGAETILGQI	199
LePrxIIF	LNVEEAPSDF-----	163
TaPrxIIF	FNV-----	169
HvPrxIIF	LNVEKAPSDFKVSGAEVILD--	191
OsPrxIIF	FNVEVAPSDFKVSGAEVILDQI	200
AtPrxIIF	VNVEEAPSDFKVTGAEVILGQI	201
BnPrxIIF	-----	
PpPrxIIF	LNVEENPSDFKVS DAETLLKGL	197

Figura 31. Alineamiento de la PsPrxIIF de guisante (AJ717306) con otras proteínas homólogas de la base de datos: LePrxIIF = *Lycopersicon esculentum* (AW442184); TaPrxIIF = *Triticum aestivum* (BE518244); HvPrxIIF = *Hordeum vulgare* (BU999799); OsPrxIIF = *Oryza sativa* (NP_912904); AtPrxIIF = *Arabidopsis thaliana* (At3g06050); BnPrxIIF = *Brassica napus* (CD820382); PpPrxIIF = *Physcomitrella patens* (BJ164411). Con letra roja y subrayado amarillo se encuentran las cisteínas características de las Prx de tipo II. El subrayado en gris representa otros restos aminoacídicos conservados.

PsprxIIF	-----MATSVINRLRSSSTTKSLSSVLHGI--R	26
LePrxIIF	-----L--L	2
TaPrxIIF	-----ATRA--GGSPAALWAAA--R	17
HvPrxIIF	-----MASALARRA--GGSPAALWAAA--R	22
OsPrxIIF	-----METASALLRKATVGGSAAAAAARWAS--R	27
AtPrxIIF	-----MAMSILKLRNLSALRSAANSARIGVSSR	28
BnPrxIIF	-----MAMSILKLRNSPALRSAASSARIGVLSR	28
PpPrxIIF	-----MAAFMVRQRGQGLWKNAMAMGQQYMLR	28
AtPrxIIB	-----	
AtPrxIIE	MATSLSVSRFMSSSATVISVAKPLLSPTVSFTAPLSFTRSLAPNLSLKFRNRRRNSASAT	60
Hsprxd5	--MGLAGVLCALRRSAGYILVGG-----AGGQSAAAAARRCSEGEWASGGV	43
PsprxIIF	SYAKVATGTDILSAASNVSLOKARTWDEGVESKFSTTPVNDIFKDKKVVIFGLPGAYTGV	86
LePrxIIF	SYASISVGSVDVTAAPNVSLQKARSWDEGVSSKFSTTPIKDIFKGNVVFGLPGAYTGV	62
TaPrxIIF	GFASVG--SDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVATKFSSTPLKDFHGGKVVIFGLPGAYTGV	75
HvPrxIIF	GFASVG--SDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVATKFSSTPLKDFHGGKVVIFGLPGAYTGV	80
OsPrxIIF	GLASVSGSDIVSAAPGVSLQKARSWDEGVATNFSTTPKDFHGGKVVIFGLPGAYTGV	87
AtPrxIIF	GFASKLAEGTDITSAAPGVSLQKARSWDEGVSSKFSTTPLSDFKGNVVFGLPGAYTGV	88
BnPrxIIF	AFSKLSEGTDITSAAPGVSLQKARSWDEGVSSKFSTTPLSDFGFKGNVVFGLPGAYTGV	88
PpPrxIIF	QMGSAKKIDLES---DVALQEARTWDEGVSTKFSSTTPVSEIFKGNVVFGLPGAYTGV	85
AtPrxIIB	-----MAPIAVGDVVPDGTISFFDEND-QLQTASVHSLAAGKVVIFGVPGAFTPT	50
AtPrxIIE	TRSFATTPVTASISVGDKLPDSTLSYLDPSTGDVKTVTVSSLTAGKKTILFAVPGAFTPT	120
Hsprxd5	RSFSRAAAAMAPIKVGDAIPAVEVEFEGEPGN---KVNLAELFKGKGVLFGVPGAFTPG	99
PsprxIIF	CSSKHVPPYKHNIDKFKAKGVDSVICVAINDPYTVNAEKIQAQDAIEFYGDFDGSFHK	146
LePrxIIF	CSMQHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVNDPYTMNGWAEKLQAKDAIEFYGDFDGSFHK	122
TaPrxIIF	CSQSHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVNDPYVLNGWAEKLQAKDAIEFYGDLDGSFHK	135
HvPrxIIF	CSQSHVPSYKNNIDKFKAKGIDSVICVAVNDPYVLNGWAEKLQAKDAIEFYGDLDGSFHK	140
OsPrxIIF	CSQAHVPSYKNNIDKFKAKGVDSVICVAVNDPYALNGWAEKLQAKDAIEFYGDFDGSFHK	147
AtPrxIIF	CSQQHVPSYKSHIDKFKAKGIDSVICVAVNDPFAINGWAEKLQAKDAIEFYGDFDGSFHK	148
BnPrxIIF	CSQQHVPSYKSHMDKFKAKGIDSVICVAVNDPYTINGWAEKIGAKDAIEFYGDFDGSFHK	148
PpPrxIIF	CSQKHVPSFLNNSDKLKSAGIDSVICVAVNDPYTMNAWAEKLQAKDKIKFYGDFDGSFHK	144
AtPrxIIB	CSMKHVPGFIEKAEELKSKGVDEIICVAVNDPFFVMKAWGKTYPENKHKVAVDGSSEYTH	110
AtPrxIIE	CSQKHVPGFVSKAGELRSKIDVIACISVNDAFVMEAWRKDLGINDEVMLLSDGNGETG	180
Hsprxd5	CSKTHLPGFVEQAEALKAGVQVVALSVNDAFVTGEWGRAHKAEGKVRLLADPTGAFGK	159
PsprxIIF	SLDLTIDLDSAG--LLGRRSERWSAYVVDGKVKALNVEESPVDKVGSAETILGQI	199
LePrxIIF	SLDLTIDLDSAG--LLGRRSHRWSAYVVDGNVKNLVEEAPSDF-----	163
TaPrxIIF	SLDLEIDLDSAG--LLGRRSHRWSAFVDDGKIKAFNV-----	169
HvPrxIIF	SLDLIDLDSAG--LLGRRSHRWSAFVDDGKIKALNVEKAPSDFKVSGAEVILD--	191
OsPrxIIF	SLDLEVDLSAG--LLGRRSHRWSAFVDDGKIKAFNVVAPSDFKVSGAEVILDQI	200
AtPrxIIF	SLGLDKDLDSAG--LLGPRSERWSAYVEDGKVKAVNVEEAPSDFKVTGAEVILGQI	201
BnPrxIIF	SLGLDKDLDSAG--LLGPR-----	164
PpPrxIIF	SLGLDLDLDSAG--LLGPRSQRYAAVVEDGKIKQLNVEENPSDFKVDATLLKGL	197
AtPrxIIB	LLGLELDLKD--GLGVRSRRFALLDLKVTVANVESSGGE-FTVSSADDILKAL	162
AtPrxIIE	KLGVLDLDRKPVGLGVRSRRYAILADDGVVKNLVEEGGA-FTNSSAEDMLKAL	234
Hsprxd5	ETDLLLDDSLVSIIFGNRLKRFMSVVQDGIKALNVEPDGTGLTCSLAPNIIISQL	214

Figura 32. Alineamiento de la PsPrxIIF de guisante (AJ717306) con otras Prx tipo II encontradas en la base de datos: LePrxIIF = *Lycopersicon esculentum* (AW442184); TaPrxIIF = *Triticum aestivum* (BE518244); HvPrxIIF = *Hordeum vulgare* (BU999799); OsPrxIIF = *Oryza sativa* (NP_912904); AtPrxIIF = *Arabidopsis thaliana* (At3g06050); BnPrxIIF = *Brassica napus* (CD820382); PpPrxIIF = *Physcomitrella patens* (BJ164411); AtPrxIIB = *Arabidopsis thaliana* (At1g65980); AtPrxIIE = *Arabidopsis thaliana* (At3g52960); Hsprxd5 = *Homo sapiens* (P30044). Con letra roja y subrayado amarillo se encuentran las cisteínas características de las Prx de tipo II. El subrayado en gris representa otros restos aminoacídicos conservados.

El estudio de la región promotora de 1755 pb muestra la carencia de regiones reguladoras “TATA” La comparación entre los promotores de la PrxII F de guisante y de *A. thaliana* mostró una baja homología entre ellos.

El análisis genómico por PCR condujo a un fragmento de DNA de unas 1435 pb formado por cinco exones y cuatro intrones intercalados, situándose en las posiciones “1-211, 301-330, 412-569, 1027-1119, 1328-1435” los exones y “212-300, 331-411, 570-1026, 1120-1327” los intrones (figura 82 del apartado 2 de la sección de Discusión).

4. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MUTANTES C59S Y C84S

La PCR es una técnica que se caracteriza por su versatilidad. Una de sus utilidades puede ser 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.

Para un mejor entendimiento del papel que juegan cada una de las cisteínas catalíticas de la PrxII F se decidió hacer proteínas mutantes recombinantes de ésta. A una de ellas se le mutó la cisteína catalítica peroxidática 59 a serina (C59S) mientras que en la segunda se cambió la cisteína resolutora 84 también a serina (C84S). En la figura se muestra un esquema general de la sistemática de la PCR solapante.

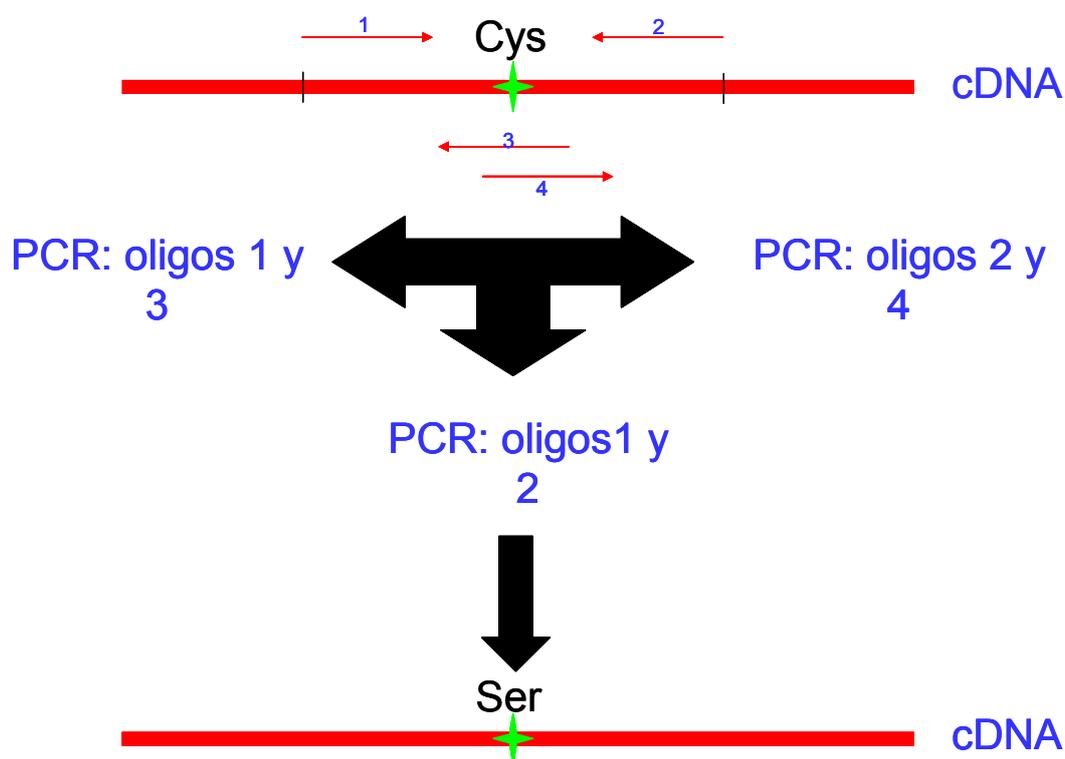


Figura 33. Esquema de obtención de mutantes mediante PCR solapante.

5. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA LA TRX MITOCONDRIAL DE *P.sativum*

Para el aislamiento del cDNA que codifica la Trx O2 de guisante se optó por seguir el mismo planteamiento con el que se dilucidó la PrxII F mediante PCR. Para ello se realizó un alineamiento previo de la estructura primaria de la enzima Trx O2 mitocondrial de *arabidopsis* con otras secuencias parecidas de la base de datos (números de acceso AF396650 y At2g35010) y se seleccionaron, para diseñar dos cebadores heterólogos que permitieran obtener parte de la secuencia, dos zonas correspondientes a motivos peptídicos altamente conservados en estas enzimas (figura

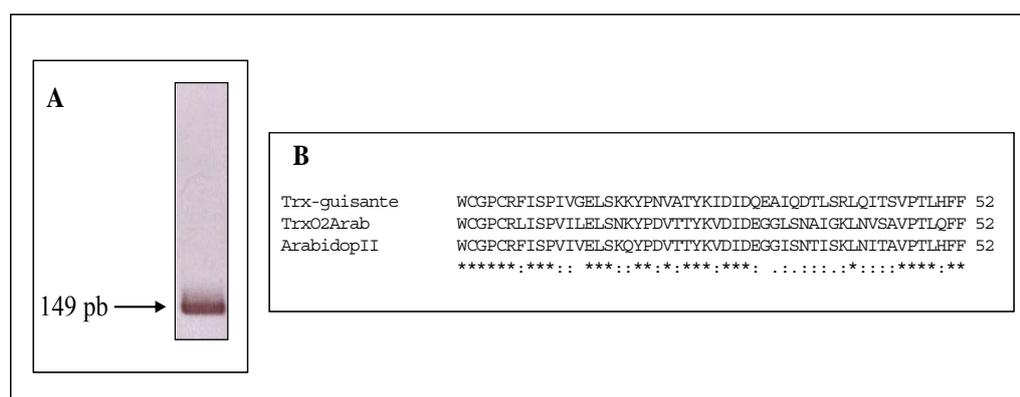


Figura 35. A. Producto obtenido mediante PCR de cDNA de hojas de guisante utilizando los cebadores Trx A y Trx B. **B.** Secuencia aminoacídica deducida del producto de la reacción de PCR indicado en la figura (Trx-guisante) y comparación con las secuencias correspondientes a otras Trx mitocondriales.

La secuencia obtenida nos sirvió para diseñar a partir de ella cebadores homólogos que permitieran obtener el resto de la secuencia. Así, para dilucidar el extremo carboxilo se utilizó el cebador Trx C, correspondiente a la secuencia peptídica SVPTLHFF, y un oligo dT. En la reacción de PCR se obtuvo una banda de unos 150 pb (figura 36.A) que sirvió para comparar la región Carboxilo-terminal de la Trx O2 de guisante con las secuencias de *Arabidopsis* (figura 36.B).

El extremo amino se estudió mediante 5'RACE usando los cebadores internos Trx D y Trx E, correspondientes a las secuencias peptídicas TLSRLQI y WCGPCR respectivamente. Se obtuvo finalmente una banda de unas 420 pb (figura 37.A) que presentaba un codón de iniciación a partir del cual se codificaba una secuencia aminoacídica con baja homología respecto a la enzima Trx O2 conocida (figura 37.B).

6. ANÁLISIS DE LA SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DEDUCIDA DE LA TRX O2 DE *P. sativum*

La secuencia de cDNA obtenida (figura 38) posee 546 pb. La secuencia aminoacídica deducida origina una proteína de 181 aminoácidos con una masa molecular de 21476.3 Da y un punto isoelectrico de 8.43. El codón de iniciación se encuentra en la posición 1 y el codón de parada en la posición 543-546. En este caso se desconoce el extremo UTR 3' de la enzima.

En otras Trx se conocen localizaciones subcelulares en citosol, cloroplastos y mitocondrias. A fin de determinar si la secuencia dilucidada codifica una proteína inmadura con un péptido de tránsito se utilizaron los programas bioinformáticos de predicción subcelular MITOPROT y PSORT. El resultado concluyó en que se trata de una proteína inmadura; el programa MITOPROT dio una probabilidad de 0.99, con un péptido señal de 70 aminoácidos por cuya escisión en la membrana mitocondrial daría lugar a una proteína madura de 111 aminoácidos, 12613.5 Da y un punto isoelectrico de 6.33, la cual es similar en tamaño a otras Trx conocidas. Efectivamente este péptido señal presenta todas las características típicas de los péptidos señales mitocondriales: argininas y lisinas por un lado y aminoácidos hidrofóbicos por otro.

La secuencia de cDNA-aminoacídica (figura 38) muestra también las dos cisteínas típicas de las Trx en las posiciones 33 y 36 (numeración correspondiente a la proteína madura).

El análisis comparativo de la Trx O2 de guisante madura con su homóloga en *Arabidopsis* refleja una alta conservación de ciertos residuos aminoacídicos tal y como se observa en la figura 39.

1	ATG	GTT	GGA	ACC	AGA	AAT	TTG	ATC	GTT	CGA	TCT	TTG	GCA	CTT	CGT	CAT	GCA	ATC	AAG	AAC
1	<u>M</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>N</u>
61	ACT	GTT	CGT	CCT	CTC	TTA	ACC	AAC	ACC	AAC	CTT	CAT	TCA	CGA	ATT	TCC	AAA	TCG	TCT	CTC
21	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>L</u>
121	TTC	GCC	GCC	ACA	CTC	GCC	TCT	TCC	TCC	TAC	TCC	TCT	CAC	CTC	TCC	CTC	CAC	CAT	TCC	CGT
41	<u>F</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>H</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>R</u>
181	TCC	CTT	TCC	TCC	GCC	TCA	GCT	TCT	CCT	GGG	CTT	ATC	CTT	GTT	AAT	TCT	GCG	GAA	GAG	TTC
61	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>G</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>F</u>
241	AAT	AAA	ATC	CTT	ACC	AAA	ATT	CAA	GAT	GAC	TCG	TTG	CAC	GCG	ATC	TTC	TAT	TTT	ACT	GCT
81	<u>N</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>D</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>F</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>A</u>
301	GTT	TGG	TGT	GGA	CCT	TGC	AGG	TTC	ATT	TCT	CCT	ATA	GTT	GGG	GAG	CTC	AGT	AAG	AAG	TAT
101	<u>V</u>	<u>W</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>G</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>
361	CCT	AAT	GTG	GCA	ACT	TAT	AAG	ATT	GAC	ATT	GAT	CAG	GAA	GCA	ATT	CAG	GAC	ACA	TTG	AGC
121	<u>P</u>	<u>N</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	<u>K</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>Q</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>Q</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>S</u>
421	AGG	TTG	CAG	ATT	ACA	TCT	GTG	CCA	ACA	CTG	CAT	TTC	TTT	CAA	AAT	GGG	AAA	AAG	ACC	GAT
141	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>Q</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>L</u>	<u>H</u>	<u>F</u>	<u>F</u>	<u>Q</u>	<u>N</u>	<u>G</u>	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>T</u>	<u>D</u>
481	GAA	CTT	ATA	GGT	GCT	GAT	GTT	GCG	CGA	TTG	AAT	CAT	ATT	ACG	GAG	AAA	CTC	TTC	AAG	AAG
161	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>H</u>	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>E</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>K</u>
541	GAC	TAA																		
181	<u>D</u>	<u>STOP</u>																		

Figura 38. Secuencia del cDNA que codifica la Trx O2 de guisante. El péptido señal mitocondrial se encuentra subrayado. En rojo se representan los aminoácidos y en negro las bases nucleotídicas. La numeración corresponde a la proteína inmadura.

Trxguisante	-LILVNSAEFEFNKILTKIQDDSLHAI FYFTAVWCGPCRFISPIVGE LSKKYPNVATYKIDI 60
TrxO2Arab	-FVVLKSEAEFNSALSKARDGSLPSVFYFTAAWCGPCRLISPVILELSNKYPDVTTYKVDI 60
Trxguisante	DQEAIQDTLSRLQITSVPTLHFFQNGKKTDELIGADVARLNHITEKLFKFD 111
TrxO2Arab	DEGGLSNAIGKLNVSAPVTLQFFKGGVKKAEIVGVDVVRLKSVMEQLYK-- 109

Figura 39. Alineamiento de la Trx O2 de guisante madura (AM235208) con la Trx O2 mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (AF396650). Con letra roja y subrayado amarillo se encuentran las cisteínas catalíticas de las Trx. El subrayado en gris representa otros restos aminoacídicos conservados.

7. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PRXII F, PROTEÍNAS MUTANTES Y TRX O2 DE GUISANTE

7.1 CLONADO DEL GEN DE LA PRXII F, MUTANTES Y TRX O2 EN EL VECTOR pET-3d Y SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El sistema de expresión pET está basado en la transcripción de genes por parte de la enzima T7-RNA polimerasa (Studier and Moffatt, 1986). La secuencia correspondiente al gen que codifica la proteína de interés se clona a continuación de la secuencia promotora de la enzima T7-RNA polimerasa y la construcción se transforma 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*, pero es 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. Se alcanzan de esta forma unos elevados niveles de expresión de proteína recombinante.

Para el clonado del gen de la PrxII F, C59S, C84S o Trx O2 madura en el vector pET-3d, la secuencia codificante de la proteína madura, sin el péptido señal mitocondrial, se amplificó en una reacción de PCR con las parejas de oligonucleótidos 1-Prx-F / 2-Prx-R para la PrxII F y proteínas mutantes y 1-Trx-F / 2-Trx-R para la Trx O2, insertando los sitios de restricción *Nco* I y *Bam* HI en los extremos 5' y 3' respectivamente. Posteriormente se clonó en el vector pET-3d y la identidad de la construcción resultante, plásmido pET-PrxII F, pET-C59S, pET-C84S o pET-Trx. (figura 40) se corroboró por medio de secuenciación.

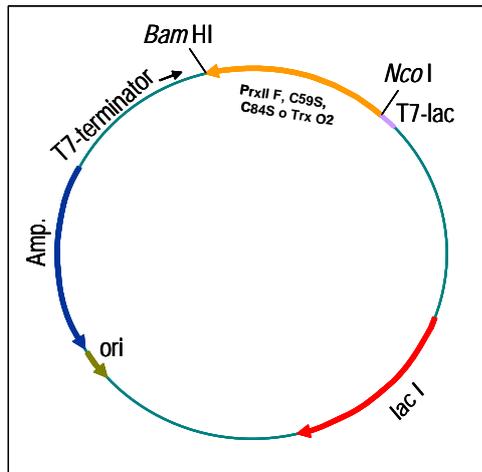


Figura 40. Plásmido pET-prx. (T7-lac): secuencia promotora de la enzima T7-RNA polimerasa unida a la secuencia reguladora *lac*. (*lac I*): gen de la proteína inhibidora *lac*. (*ori*): origen de replicación del plásmido. (*Amp.*): gen de resistencia a ampicilina.

Cada una de las construcciones anteriores se transformó en células de *E.coli* de la cepa BL21 (DE3), las cuales contienen el gen que codifica la T7-RNA polimerasa. Como ventaja adicional, estas células están modificadas en genes que codifican proteasas y peptidasas de *E.coli*, de forma que permiten la sobreexpresión de proteínas recombinantes.

La expresión de las proteínas recombinante se estudió a 37°C con y sin IPTG. Los extractos crudos solubles de las células inducidas mostraron una buena sobreexpresión tras 6 horas de inducción con IPTG. Tal y como se observa en la figura 40, la Trx O2 aparecía a un tamaño aproximado de 12 kDa (41.A) mientras que la PrxII F lo hacía a una altura algo mayor de la que le correspondería por su tamaño molecular (41.B). La expresión de las proteínas mutantes manifestó un comportamiento similar al de la PrxII F.

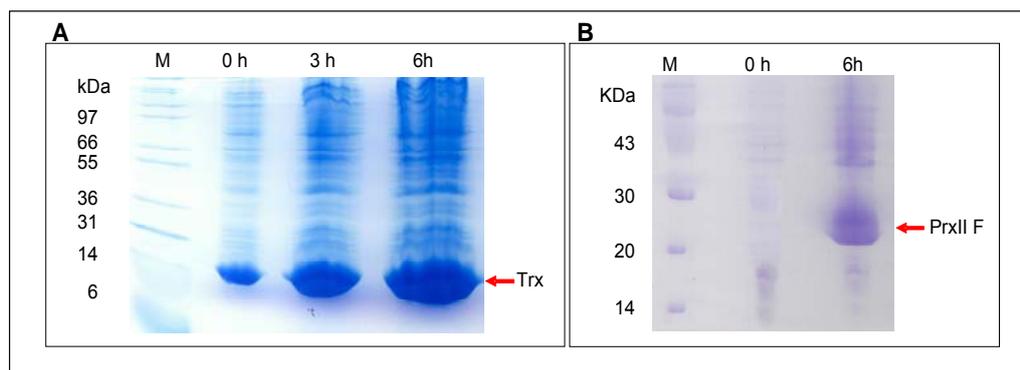


Figura 41. Expresión de las proteínas recombinantes de guisante Trx O2 (A) y PrxII F (B) de guisante en el sistema de expresión pET. Se indica en cada calle el tiempo transcurrido (horas) tras la inducción con IPTG. (M): marcador de peso molecular.

7.2 DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE LA PRXII F, C59S, C84S Y TRX O2 RECOMBINANTES MADURAS

Los altos niveles de expresión alcanzados con el sistema pET permitieron el desarrollo de un protocolo de purificación simplificado en dos pasos cromatográficos para la PrxII F o mutantes y de sólo uno para la Trx O2.

7.2.1. Purificación de las proteínas PrxII F, C59S y C84S

El primer paso consiste en una cromatografía de filtración en gel, en una columna de Sephacryl S-200 que permite la separación de macromoléculas con un tamaño molecular comprendido entre 5 y 250 kDa. La elución en este tipo de cromatografía se basa en la distinta movilidad que presentan las moléculas según su tamaño, así las moléculas más grandes se mueven más rápidamente eluyendo primero mientras que las más pequeñas se retardan, eluyendo, por tanto, posteriormente. En la figura 42 se puede observar el cromatograma obtenido en este paso.

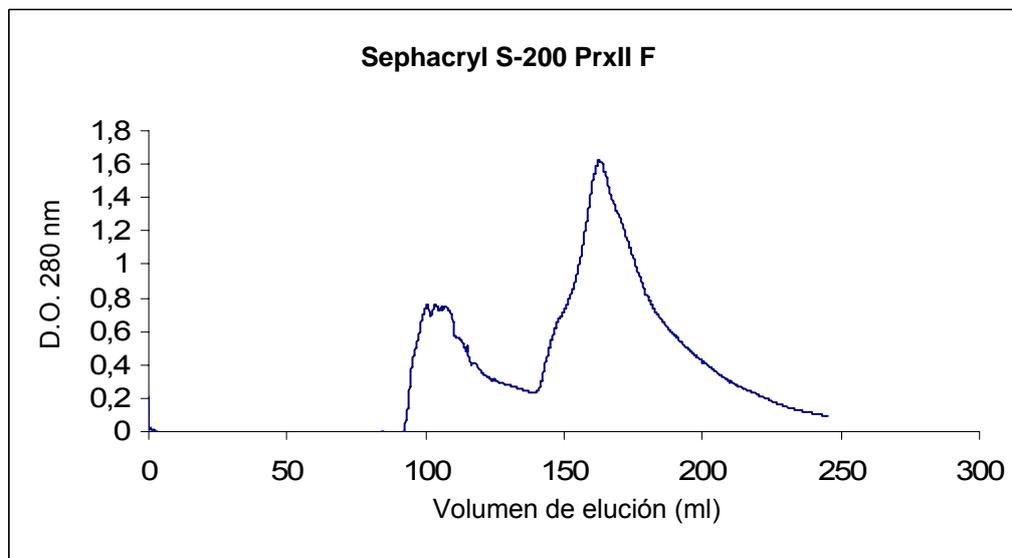


Figura 42. Cromatograma obtenido en el paso de purificación para PrxII F por Sephacryl S-200.

Tanto la PrxII F como las proteínas mutantes eluían en el segundo pico tal y como se pudo observar en las tinciones de plata hechas a cada fraccionado. Se reunieron las fracciones donde la enzima estaba presente, se dializaron frente a fosfato potásico 50 mM pH 8.0 para eliminar el NaCl que contenían y se concentraron diez veces con carboximetilcelulosa de alta viscosidad. Posteriormente se les añadió sulfato amónico hasta una concentración final de 1M para realizar un segundo paso cromatográfico consistente en una cromatografía hidrofóbica en una columna Fenil-Superosa. Las proteínas en este caso interactúan con la matriz mediante fuerzas de tipo hidrofóbico que se ven incrementadas con la fuerza iónica por lo que su elución se realiza mediante disminución de la fuerza iónica por lo que su elución se realiza mediante disminución de la fuerza iónica. En este punto, la PrxII F interactuó con la columna fuertemente la elución sólo fue posible con el uso de un tampón que contenía urea 6 M.

Al no poder eluir la PrxII F en condiciones no desnaturizantes se optó por una cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q. Para ello las fracciones de Superdex 200 que contenían la enzima se dializaron frente a Tris-HCl 25 mM pH 8.0 para eliminar el NaCl y se concentraron diez veces con carboximetil celulosa de alta viscosidad. El punto isoeléctrico teórico de la enzima madura es de aproximadamente 6 por lo que la enzima queda retenida en la columna al pH en el que se desarrolla el proceso. La elución en esta segunda cromatografía se lleva a cabo con el aumento de fuerza iónica por medio de cloruro sódico. La enzima eluye a una concentración de 0.2 M de NaCl (figura 43).

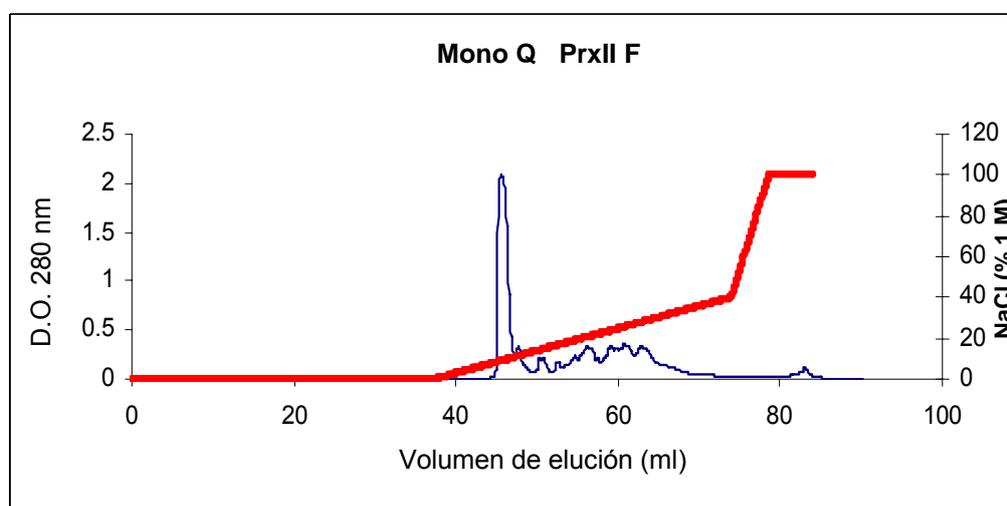


Figura 43. Cromatograma obtenido en el paso de purificación para PrxII F, C59S o C84S por Mono Q.

La pureza de la PrxII F en cada paso se analizó por electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes y en presencia de DTT (figura 44). El protocolo desarrollado permite obtener una proteína con un alto grado de pureza y homogeneidad. El proceso de purificación de las proteínas mutantes se desarrolló de forma similar a la PrxII F.

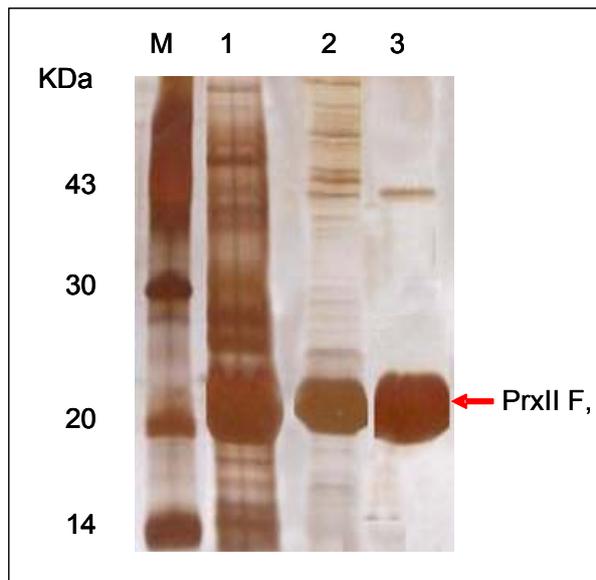


Figura 44. Purificación de la PrxII F recombinante de *P. sativum*. (M): Marcador de peso molecular. (1): Extracto crudo soluble de las células BL21 (DE3) transformadas con la construcción pET-PrxII F e inducidas según las condiciones descritas en el texto. (2): Fracciones obtenidas de la cromatografía de Sephacryl S-200. (3): Fracciones obtenidas de la cromatografía en Mono Q.

7.2.2. Purificación de la Trx O2

Algunas Trx pueden aguantar temperaturas de hasta 80 grados sin desnaturalizarse. Aprovechando esta característica para su purificación, el lisado bacteriano fue calentado a 80°C durante diez minutos. Tras ser centrifugado, el sobrenadante fue fraccionado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre el 40 y 85% de saturación. Posteriormente el pellet fue resuspendido en Tris-HCl 25 mM pH 8.0, 150 mM de NaCl y cromatografiado en un sistema FPLC con una columna Sephacryl S-200 de filtración molecular (Figura 45). La presencia de Trx en el fraccionado se siguió mediante SDS/PAGE electroforesis.

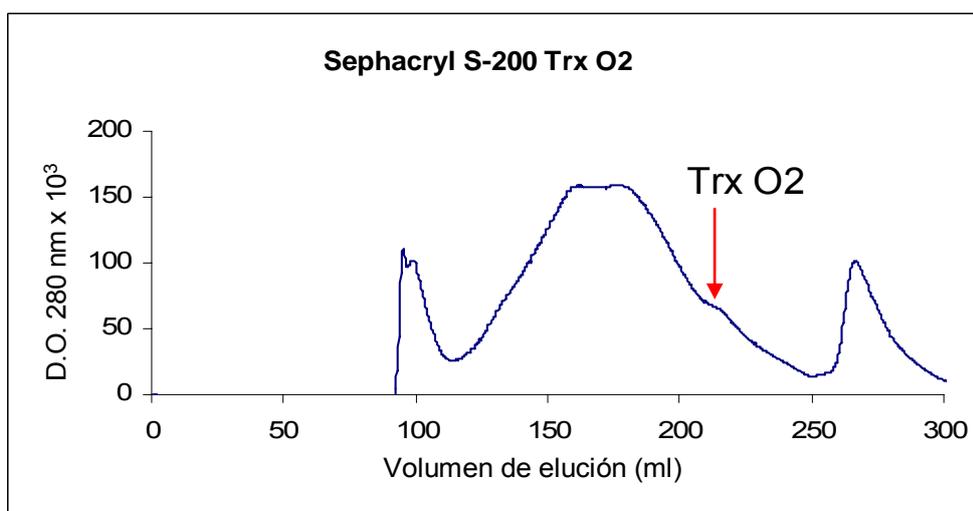


Figura 45. Cromatograma obtenido en el paso de purificación de la Trx O2 por Sephacryl S-200.

Los fraccionados que contenían la Trx fueron reunidos, dializados frente a Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y concentrados unas diez veces con carboximetilcelulosa de alta viscosidad.

En la figura 46 se presentan los estados de pureza en cada uno de las etapas del proceso de purificación anteriormente detallados.

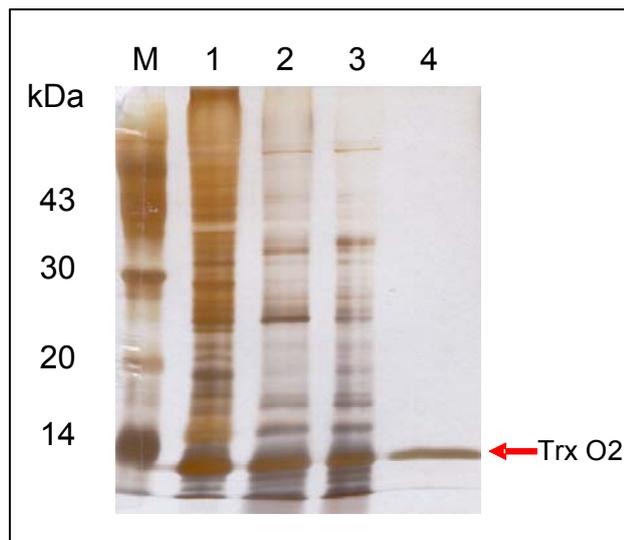


Figura 46. Purificación de la Trx O2. (M): marcador de peso molecular; (1): lisado bacteriano; (2): sobrenadante de la Trx O2 tras calentamiento cinco minutos a ochenta grados; (3) Trx O2 tras la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (4): Trx O2 tras su purificación por Sephacryl S-200.

8. DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR DE LA PRXII F Y TRX O2 DE *P. sativum* MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL

La masa molecular teórico para la PrxII F madura, calculado a partir de la secuencia aminoacídica de la enzima, es de unos 18.5 kDa, algo menor que el observado en SDS-PAGE. Hasta ahora nunca se han descrito los monómeros de Prx en solución ya que siempre se encuentran formando homodímeros, bien por puentes inter o intra moleculares. Sin embargo, en electroforesis SDS-PAGE pueden observarse las formas de monómero y dímero según se traten con o sin DTT respectivamente.

En las Prx tipo II no se conocían estados de oligomerización en solución por encima de la unidad dimérica, pero como en las Prx de 2 Cys de plantas hay descritos dímeros y oligómeros (Bernier-Villamor *et al.*, 2004) se pensó en llevar a cabo el estudio de los posibles estados oligoméricos en la PrxII F. Todos los ensayos de oligomerización y determinación de tamaños moleculares mediante filtración molecular se hicieron con las columnas Superdex S-200 HR y Superdex 75 HR 10/30 acopladas al sistema de FPLC. Estas columnas permiten la separación de macromoléculas con un tamaño comprendido entre 10-600 y 3-70 kDa respectivamente.

El comportamiento de las proteínas PrxII F, C59S y C84S fue heterogéneo pese a que las expectativas hacían pensar en que todas ellas se presentarían en el estado dimérico. Sorprendentemente, el paso de la PrxII F por la columna Superdex HR-200 reveló la presencia de dos picos bien definidos, uno a 12.97 ml y otro a 15.32 ml (figura 47), que como se verá a continuación se corresponden a las formas hexamérica y dimérica de la enzima respectivamente.

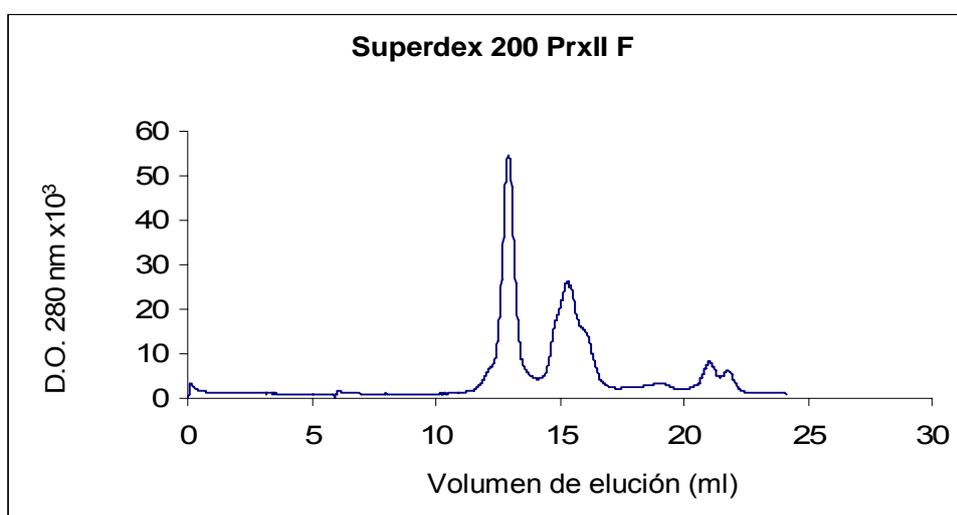


Figura 47. Cromatograma obtenido en el procesamiento de la PrxII F en Superdex 200-HR

El mutante C84S ofreció un cromatograma muy similar al de la PrxII F, con los dos picos característicos a los mismos volúmenes de elución (figura 48).

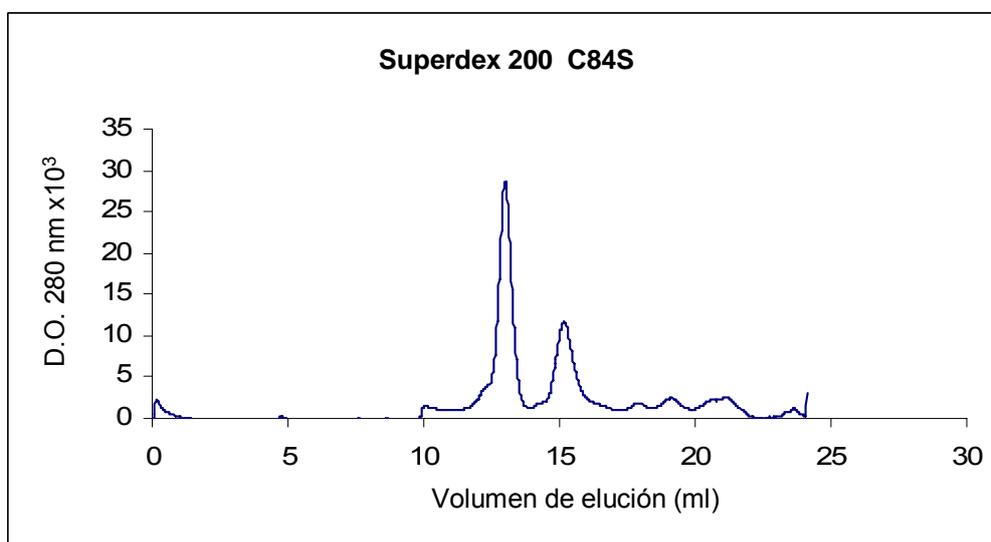


Figura 48. Cromatograma obtenido en el procesamiento del mutante C84S en superdex 200-HR.

El mutante C59S ofreció un cromatograma con un solo pico, el correspondiente al volumen de 15.32 ml (figura 49).

En el caso de la Trx O2, ésta apareció siempre como monómero ya que en todos los casos se trabajó en condiciones reductoras. Para el análisis de la Trx O2 se usaron tanto la Superdex HR-75 como la Superdex HR-200. La primera de ellas resuelve mejor en las zonas de bajo tamaño molecular y de ella que se puede obtener un valor bastante fiable de tamaño de la Trx O2. Esta cromatografía presentó un solo pico a 13 ml (figura 50.B). El uso de la columna Superdex HR-200 para la misma enzima también ofreció un solo pico a un volumen de 18.78 ml (figura 50.A). Esta última columna, que se utilizó fundamentalmente para realizar estudios comparativos y de interacción con la PrxII F, resuelve mejor a tamaños moleculares elevados, por lo

que los valores obtenidos para el estado monomérico de la Trx O2 deben de ser considerados con cautela.

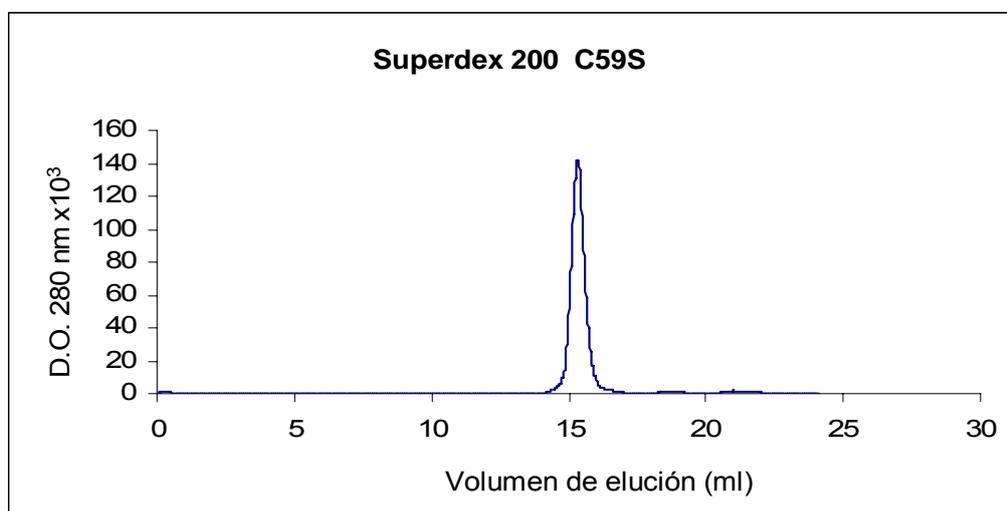


Figura 49. Cromatograma obtenido en el procesamiento del mutante C59S en superdex HR-200.

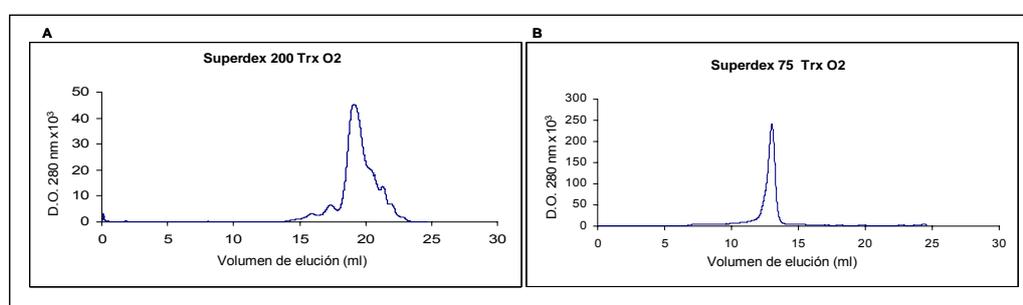


Figura 50. Cromatograma obtenido en el procesamiento de Trx O2 en Superdex HR-200 (A) y Superdex HR-75 (B).

Para poder determinar los tamaños moleculares de las proteínas así como su radio de Stokes había que realizar previamente un calibrado de la Superdex HR-200 y

Superdex HR-75 con proteínas marcadoras. Para cada una de las condiciones ensayadas, pH, tampones, agentes reductores o desnaturalizantes, se hizo una calibración de la columna aunque los volúmenes de elución de las proteínas patrón se mantuvieron inalterados en todos los casos.

Las proteínas patrón usadas para la calibración de la columna Superdex HR-200 fueron quimotripsinógeno (25 kDa, 20.9 Å), ovoalbumina (43 kDa, 30.5 Å), albúmina de suero bovina (BSA) (67 kDa, 35.5 Å), catalasa (240 kDa, 52.2 Å) y ferritina (440 kDa, 61 Å).

En el caso de la columna Superdex HR-75 se usaron los marcadores citocromo C (12.3 KDa, 16.6 Å), ribonucleasa (13.7 KDa, 16.4 Å), quimotripsinógeno (25 KDa, 20.9 Å), ovoalbúmina (43 KDa, 30.5 Å), y albúmina de suero bovina (BSA) (67 KDa, 35.5 Å).

Para cada proteína, K_{av} (la fracción del volumen de gel estacionario que está disponible para la difusión de un soluto dado, este valor permite definir la conducta cromatográfica del soluto independientemente de la longitud del lecho y del grado de empaquetamiento) se calculó a partir de la ecuación 1.

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o) \quad (\text{Eq. 1})$$

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_o el volumen de exclusión de la columna (7.53 ml para

Superdex HR-75 y 7.89 ml para Superdex HR-200) que se determinó inyectando azul de dextrano. La representación del log de la masa molecular frente a K_{av} y por otra parte del $(-\log K_{av})^{1/2}$ frente al radio de Stokes de las proteínas marcadoras (figuras 51 y 52) corresponden a regresiones lineales que permiten determinar la masa molecular y el radio de Stokes de una proteína conociendo su K_{av} .

La figura 51 muestra las determinaciones del tamaño molecular y radio de Stokes calculados en Superdex HR-200 para los dos picos procedentes de la PrxII F.

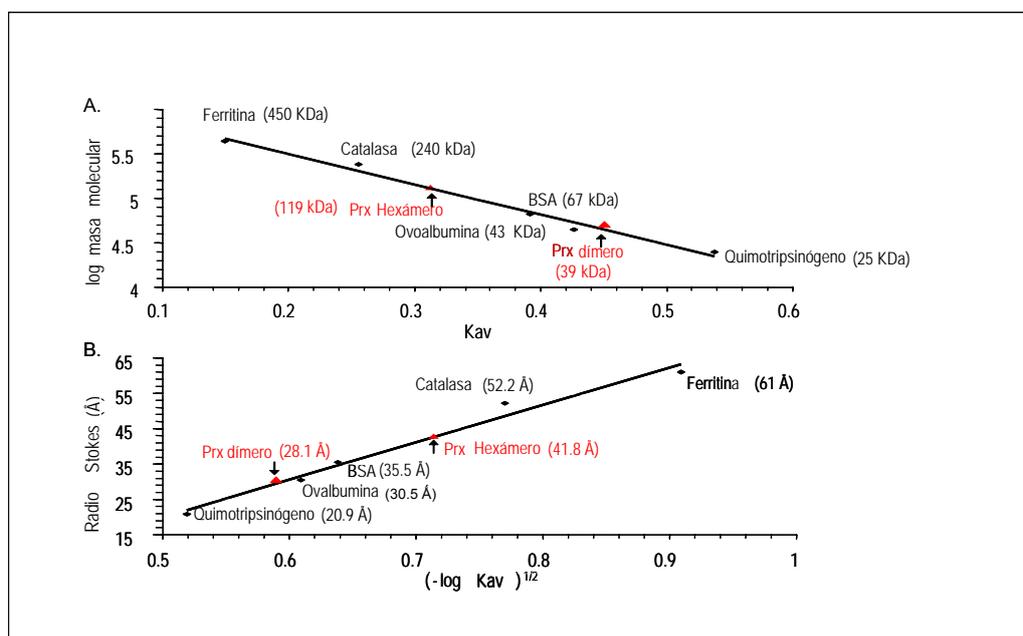


Figura 51. **A.** Determinación de la masa molecular de la PrxII F madura de *P. sativum*. Se indica la masa molecular de las proteínas marcadoras. En rojo se encuentran las masas moleculares calculadas para los picos de dímero o hexámero. **B.** Determinación del radio de Stokes de las formas dimérica y hexamérica de la PrxII F de *P. sativum*. Se indica el radio de Stokes de las proteínas marcadoras, que para las formas dimérica y hexamérica de la PrxII F se encuentra en rojo.

Así, a cada pico del cromatograma con su volumen de elución le corresponde una masa y un radio de Stokes determinado que se recoge en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de Masa y Radio de Stokes de las proteínas recombinantes determinados mediante columna Superdex HR-200.

Especie	Masa (kDa)	Radio de Stokes (Å)
DÍMERO (PrxII F, C59S o C84S)	38.9	28,1
HEXÁMERO (PrxII F o C84S)	118,9	41.8
Trx O2	7.5	10.24

En la figura 52 se muestran las determinaciones del tamaño molecular y radio de Stokes calculados en Superdex HR-75 para el pico procedente de la Trx O2.

Con los datos obtenidos de esta gráfica y empleando las curvas de calibrado de la columna Superdex HR-75 se pudo determinar tanto la masa de la Trx O2 como su radio de Stokes y así queda reflejado en la tabla 7.

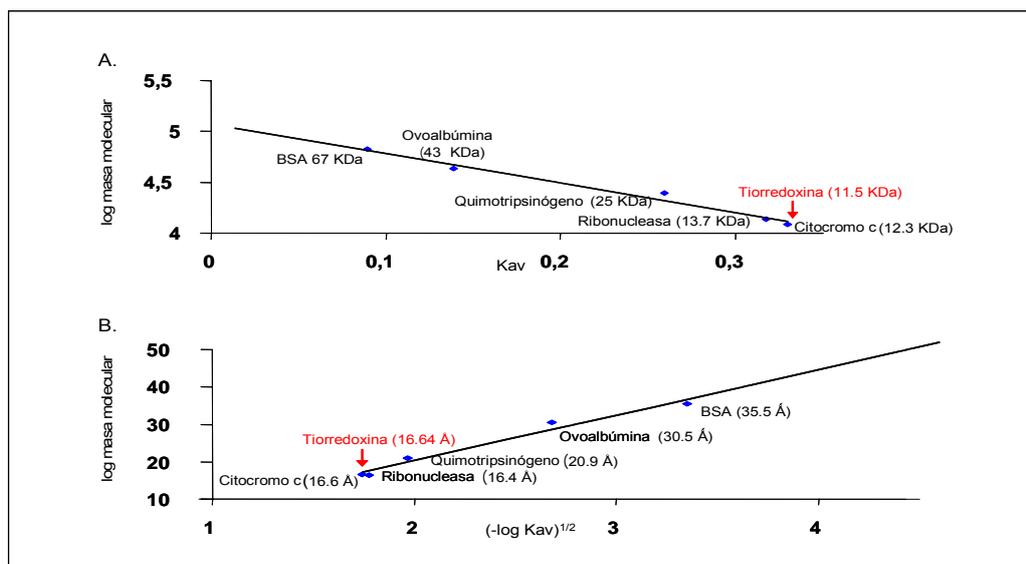


Figura 52. A. Determinación de la masa molecular de la forma monomérica de la Trx O2 madura de *P.sativum* en Supedex 75. Se indica la masa molecular de las proteínas marcadoras. En rojo se marca la masa molecular de la Trx O2. **B.** Determinación del radio de Stokes de la forma monomérica de la Trx O2. Se indica el radio de Stokes de las proteínas marcadoras que para la Trx O2 se encuentra en rojo

Tabla 7. Valores de Masa y Radio de Stokes de la Trx O2 recombinante determinados mediante filtración molecular en Superdex HR-75

Especie	Masa (kDa)	Radio de Stokes (Å)
Trx O2	11.5	16.64

9. FACTORES QUE AFECTAN A LA OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F DE *P. sativum* Y ESTUDIO COMPARATIVO CON LAS PROTEÍNAS MUTANTES C59S Y C84S

Con el fin de determinar las condiciones que controlan la oligomerización de la PrxII F de guisante se procedió al estudio, mediante experimentos de filtración en gel en columna analítica de Superdex HR-200, del efecto que distintos factores fisicoquímicos producen sobre la forma dimérica y hexamérica de la enzima: fuerza iónica, pH y estado redox. Los volúmenes de elución obtenidos para las proteínas estándar de calibración fueron los mismos en todas las condiciones ensayadas.

En todos los ensayos el mutante C59S mantuvo su comportamiento, apareciendo únicamente en su forma dimérica tal y como se mostraba en la figura 49 del apartado 8 de la sección de resultados. Por ello, no se representará gráficamente en los estudios comparativos a fin de facilitar y hacer más claros los esquemas.

9.1. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica en la oligomerización de las proteínas PrxII F, C59S y C84S de guisante, la columna de Superdex 200 se equilibró con Tris HCl a distinta distintas concentraciones de NaCl y se analizaron los distintos cromatogramas. En los ensayos realizados con Tris-HCl pH 8 a las concentraciones de 150 mM, 1 M o 2 M de NaCl, los niveles relativos pertenecientes al juego dímero-hexamero no variaron ni para la PrxII F ni para la variedad mutante C84S (figura 53).

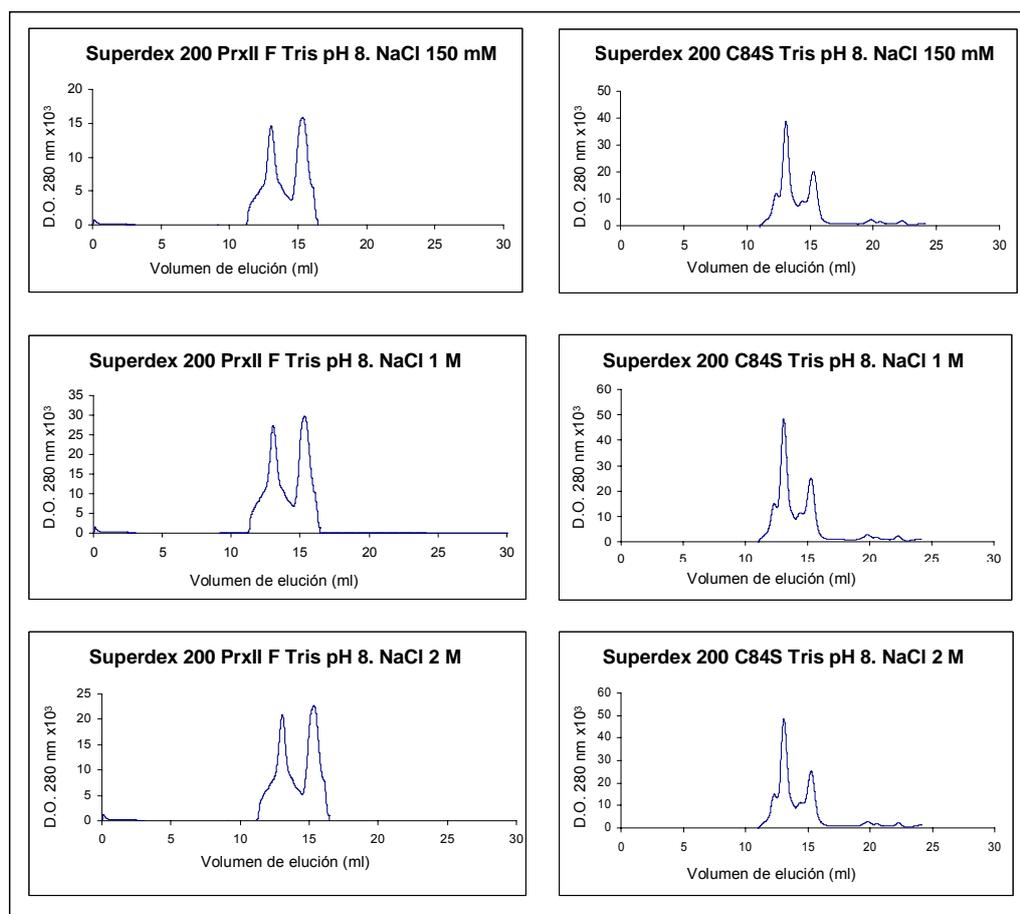


Figura 53. Efecto de la fuerza iónica en la oligomerización de la PrxII F y C84S en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8. Se indica en cada caso la concentración de NaCl utilizada

9.2. EFECTO DEL ESTADO REDOX

Con objeto de estudiar si el estado redox de las proteínas PrxII F, C59S o C84S afectaba a su estado de oligomerización, se equilibró la columna de Superdex 200 con Tris HCl 25 mM (pH 8.0) y DTT 10 mM o H₂O₂ 20 mM y se cromatografiaron las

Resultados

proteínas. Como se puede ver en la figura 54, la presencia del agente reductor DTT provoca que tanto la PrxII F como el mutante C84S se presenten en su forma dimérica.

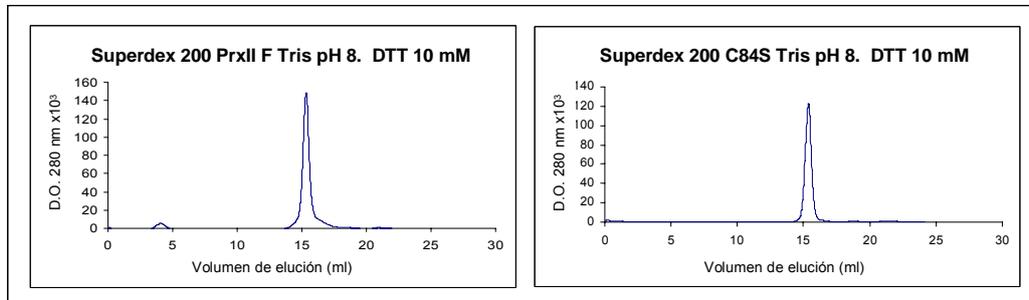


Figura 54. Efecto del DTT en la oligomerización de la PrxII F y C84S.

Por el contrario, cuando la PrxII F en Tris-HCl 25 mM pH 8, 150 mM NaCl fue oxidada con H_2O_2 20 mM durante una hora y cromatografiada, la forma predominante fue la hexamérica mientras que la entidad dimérica permanecía en muy pequeña cantidad (figura 55).

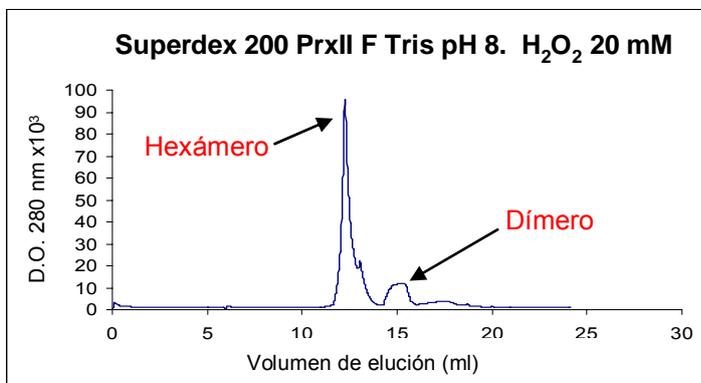


Figura 55. Efecto del H_2O_2 en la oligomerización de la PrxII F de guisante. En rojo se indican los picos de dímero y hexámero de la PrxII F.

Para conocer el estado de oxidación en el que se encontraba el dímero remanente de PrxII F tras la oxidación, se realizó una electroforesis SDS-PAGE de éste; la banda de la PrxII F teñida con Coomassie fue recortada y digerida con tripsina

pancreática bovina. La determinación de la huella peptídica se realizó por espectrometría de masas con un espectrómetro de tiempo de vuelo y la secuenciación de iones peptídicos se realizó utilizando un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa iónica lineal dotado de un sistema e ionización por nanoelectrospray. El análisis concluyó en que salvo un pequeñísimo porcentaje (<0.5%) que tenía las cisteínas libres, las cisteínas 59 y 84 de la peroxirredoxina formaban un enlace disulfuro. No se encontraron evidencias de cisteínas modificadas por lo que en principio no estaban en forma de sulfénico, sulfínico o sulfónico.

9.3. EFECTO DEL pH

El efecto que el pH produce en el estado de agregación de las proteínas PrxII F, C59S y C84S de *P. sativum* se estudió equilibrando la columna de Superdex 200 con fosfato potásico 25 mM (pH 6.5, 7.5. u 8) o con tampón Tris -HCl 25 mM (pH 7.5, 8 y 8.9) utilizando en ambos casos una concentración de NaCl de 150 mM (figuras 56 y 57).

En tampón fosfato potásico, tanto en la PrxII F como el C84S, no se manifestaron cambios apreciables en los niveles relativos de dímero-hexámero a los pH de 6.5, 7.5 u 8 (figura 56).

En tampón Tris-HCl los niveles relativos dímero-hexámero se mantuvieron constantes para la PrxII F y C84S a todos los pH (7.5, 8 y 8.9) excepto en el caso de la PrxII F a pH 8.9 donde se observó un claro desplazamiento de la enzima hacia la forma dimérica (figura 57).

A fin de estudiar los posibles cambios en el estado de agregación de las Prx a un pH aún más básico, se realizaron pases cromatográficos en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.9. Como se muestra en la figura 58, la PrxII F y el mutante C84S se

Resultados

ven desplazados por completo a la forma dimérica lo que supone una continuación al afecto observado en la PrxII F en Tris-Cl pH 8.9.

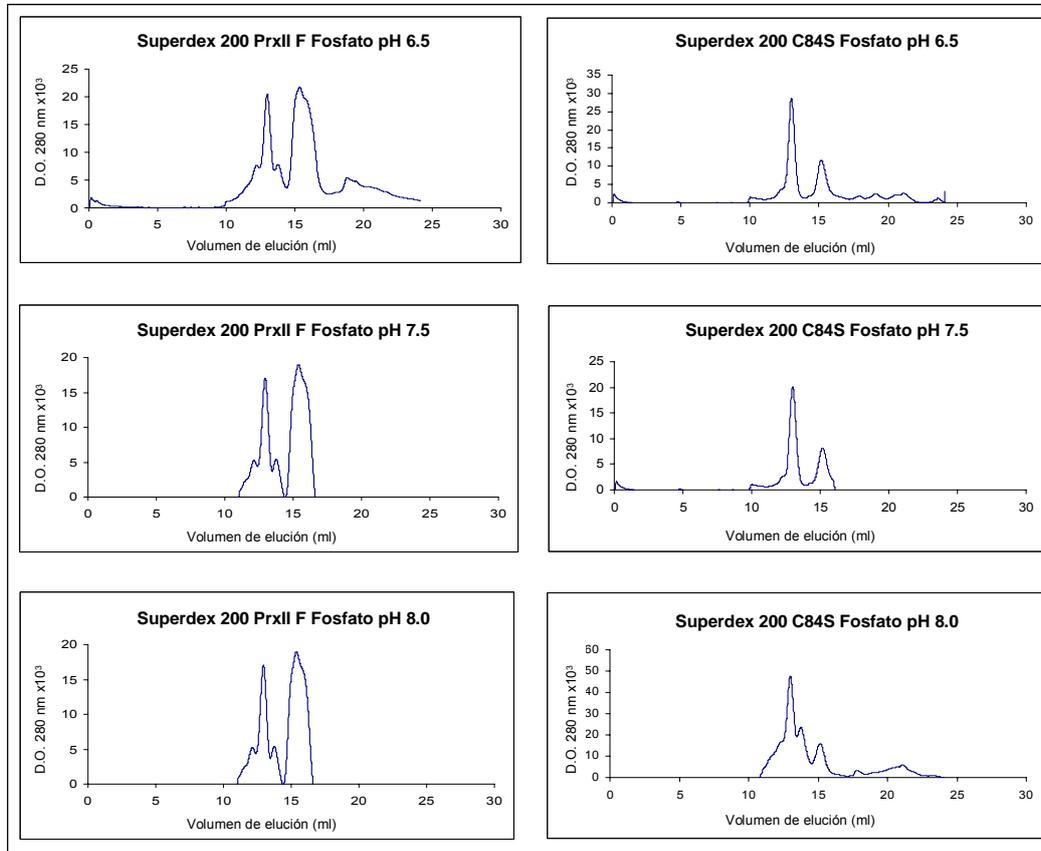


Figura 56. Efecto del pH en la oligomerización de la PrxII F y C84S de guisante. El tampón usado fue fosfato potásico 25 mM en presencia de NaCl 150 mM a los pH indicados.

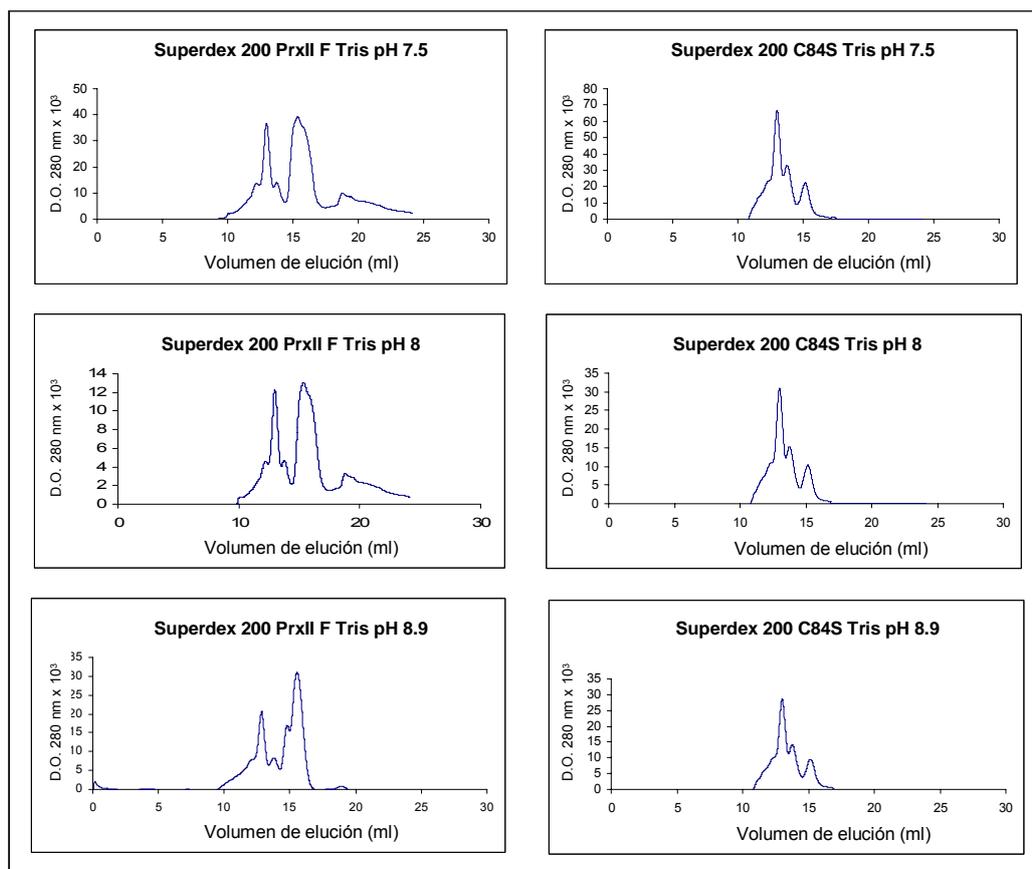


Figura 57. Efecto del pH en la oligomerización de la PrxII F y C84S de guisante. El tampón usado fue Tris-HCl en presencia de NaCl 150 mM a los pH indicados.

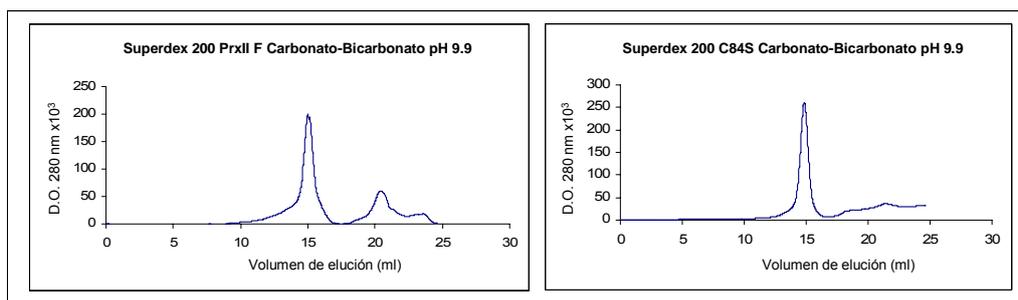


Figura 58. Efecto del pH en la oligomerización de la PrxII F y C84S de guisante. El tampón usado fue carbonato-bicarbonato en presencia de NaCl 150 mM.

10. ESTUDIO PORMENORIZADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Todos los picos obtenidos por cromatografía analítica en Superdex HR-200 de las proteínas recombinantes PrxII F, C59S y C84S, representados en las figuras 59 A1, A2 y A3 respectivamente, fueron estudiados con detalle mediante electroforesis SDS-PAGE-tinción de plata y Western blot a fin de dilucidar el comportamiento de cada proteína y establecer comparaciones que permitieran aclarar tanto el mecanismo de acción como los enlaces de la oligomerización de estas enzimas.

El pico de hexámero de la PrxII F dio una única banda monomérica en presencia de DTT mientras que en ausencia de éste se observaban cuatro bandas, dos aproximadamente a 40 kDa y otras dos en torno a 20 kDa (figura 59. B1). El pico de dímero mostró una banda de monómero en condiciones reductoras, mientras que sin agente reductor reveló una banda predominante de monómero y otra muy tenue de dímero a la misma altura a la que se encontraba la banda de menor tamaño observada en el pico de hexámero sin DTT.

El mutante C59S que sólo ofrecía picos de dímero en los cromatogramas puso de manifiesto una única banda a la altura del monómero cuando era tratada con DTT. Cuando la muestra no era reducida aparecía una nueva y tenue banda dimerica correspondiente en altura a la banda de menor tamaño (o mayor movilidad) observada en el pico de hexámero para la PrxII F sin DTT. Como se demuestra en los Western blot de la figura 59.C2 la fina banda intermedia que aparece en las tinciones de plata (figura 59.B2) se corresponde a una impureza.

La figura 59.B3 representa el comportamiento del mutante C84S. En el pico hexamérico apareció una única banda monomérica en presencia de DTT. La ausencia de DTT hizo que la proteína apareciera predominantemente en forma de dímero, correspondiéndose en altura a la banda de mayor tamaño (o menor movilidad) observada para la PrxII F en el pico de hexámero sin DTT, aunque la forma de monómero seguía presente. El pico cromatográfico dímero de este mutante sometido a electroforesis reductora se presentó como monómero mientras que sin DTT aparecía una pequeña banda correspondiente en altura con la banda de mayor tamaño observada para el pico de hexámero de la PrxII F sin DTT, si bien, la banda de monómero seguía siendo la mayoritaria (Figura 59.B3). Las bandas acompañantes volvían a ser impurezas tal y como lo confirma la ausencia de manchas en el Western-blot (figura 59.C3).

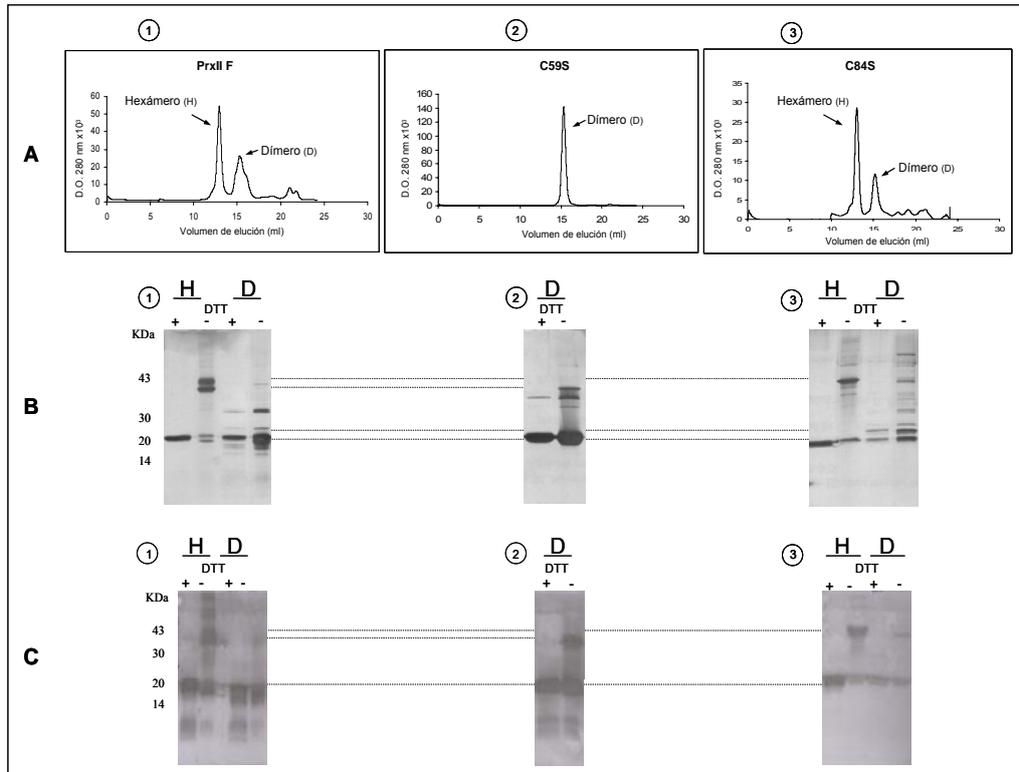


Figura 59. A. Filtración molecular a través de la columna Superdex 200-HR en un sistema FPLC de la PrxII F (A,1), C59S (A,2) y C84S (A,3). SDS-PAGE con tinción de plata (B) o Western blot (C) con anticuerpos frente a la PrxII F de los picos correspondientes al hexámero (H) y dímero (D) de la filtración molecular.

11. ELECTROMOVILIDAD DE LA PRXII F MADURA RECOMBINANTE

Con objeto de analizar la electromovilidad de la PrxII F recombinante en SDS-PAGE, la proteína se sometió a electroforesis SDS-PAGE en presencia o ausencia de agente reductor, DTT, en el tampón de carga.

En la figura 60 se puede observar, después de una tinción de plata, cómo en ausencia de DTT la proteína aparece predominantemente a la altura de unos 40 kDa, tamaño correspondiente al homodímero, mientras que en condiciones reductoras aparece exclusivamente la banda del monómero a unos 20 kDa.

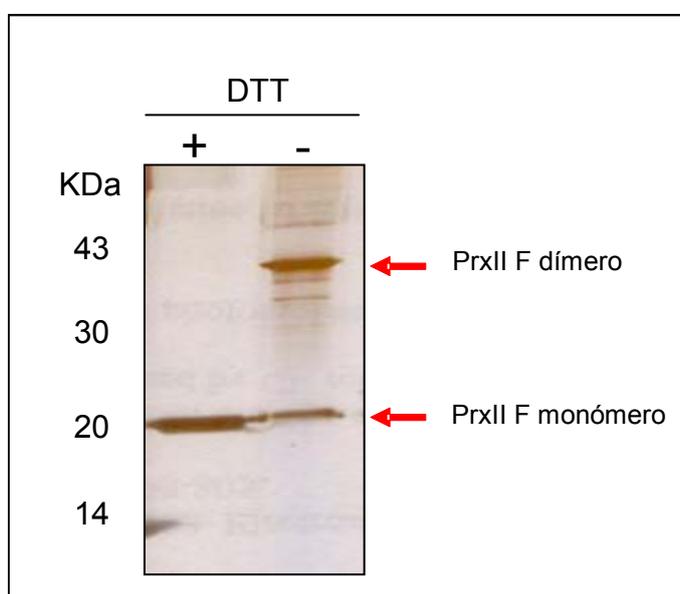


Figura 60. Comportamiento electroforético en SDS-PAGE de la PrxII F recombinante de guisante en presencia y ausencia de DTT.

12. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES FRENTE A LA PRXII F DE *P. sativum*

La Prx II F purificada a homogeneidad se utilizó para la obtención de anticuerpos policlonales en conejos de raza híbrida *New Zealand*, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Una vez obtenido el antisuero se determinó el título por la técnica de ELISA (figura 61.A) y se ensayó su especificidad mediante Western blot de la proteína recombinante (figura 61. B).

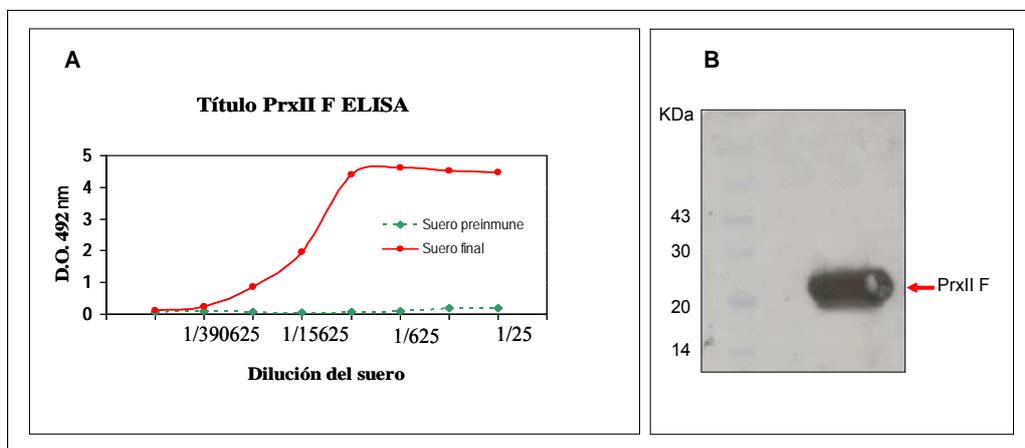


Figura 61. A. Determinación del título del anticuerpo anti-PrxII F mediante ELISA.

B. Western blot de PrxII F reducida con DTT.

13. COMPORTAMIENTO DE LA PRXII F NATIVA DE *P. sativum* EN GELES SDS-PAGE

El comportamiento electroforético en geles SDS-PAGE de la PrxII F nativa fue evaluado en extractos de proteínas procedentes de hojas y raíces de guisante. Tanto en presencia como en ausencia de DTT 10 mM, la PrxII F mostró un comportamiento idéntico e inesperado en función a los datos conocidos en la literatura para otras Prx de tipo II. En Western blot de hojas aparecieron cuatro bandas bien diferenciadas que pueden corresponderse por su tamaño, bien a diferentes estados de oligomerización de la enzima (monómero, dímero, trímero o hexámero) o a interacciones de la PrxII F con otras proteínas. En raíces únicamente se observó la presencia de dos bandas representativas de la forma monomérica y trimérica (figura 62).

La ausencia de bandas en el Western blot frente a extractos de hoja en plantas transgénicas de *A. thaliana K.O.* para la PrxII F suponía un aval de especificidad para los anticuerpos. Sin embargo, la persistencia de todas las bandas que aparecían en guisante podría seguir siendo atribuida tanto a la formación de polímeros altamente estables y resistentes a la acción del detergente (SDS) como al reconocimiento inespecífico de los anticuerpos en guisante hacia otras proteínas.

Con objeto de esclarecer esta incógnita se trataron los extractos proteicos de raíces y hojas con urea 6 M, se incubó un mínimo de una hora y se sometieron a electroforesis desnaturizante en presencia de DTT. En estas condiciones el Western blot mostró una sola banda, la correspondiente al monómero de la PrxII F evidenciando de este modo la especificidad de los anticuerpos usados y afianzando la teoría de oligomerización de la enzima (figura 62).

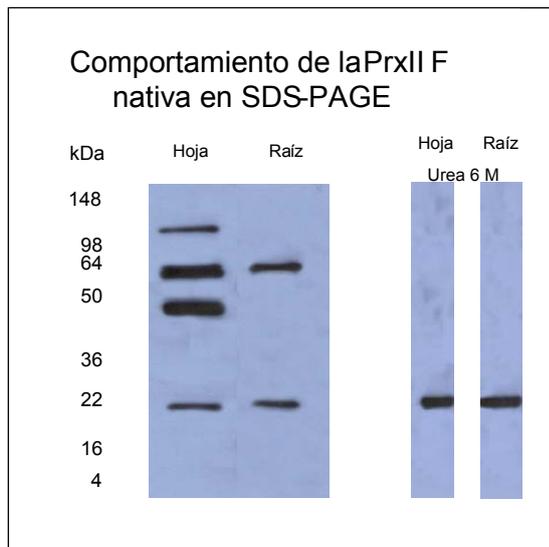


Figura 62. Electroforesis desnaturante de la PrxII F de hojas y raíces de guisante en condiciones reductoras, con y sin urea 6 M.

14. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PRXII F MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para confirmar la localización mitocondrial de la PrxII F de guisante se llevó a cabo la inmunolocalización de la proteína mediante microscopía electrónica con el uso de anticuerpos policlonales frente a la misma.

Para ello se realizaron cortes de hojas de guisante totalmente expandidas tras 3 horas de iluminación, tal y como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Las muestras a estudiar se trataron con los anticuerpos para la PrxII F y paralelamente se realizaron controles usando como anticuerpo primario suero preinmune. Se hizo inmunolocalización mediante anti-IgGs marcados con oro coloidal de 15 nm.

Como se puede observar en la figura 63.A se comprobó que la PrxII F de guisante es una proteína mitocondrial, ya que en las muestras incubadas con el anticuerpo frente a dicha proteína se observa una alta proporción de partículas en la

mitocondria, si bien también aparece alguna partícula en el citosol. Sin embargo el marcaje es casi inexistente en otros orgánulos.

Por otra parte en los controles que se incubaron con el suero preimmune se observa un marcaje prácticamente nulo (figura 63.B).

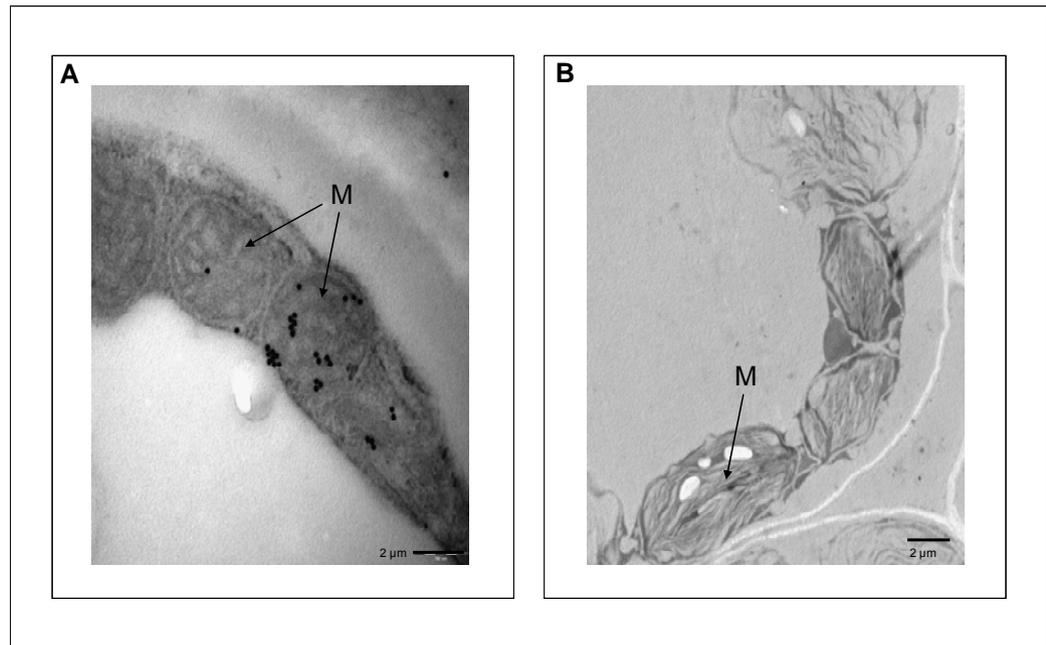


Figura 63. Inmunomarcaje con oro coloidal de secciones ultrafinas de hojas de guisante. **A** Muestras tratadas con Ig G anti PsPrxII F. **B** Control tratado con Ig G preimmune. Se encuentran indicadas con flechas algunas de las mitocondrias. (M): mitocondria. ( 2 μm).

15. LOCALIZACIÓN SUB-SUB-CELULAR DE LA PRXII F

Una vez se había demostrado la localización mitocondrial de la PrxII F mediante inmunolocalización se decidió profundizar en su sub-localización dentro de la mitocondria, esto es, esclarecer su preferente localización en la membrana o en la matriz.

A partir de hojas de guisante se extrajeron mitocondrias que posteriormente fueron sonicadas. Mediante centrifugación de las muestras a 100.000 xg se separó la matriz mitocondrial de las membranas. Previo a la electroforesis reductora en SDS-PAGE-Western blot las proteínas fueron tratadas con urea 6 M a fin de obtener una única banda monomérica de la PrxII F. Para poder comparar los niveles de PrxII F se cargaron 10 µg de muestra tanto para las proteínas de la matriz como para las de la membrana.

Como puede verse en la figura 64, los niveles de PrxII F son mucho mayores en la matriz mitocondrial que en las membranas.

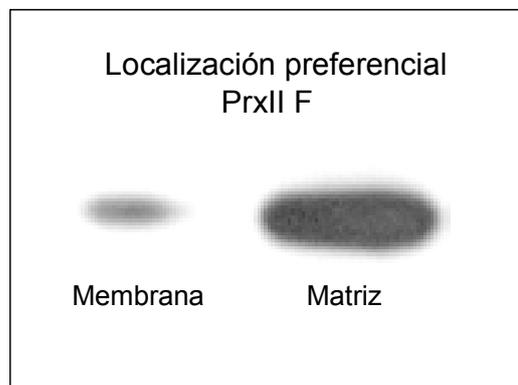


Figura 64. Western blot de la PrxII F en membranas y matrices mitocondriales de hojas de guisante.

16. RECONOCIMIENTO PRxII F – ANTICUERPO MEDIANTE MICROTERMOCALORIMETRÍA

A fin de estudiar la especificidad de la unión PrxII F – Ig G se pensó en realizar estudios físicoquímicos de microcalorimetría enfrentando la proteína a su anticuerpo.

La figura 65 muestra la titulación microcalorimétrica de los sueros pre- (A) y post-inmune (B) con PrxII F a una concentración de 183 μ M.

Los picos obtenidos durante la titulación del suero pre-inmune eran pequeños y uniformes, y se interpretan como formación de calor por dilución, por lo que no representan unión alguna. Estos resultados confirman la ausencia de anticuerpos preexistentes que reconozcan el antígeno.

La titulación del suero post-inmune con la PrxII F se caracteriza por significantes cambios exotérmicos. La integración de los datos brutos mostró un comportamiento bifásico. Los datos fueron analizados usando un modelo para la unión a sitios diferentes e independientes (ORIGIN, Microcal.). Este modelo permite diferenciar dos poblaciones de anticuerpos. En definitiva es una aproximación ya que un suero policlonal contiene una multitud de anticuerpos con diferentes parámetros de unión.

El primer evento de alta afinidad de unión, representando en torno al 11% de los anticuerpos específicos fue conducido por unos cambios favorables de entalpía ($\Delta H = -27.8 \pm 2.3$ kcal/mol) y caracterizados por una K_D de 90 ± 41 nM. Similares afinidades y cambios de entalpía han sido descritos para otros anticuerpos maduros en la bibliografía. (Torigoe et al., 1995).

El segundo evento, representado por un 89% de los anticuerpos específicos se caracteriza con una K_D de 4.3 ± 0.3 μ M.

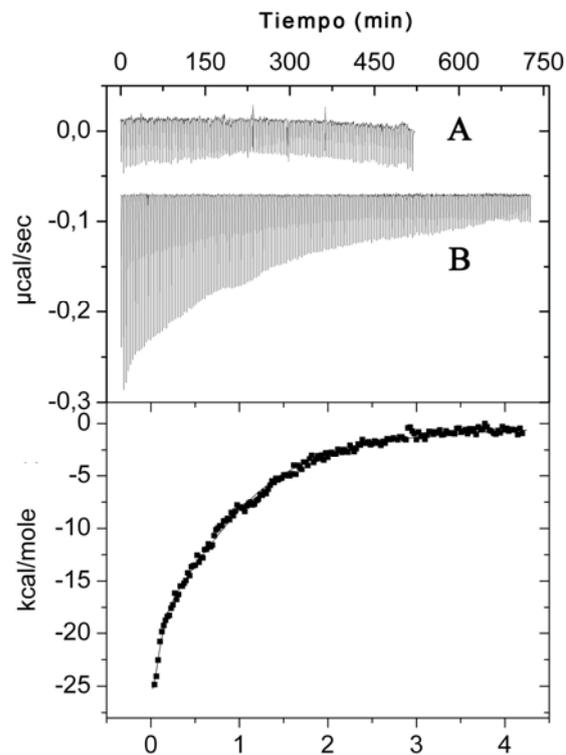


Figura 65. Titulación microcalorimétrica de los anticuerpos para la PrxII F. Panel superior: cambios de calor durante la titulación del suero pre-inmune (A) y post-inmune (B) enfrentados a la PrxII F con alícuotas de 1.6 μ l de PrxII F 183 μ M. Todas las muestras fueron dializadas frente a Tris-HCl 25 mM (pH 7.5) y DTT 0.1 mM. Previo al análisis los sueros sufrieron una doble dilución con el tampón. Panel inferior: integración de las áreas de los picos obtenidas por titulación del suero post-inmune. Los datos fueron ajustados usando el “*modelo de dos sitios de unión*” de ORIGIN (Microcal).

17. UNIÓN DE LA PRXII F OXIDADA A LAS MEMBRANAS MITOCONDRIALES

El hecho de que para las Prx de 2-Cys y Prx-Q se hayan descrito adhesiones de la enzima a las membranas tilacoidales hace pensar en la hipótesis de que una unión similar ocurriera en la mitocondria.

Los picos de dímero y hexámero obtenidos tras la filtración molecular de la PrxII F sobreoxidada (figura 55, apartado 9.2.) se incubaron por separado durante una hora con membranas mitocondriales aisladas de guisante. Posteriormente éstas fueron lavadas tres veces con Tris-HCl 25 mM. Para revelar si había o no adhesión de la PrxII F a la membrana se realizó un Western blot cargando 10 µg de cada una de las muestras, membranas control (a la que previo a la incubación sólo se les añadió tampón), membranas incubadas con el pico del dímero y membranas incubadas con el pico del hexámero. Como en los casos anteriores, para observar la presencia de una única banda en los ensayos de Western blot se usó urea 6 M. Los experimentos se repitieron al menos tres veces.

En la figura 66.B se muestran los distintos niveles de enzima presentes en cada uno de los tratamientos evidenciando una clara unión de la PrxII F procedente del dímero oxidado a las membranas mitocondriales, que como ya se ha comentado en el apartado **9.2.**, presenta las cisteínas en su forma oxidada como puente disulfuro.

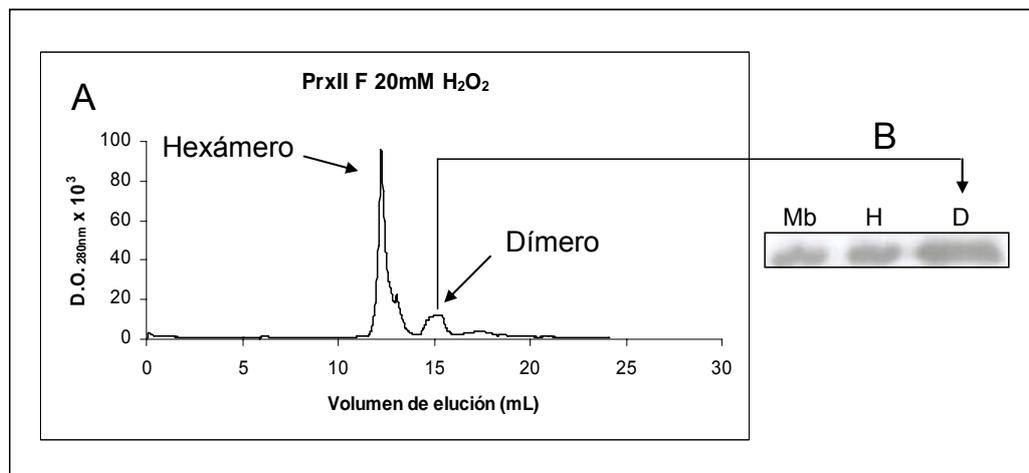


Figura 66. **A.** Cromatograma obtenido del pase de la PrxII F sobreoxidada con H_2O_2 20 mM durante 1h. **B.** Western blot de membranas mitocondriales incubadas con tampón (Mb) y con el pico de hexámero (H) o dímero (D) de PrxII F de la figura A.

18. PROTECCIÓN DE DNA FRENTE A ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

Para comprobar si la PrxII F recombinante de *P. sativum* era capaz de proteger el DNA frente a especies de oxígeno reactivo, se realizó un ensayo en el que éstas se producen incubando DTT con Fe^{3+} . De esta manera se cataliza la reducción de O_2 a H_2O_2 , que posteriormente se convierte a radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton. Estas especies de oxígeno reactivo atacan al DNA plasmídico, en este caso, produciendo hendiduras y, por tanto, cambios de conformación.

Se realizó un estudio comparativo de protección del DNA entre la PrxII F y los mutantes C59S y C84S utilizando la albúmina como control negativo.

Como se puede observar en la figura 67, los radicales producidos por este sistema provocaban la degradación completa de 1 μg de DNA plasmídico; la PrxII F y mutante C84S de *P. sativum* fueron capaces de prevenir esta degradación mientras que la proteína C59S y albúmina carecían de la actividad protectora, por lo menos a las concentraciones de proteína empleadas (20 μM).

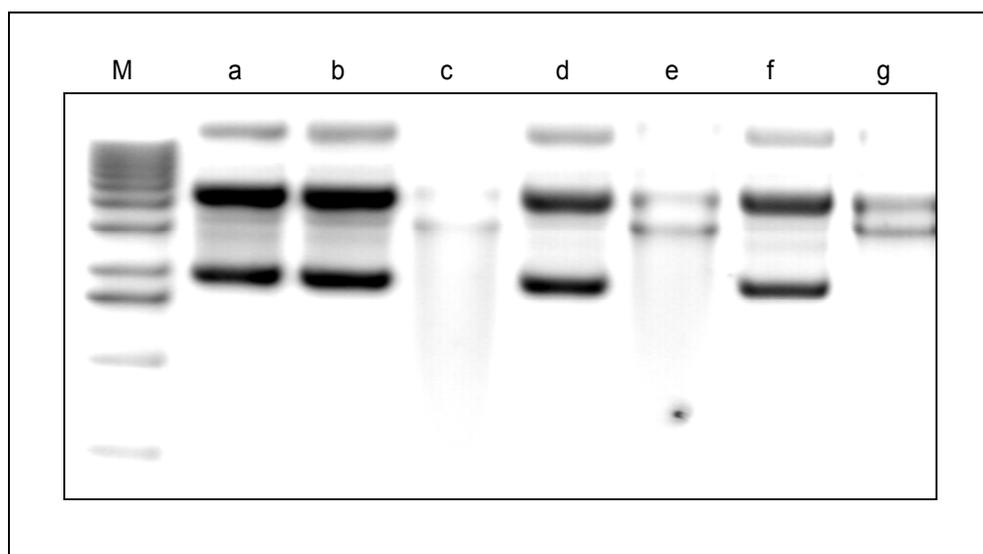


Figura 67. Ensayo de protección de DNA plasmídico. M, marcador; a, plásmido; b, plásmido + DTT; c, plásmido + Fe^{3+} + DTT; d, plásmido + Fe^{3+} + DTT + 20 μM Prx; e, plásmido + Fe^{3+} + DTT + 20 μM C59S; f, plásmido + Fe^{3+} + DTT + 20 μM C84S; g, plásmido + Fe^{3+} + DTT + 20 μM BSA.

19. ACTIVIDAD PEROXIDASA

Se analizó la actividad destoxicadora de las proteínas PrxII F, C59S y C84S recombinantes de guisante hacia el H_2O_2 , y se estudió comparativamente la eficiencia de cada una de las enzimas.

19.1. ACTIVIDAD PEROXIDASA DEPENDIENTE DE DTT

La actividad peroxidasa de la PrxII F se puede analizar mediante un método espectrofotométrico en el que la cantidad residual de hidroperóxido se mide por su capacidad para producir un complejo de color púrpura cuando reacciona con una mezcla de sulfato ferroso amónico y tiocianato potásico que absorbe a 480 nm (Thurman *et al.*, 1972). Previamente se realiza una curva estándar con cantidades conocidas de hidroperóxido para poder determinar la concentración residual en el ensayo.

Como mecanismo de reducción de las proteínas PrxII F, C59S y C84S se utilizó el DTT, con el que se incubaron previamente las enzimas a una concentración de 4 mM. Se midió la actividad peroxidasa en función de la concentración de proteína y se hizo un estudio comparativo de actividad entre las distintas proteínas.

Como se puede ver en la figura 68, el mutante C59S es incapaz de reducir el H_2O_2 . La PrxII F se mostró unas diez veces más activa que el mutante C84S aunque en ambos casos la reducción fue dependiente de la cantidad de enzima empleada.

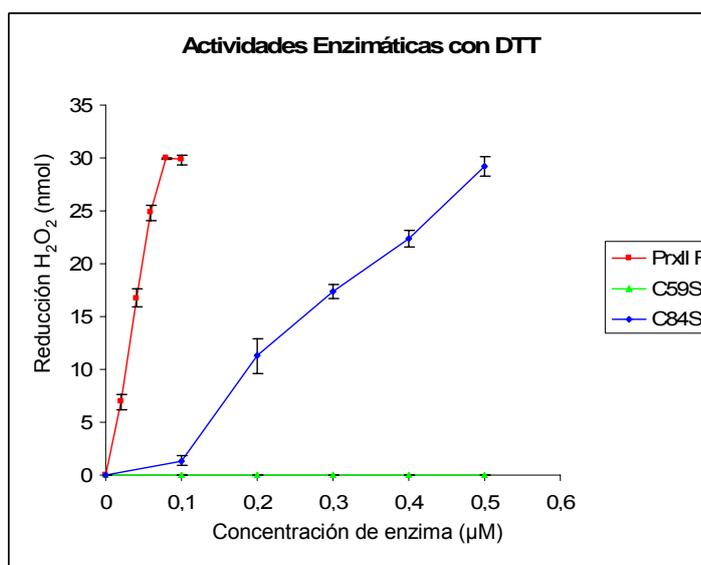


Figura 68. Reducción del H_2O_2 dependiente de DTT producida por las proteínas recombinantes PrxII F, C59S o C84S en función de la concentración de enzima utilizada. Los valores son la media de experimentos triplicados.

19.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LA PRXII F PARA LA ELIMINACIÓN DEL H_2O_2

Para la determinación de las constantes cinéticas de la PrxII F recombinante para el H_2O_2 se utilizó la medida de actividad peroxidasa dependiente de DTT.

Teniendo en cuenta la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Los valores de K_M y V_{max} se pueden obtener mediante la representación de Lineweaver-Burk que consiste en aplicar los inversos, quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Considerando que en las fases iniciales de la reacción enzimática la concentración de sustrato en relación con el tiempo es casi lineal se pueden obtener datos exactos de la velocidad en función de la concentración de sustrato conociendo la concentración inicial de éste. Con este fin se fijó una concentración de PrxII F recombinante de 0.5 μM y se varió la concentración de H_2O_2 entre 5 y 40 μM midiendo en cada caso la velocidad inicial de la reacción. La representación de Lineweaver-Burk obtenida puede observarse en la figura 69; en esta representación la extrapolación lineal de los datos nos proporciona tanto V_{max} como K_M cuyos valores son $12.72 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$ y 18.86 μM respectivamente. Por último conociendo el valor de V_{max} y la concentración total de enzima se puede calcular el valor de la constante catalítica (k_{cat}) mediante la ecuación:

$$V_{max} = k_{cat} [E]_t$$

Así el valor de k_{cat} es de 10.6 s^{-1} ; $1/k_{cat}$ es igual a 0.09 s y la relación k_{cat}/K_M presenta un valor de $5.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

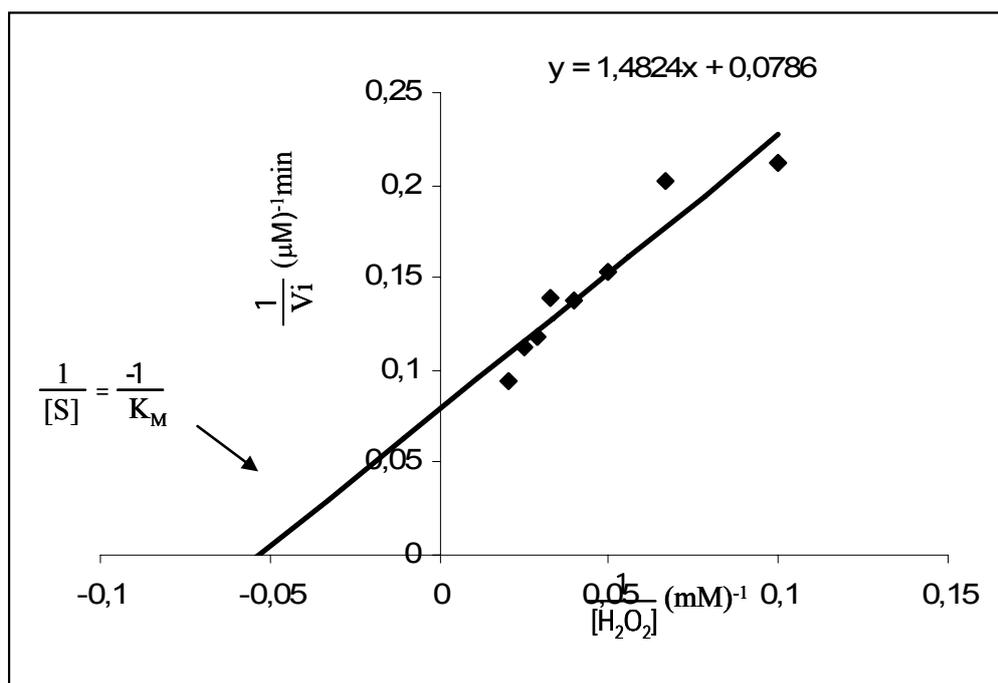


Figura 69. Representación de la actividad peroxidasa dependiente de DTT de la PrxII F recombinante de guisante mediante la ecuación de Lineweaver-Burk. En esta representación doble inversa, se representa $1/V_i$ frente a $1/[S]$. Los valores son la media de experimentos duplicados.

20. DETERMINACIÓN DE LOS POTENCIALES REDOX DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Con objeto de determinar el efecto de las mutaciones sobre las Cys y entender mejor el mecanismo de transferencia electrónica desde la Trx O₂ hasta la PrxII F, se calculó el potencial redox de cada una de las proteínas recombinantes purificadas.

A excepción del potencial redox del mutante C59S, que no pudo ser determinado mediante el método fluorimétrico utilizado y descrito en la sección de

materiales y métodos, todos los potenciales redox fueron obtenidos a partir de las gráficas mostradas en la figura 70 obteniéndose unos valores de -309, -306 y -323 mV para la PrxII F, C84S y Trx O2 respectivamente.

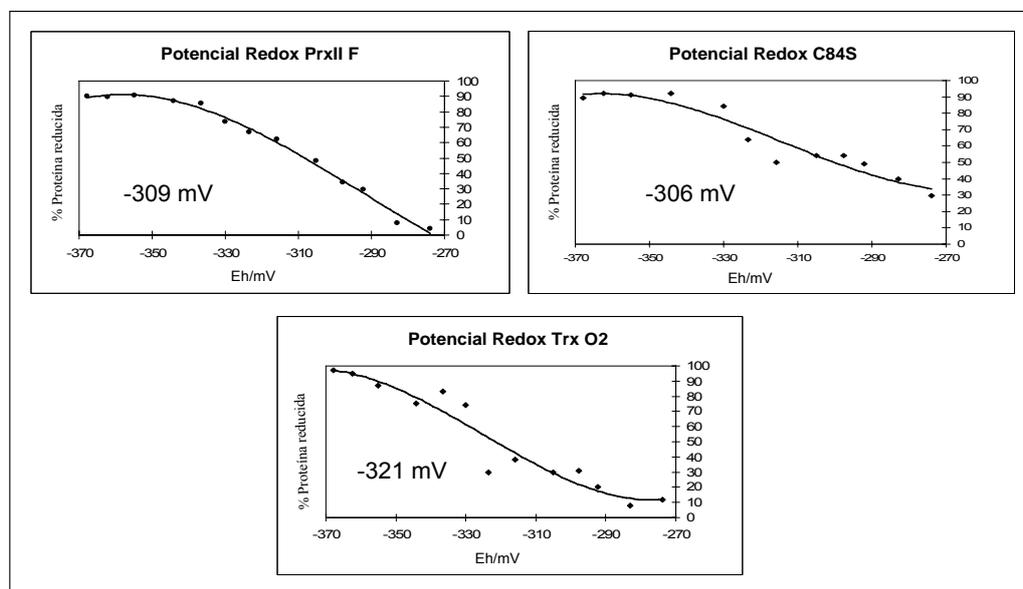


Figura 70. Potenciales redox para las proteínas recombinantes PrxII F, C84S y Trx O2 . Tras la reacción de los grupos tiol con monobromobimane, las muestras fueron analizadas por unión al fluoróforo.

21. DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS SULFIDRILO PRESENTES EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRXII F, C59S Y C84S

Para determinar si los grupos tiol que posee la PrxII F de guisante se encuentran en zonas expuestas de la proteína se acudió a la determinación de los mismos mediante la reacción de Ellman en ausencia de agentes desnaturizantes descrita en la sección de Materiales y Métodos. En estas condiciones sólo se determinan los grupos tiol que se encuentran expuestos y por tanto accesibles al DTNB.

En la tabla 8 se detallan los valores obtenidos para cada una de las proteínas usadas en el ensayo. La PrxII F muestra casi dos grupos tiol por unidad de proteína mientras que los mutantes sólo exponen un grupo.

<i>Enzima</i>	Grupos SH libres/proteína
Prx	1.75 ± 0.12
Mut 1	0.83 ± 0.10
Mut 2	0.78 ± 0.06

Tabla 8. Determinación de los grupos tiol mediante la técnica de Ellman. Las determinaciones se realizaron por triplicado mostrándose la desviación estándar en cada caso.

22. ESTUDIO DE LA PRXII F MEDIANTE TÉCNICAS BIDIMENSIONALES

Estudios previos con electroforesis bidimensionales han mostrado que las Prx humanas y las Prx de 2-Cys de levaduras pueden presentarse como spots con igual masa y diferente punto isoeléctrico dependiendo de su estado redox (Cesaratto *et al.*, 2005, Vivancos *et al.*, 2005, Biteau *et al.*, 2003, Woo *et al.*, 2003.). Así, la forma reducida aparece siempre a un pI más básico que la forma sulfinica oxidada (SO₂H). El hecho de que estas observaciones no se hubieran descrito en Prx de plantas motivó el realizar nuestros ensayos sobre la PrxII F.

En primer lugar se realizó una electroforesis bidimensional de la PrxII F recombinante de excelente grado de pureza que fue teñida mediante tinción de plata. La figura 71 muestra la aparición de dos spots a diferente altura y pI. Uno de ellos en torno a 40 kDa y pI de 5.8 y el segundo a unos 20 KDa y un pI de 6.29. Ambos valores de pI se acercan bastante al determinado teóricamente (5.98) para la PrxII F mediante predicción bioinformática.

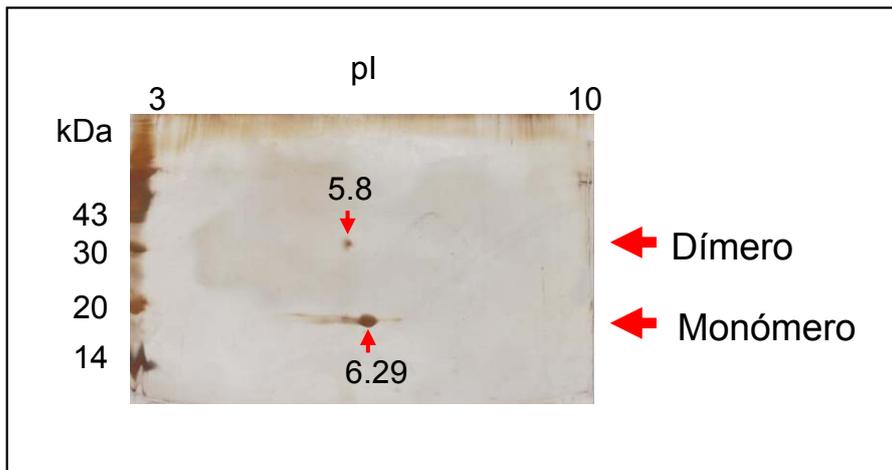


Figura 71. Tinción de plata de la electroforesis bidimensional de la PrxII F purificada. Se indican los puntos isoeléctricos (pI), tamaño molecular (kDa) y las formas monoméricas y diméricas de la PrxII F.

Tres experiencias se realizaron sobre guisante y *Arabidopsis thaliana*. Las electroforesis bidimensionales fueron reveladas mediante Western blot. Tanto en hojas y raíces de guisante como en hojas de arabis aparecieron dos spots con la misma masa molecular (20 kDa aproximadamente) pero diferente punto isoeléctrico (6.33 y 5.95). Además, en hojas de guisante también se observó la presencia de dos spots adicionales a la altura 40 kDa, que a su vez diferían en el pI (6.05 y 5.83) (Figura 72).

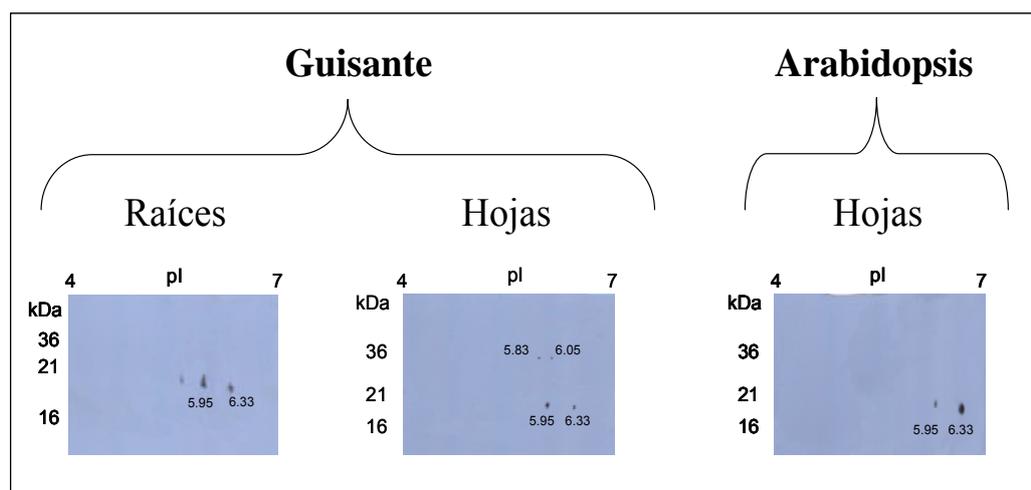


Figura 72. Electroforesis bidimensionales de la PrxII F reveladas por Western blot. Se indican los puntos isoeléctricos (pI), tamaño molecular (kDa), los tejidos (raíz y hoja) y la planta (guisante y arabidopsis).

Aprovechando la facilidad de obtención de mitocondrias de patata así como el hecho de que en SDS-Western blot de dichas mitocondrias aparece una sola banda específica para la PrxII F, se realizaron otras tres experiencias. El experimento consistió en el seguimiento de la PrxII F bajo distintas condiciones: una muestra control de mitocondrias de patata que no fue tratada con ningún agente, mitocondrias reducidas con DTT 50 mM y mitocondrias oxidadas con H_2O_2 50 mM y acida sódica para evitar que las peroxidasas dependientes de grupos hemo eliminasen el H_2O_2 . Tras una hora de incubación las muestras se sometieron a la electroforesis bidimensional y se revelaron mediante Western blot. (figura 73). Los dos spots monoméricos característicos (con pI de 6.33 y 5.95) ya observados en las experiencias anteriores volvieron a aparecer en las mitocondrias de patata no tratadas, siendo el spot más básico el predominante. En el caso de las mitocondrias reducidas con DTT sólo se pudo observar el spot monomérico que aparecía a pI más básico (6.33). En la experiencia oxidativa de las mitocondrias no solo estaban presentes los dos spots

monoméricas características (pI de 6.33 y 5.95), sino además una serie de puntos, todos de igual masa pero con un pI que oscilaba entre 6.33 y 4.

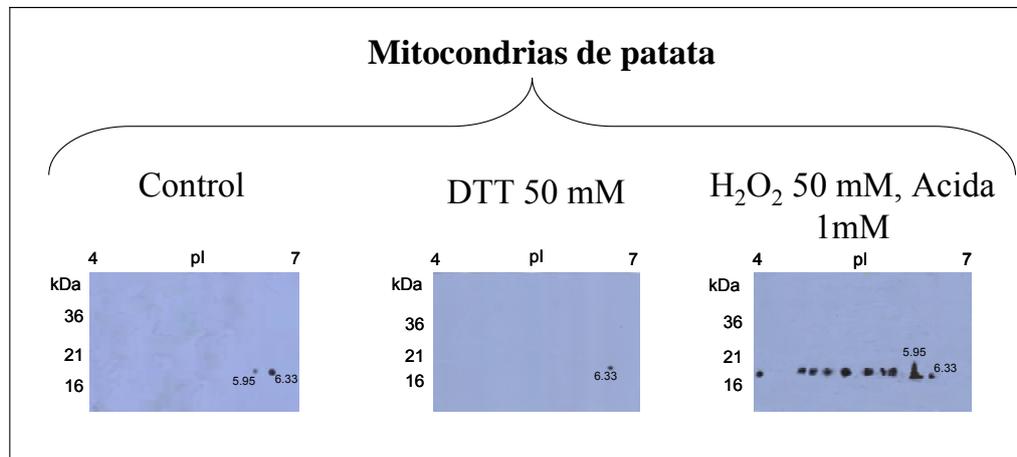


Figura 73. Electroforesis bidimensionales de la PrxII F de mitocondrias de patata reveladas por Western blot. Se indican los puntos isoeléctricos (pI), tamaño molecular (kDa) y tratamientos realizados

23. EFECTO DEL ESTRÉS FÍSICO Y QUÍMICO SOBRE LA PRXII F DE *P. sativum*

Para estudiar la expresión de la PrxII F de guisante en condiciones de estrés oxidativo, a plantas jóvenes de guisante crecidas en cultivo hidropónico se sometieron a distintos tratamientos. En todos los casos se utilizaron plantas control no aireadas y otras que estaban sometidas a aireación, a fin de estudiar si se producían cambios en los niveles de expresión de la PrxII F al aumentar el metabolismo aeróbico de la planta. Las plantas se analizaron en tejido folial y sistema radicular tanto a nivel transcripcional (PCR semicuantitativa) como traduccional (Western blot). Los experimentos se hicieron por triplicado.

Los tratamientos realizados fueron tanto físicos como químicos:

- 1) los tratamientos químicos se hicieron con NaCl (25 y 50 mM) y CdCl₂ (10μM) y se llevaron a cabo los estudios transcripcionales y traduccionales sobre la PrxII F.
- 2) el tratamiento físico consistió en incubar las plantas a 4°C hasta 24 horas. Se realizaron estudios transcripcionales de la PrxII F a las 12 horas mientras que los niveles de proteínas se midieron a las 12 y 24 horas.

Los resultados experimentales se ilustran en la figura 74.

En hojas, tanto los niveles de proteínas como de mRNA manifestaron una inducción en los tratamientos con NaCl (25 y 50 mM) o Cd₂Cl (10μM), mientras que en raíces dichos niveles se mantuvieron constantes en todos los casos (figura 74A).

En el caso de estrés físico se observó una clara inducción en los niveles de mRNA de hojas tras doce horas de enfriamiento mientras que en raíces no se apreció cambio alguno. Los niveles de proteínas en tejido folial se vieron incrementados tras 12 y 24 horas de frío. En cambio los niveles proteicos se mantuvieron inalterados en raíces (figura 74.B).

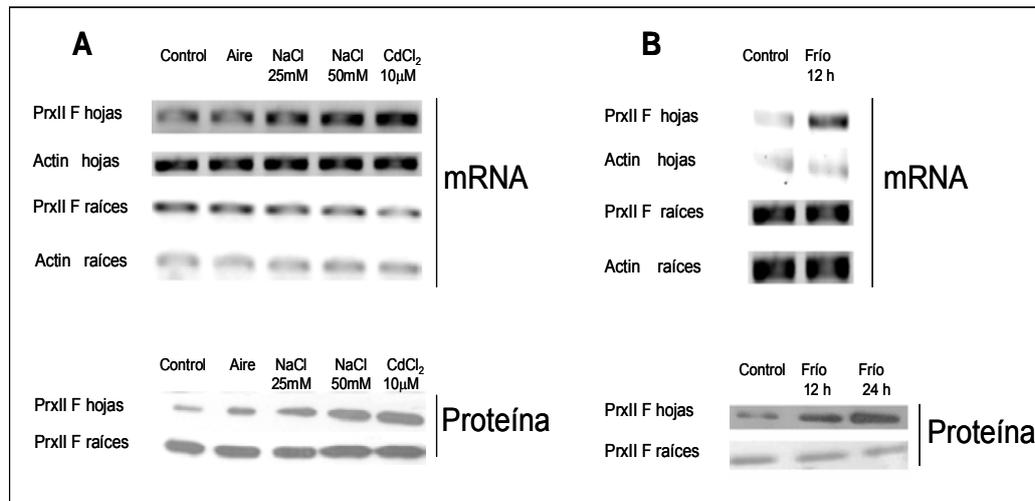


Figura 74. Estudio de la expresión de la PrxII F a nivel transcripcional (PCR semicuantitativa) y traduccional (Western blot). En el caso de la transcripción se muestran los niveles de actina y PrxII F tanto en hojas como en raíces. **A.** estrés salino (NaCl 25 mM y 50 mM) y por metales pesados (CdCl₂ 10 μM). **B.** estrés por frío; a 12 horas para mRNA y a 12 y 24 horas para proteínas.

24. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O2

Aunque hasta la fecha no se ha evidenciado que las Trx sean los donadores fisiológicos electrónicos de las Prx, existen numerosos estudios que muestran esta interrelación *in vitro* entre ambas proteínas. En este trabajo se trató de encontrar la relación *in vivo* e *in vitro* entre la Trx O₂ y PrxII F de guisante utilizando técnicas de microtermocalorimetría (ITC), filtración en gel, Western blot y ELISA.

24.1. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O2 DETERMINADA MEDIANTE MICROTERMOCALORIMETRÍA (ITC) Y FILTRACIÓN EN GEL

La idea del trabajo fue la de caracterizar la interacción de la Trx O2 con las proteínas PrxII F, C59S y C84S para estudiar si el hecho de mutar las cisteínas involucradas en el mecanismo de acción de la PrxII F podría implicar cambios en la interacción de ésta con la Trx O2. Así mismo se buscaba manifestar la interacción in vivo entre la PrxII F y la Trx O2.

Para los ensayos de ITC se utilizaron las proteínas Trx O2, PrxII F, C59S, C84S a las concentraciones de 2, 65, 64 y 62.5 μM respectivamente. Se inyectaron fracciones de 1.6 μL de PrxII F, C59S o C84S sobre la Trx O2. Tras las titulaciones se determinaron los parámetros termodinámicos correspondientes suponiendo un orden de reacción de 1 con el uso del programa ORIGEN.

La proteína mutante C59S no interaccionó con la Trx O2 mientras que la interacción C84S-Trx-O2 daba lugar a cambios de calor muy pequeñas que no podían ser analizados mediante los modelos matemáticos disponibles.

La interacción entre PrxII F-Trx O2 pudo ser determinada tal y como se muestra en la figura 75. Los datos experimentales se ajustaron mediante el modelo de “Un sitio de unión” (versión ORIGIN de MicroCal). La unión está conducida por cambios extremadamente favorables de entalpía ($\Delta H = -60.6 \pm 0.1$ kcal/mol) que demuestran que un gran número de interacciones, tal como puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals, tienen lugar en la formación del complejo PrxII F-Trx O2. Este cambio favorable de entalpía está compensado por unos cambios muy desfavorables de entropía ($T\Delta S = -47.1 \pm 0.1$ kcal/mol) que indican una pérdida significativa en el grado de libertad conformacional de las proteínas.

La unión de ambas proteínas es ultrafuerte, en el límite de detección de cualquier método basado en equilibrios. Sin embargo, hay dos puntos en la parte inclinada de la curva de titulación que permite el cálculo de una constante de unión cuyo valor fue de $(7.9 \pm 0.9) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Ésta se corresponde con una constante de disociación de $126 \pm 14 \text{ pM}$ y un cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) de $-13.5 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$. La afinidad que se muestra en este ensayo es una de las interacciones más fuertes descritas para una interacción proteína-proteína. (Stites et al. 1997). Igualmente, el cambio de entalpía es muy elevado (-60.6 kcal/mol) muy por encima de la media de una interacción proteína-proteína que toma valores de -8.6 kcal/mol (Stites et al. 1997).

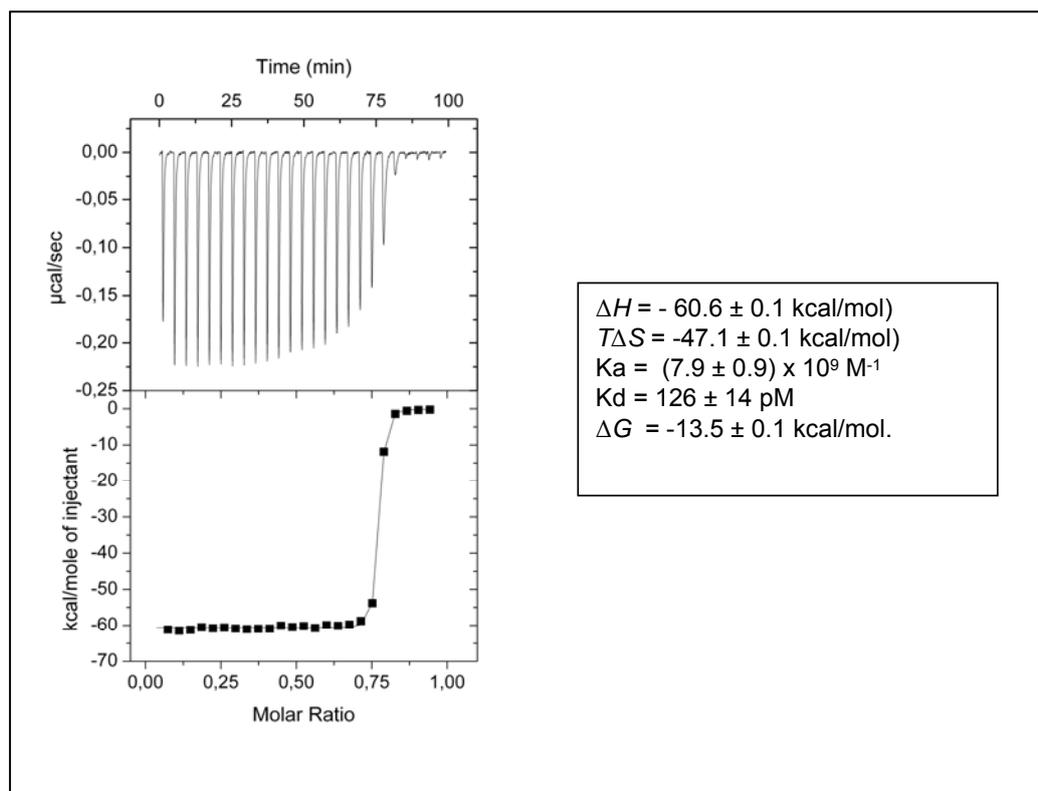


Figura 75. Estudio de unión de las proteínas PrxII F-Trx O2 mediante microcalorimetría. Arriba: Cambios de calor observados durante la titulación de 2 μM de Trx O2 con alícuotas de 1.6 μl de PrxII F (64.6 μM). Abajo: Áreas de los picos integradas de los datos brutos (■). La línea corresponde al ajuste de estos datos utilizando el modelo de un sitio de unión de ORIGEN (MicroCal).

Los datos obtenidos por ITC dieron pie a los estudios de interacción entre las mismas proteínas ayudándonos de técnicas clásicas como la filtración molecular en gel.

La Trx O2 fue incubada por separado con las proteínas PrxII F, C59S o C84S en tampón Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM y DTT 0.5 mM durante un periodo de 12 horas. Seguidamente se sometió cada mezcla de incubación a una filtración en gel a través de una columna Superdex HR-200 equilibrada con el mismo tampón con que se hicieron los experimentos de microcalorimetría. La resolución de picos se muestra en el cromatograma de la figura 76.

El par C59S-Trx O2 se resolvió presentando dos picos, uno correspondiente a la forma dimérica del mutante C59S (15.3 ml) y otro pico característico de la Trx O2 (18.8 ml).

Al igual que en el caso anterior, el par C84S-Trx O2 presentó dos picos bien definidos correspondientes a la forma dimérica del C84S (15.3 ml) y al monómero de la Trx O2 (18.8 ml).

En el par PrxII F-Trx O2, desapareció el pico monomérico de la Trx O2 que interaccionó con la PrxII F adicionada en exceso para formar un nuevo heterocomplejo PrxII F- Trx O2 a 13.5 ml. La presencia de la Trx O2 se puso de manifiesto mediante Western blot del fraccionado.

La determinación de la masa y radio de Stokes del heterocomplejo se realizó usando las curvas de calibrado hechas para la Superdex HR-200 y los valores obtenidos quedan reflejados en la tabla 8.

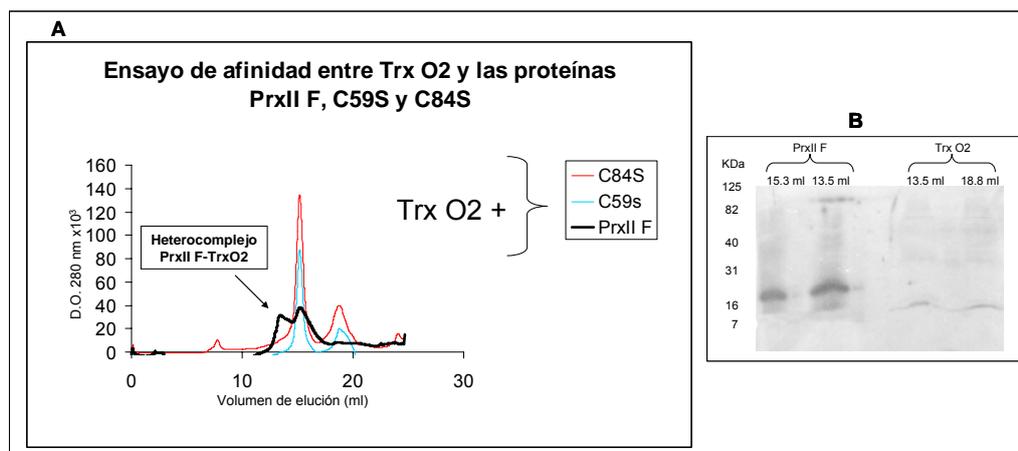


Figura 76. Interacción PrxII F – Trx O2 mediante filtración molecular por columna de Superdex 200. **A.** Cromatograma superpuesto de las tres incubaciones llevadas a cabo de forma independiente entre la Trx y las proteínas PrxIIF, C59S y C84S en negro, azul y rojo respectivamente. **B.** Western-blot del heterocomplejo PrxII F-Trx O2 con anticuerpos frente a la Trx O2.

Tabla 8. Masa y Radio de Stokes del heterocomplejo PrxII F- Trx O2 determinados por filtración molecular en columna Superdex HR-200

Especie	Masa (kDa)	Radio de Stokes (Å)
Complejo Prx-Trx	92.7	38.5

24.2. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O2 MEDIANTE FILTRACIÓN MOLECULAR DE MATRICES MITOCONDRIALES Y POSTERIOR ANÁLISIS POR ELISA

Los resultados de la interacción PrxII F- Trx *in vitro* condujeron a la hipótesis de una posible interacción *in vivo* entre las mismas, hecho que no ha podido ser demostrado hasta nuestros días.

A fin de encontrar una interacción *in vivo* entre la PrxII F y la Trx O2 se hizo un estudio de ELISA con los fraccionados obtenidos al pasar matrices mitocondriales purificadas de hojas de guisante por columna de filtración molecular.

Se aislaron mitocondrias de hojas de guisante de dos semanas de edad siguiendo el protocolo que se detalla en la sección de materiales y métodos. Dichas organelas fueron lisadas mediante sonicación, separándose posteriormente la matriz de las membranas por centrifugación. Las proteínas presentes en la matriz mitocondrial se sometieron a filtración molecular en Superdex HR-200 equilibrada con Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, con y sin DTT, separándose así según tamaño molecular en alícuotas de 200 μ l. Posteriormente los fraccionados con y sin DTT se sometieron a dos ELISA (figura 77), uno con el anticuerpo frente a la Trx O2 y otro frente a la PrxII F.

En el ELISA procedente de las muestras reducidas con DTT llevado a cabo con el anticuerpo frente a la Trx O2 aparecieron dos picos mayoritarios, a 13.5 y 18.8 ml mientras que en el ELISA de la PrxII F se observaron otros dos a 13.5 y 15.3 ml.

En el ELISA procedente de las muestras no reducidas con DTT realizado con el anticuerpo frente a la Trx O2 aparecieron tres picos mayoritarios, a 13.5, 16.6 y 18.8. En el ensayo frente a la PrxII F se observaron picos a 12.9, 13.5 y 15.3 ml.

Sorprendentemente, ambas proteínas presentaron un pico de ELISA en la misma alícuota (13.5 ml) coincidiendo en volumen y tamaño con el heterocomplejo PrxII F-Trx observado en filtración molecular con las proteínas recombinantes purificadas. Los picos de mayor volumen de elución de la Trx O2 y de la PrxII F se correspondían con los observados para las proteínas recombinantes (monómero de Trx O2 a 18.8 ml y dímero de PrxII F a 15.3 ml) en los estudios de filtración molecular.

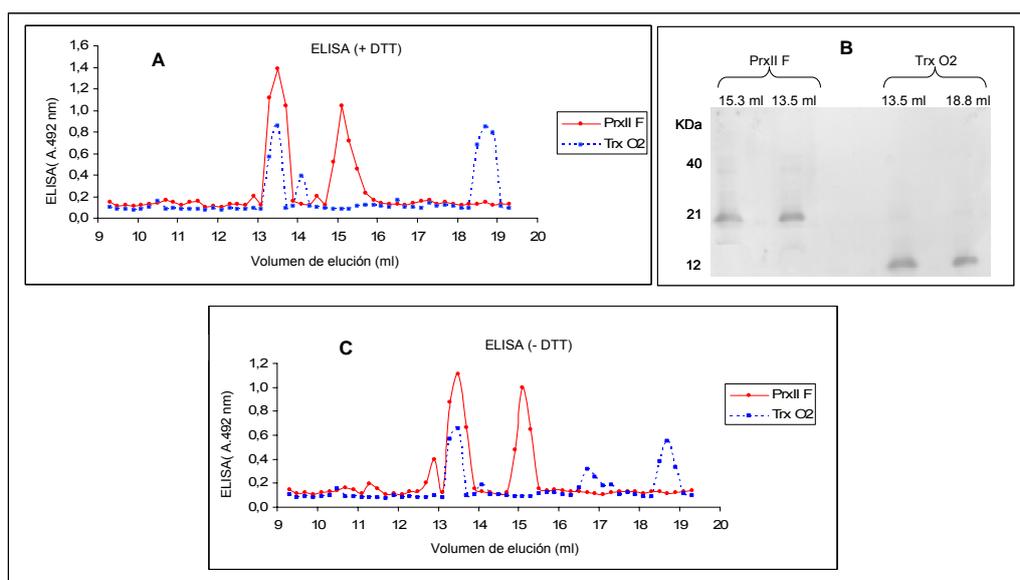


Figura 77. Filtración molecular por columna de Superdex 200 de matrices mitocondriales. **A.** ELISA con los anticuerpos frente a la Trx O2 y PrxII F sobre los fraccionados obtenidos al someter matrices mitocondriales de hojas de guisante a filtración molecular con DTT. **B.** SDS-PAGE-Western blot de los fraccionados que dieron reacción positiva en el ELISA para la PrxII F y Trx O2 con DTT. **C.** ELISA con los anticuerpos frente a la Trx O2 y PrxII F sobre los fraccionados obtenidos al someter matrices mitocondriales de hojas de guisante a filtración molecular sin DTT.

Tal y como se ve en la figura 77.B, en el pico común a ambas enzimas (13.5 ml), el SDS-PAGE-Western blot revela la presencia tanto de PrxII F (previamente tratada con urea 6M a fin de obtener una única banda monomérica) como de Trx O2.

En el pico de mayor volumen de elución de cada proteína también se manifiesta la presencia de Trx O2 o PrxII F, según el caso.

25. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES EN LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MEDIANTE FLUORIMETRÍA

Los cambios conformacionales de una proteína pueden afectar al microambiente que rodea a los grupos triptófano de la misma. Teniendo en cuenta que dichos cambios pueden ser apreciados midiendo la fluorescencia de este aminoácido, podría detectarse si en las proteínas mutantes los espectros de emisión de fluorescencia eran distintos a los de la PrxII F recombinante.

En los experimentos se compararon los espectros de emisión de fluorescencia de la PrxII F, C59S y C84S, a una concentración de 5 μ M, en Tris-HCl 25 mM pH 8, tanto en condiciones normales como tras una hora de oxidación con H₂O₂ 50 mM para poder comparar y asegurar que los posibles cambios observados no se debieran a la formación de puentes disulfuro.

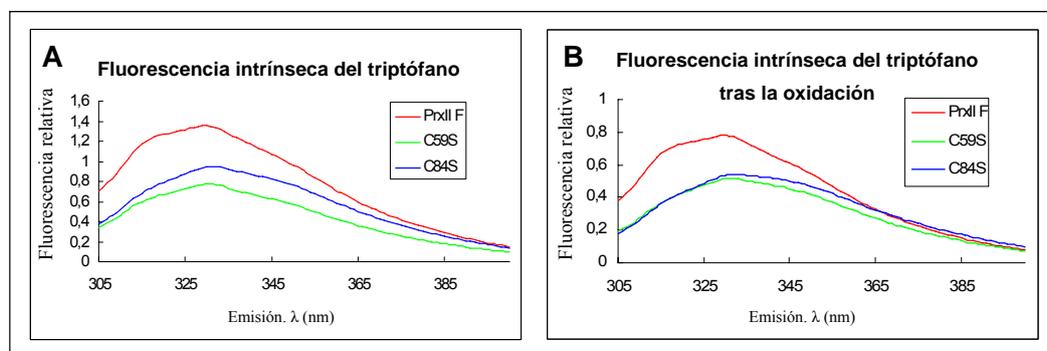


Figura 78. Espectros de fluorescencia intrínseca del triptófano en las proteínas PrxII F, C59S y C84S en el tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, en condiciones normales (A) y tras la oxidación con H₂O₂ 50 mM (B).

En la figura 78 se observa cómo la PrxII F tiene un espectro de emisión distinto al que presentaron cualquiera de los dos mutantes, tanto en condiciones normales como tras la sobreoxidación. En cambio, las proteínas C59S y C84S mantuvieron un espectro bastante similar.

26. CRISTALIZACIÓN DE LA PRXII F RECOMBINANTE DE *P. sativum*

Con objeto de determinar la estructura tridimensional de la PrxII F de guisante se comenzaron a realizar estudios de cristalización de la enzima. El protocolo de purificación desarrollado permite la obtención de proteína recombinante con un alto grado de pureza (figura 79) y en cantidad suficiente para iniciar los intentos de cristalización.

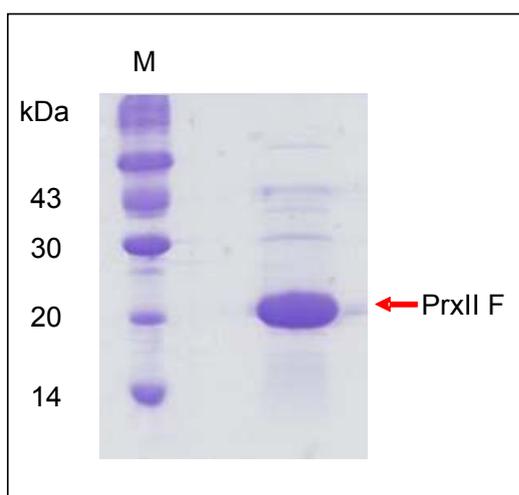


Figura 79. SDS-PAGE electroforesis en condiciones reductoras de la PrxII F purificada para su posterior cristalización.

Tras la optimización, los cristales se obtuvieron utilizando 3 μl de PrxII F 10 mg ml^{-1} en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y 3 μl de solución reservorio (DTT 5 mM, 20% PEG 200 (M/V) y 1 % (V/V) de isopropanol en tampón citrato 100 mM pH 5.6.) equilibrado frente a 500 μl de solución reservorio (figura 80).



Figura 80. Cristales de la PrxII F de guisante observados en presencia de PEG 4000.

Los cristales de PrxII F difractaron a 2.4 Å en un generador de ánodo rotatorio aunque los datos tuvieron que ser recogidos a 2,8 Å. La simetría espacial se estableció dentro del orden P1 con unos parámetros de celdilla unidad de $a = 61,88$, $b = 66,40$, $c = 77,23$ Å , $\alpha = 102,90$, $\beta = 104,40$, $\gamma = 99,07$ °. El calculador de probabilidad de Matthews (Kantarijeff and Rupp, 2003) estimó una V_M de $2,43$ Å³ Da⁻¹ con una probabilidad de 0.87 para corresponder a seis monómeros por celdilla unidad y un contenido de solvente del 49.44%. La simetría y el contenido de la celdilla unidad fue confirmado por reemplazamiento molecular usando un modelo generado por EsyPre3D (Lambertet al., 2002) como modelo de búsqueda ya que la Prx de álamo (código PDB 1tp9) presenta un 36% de identidad con la PrxII F de *P .sativum* (figura 81).

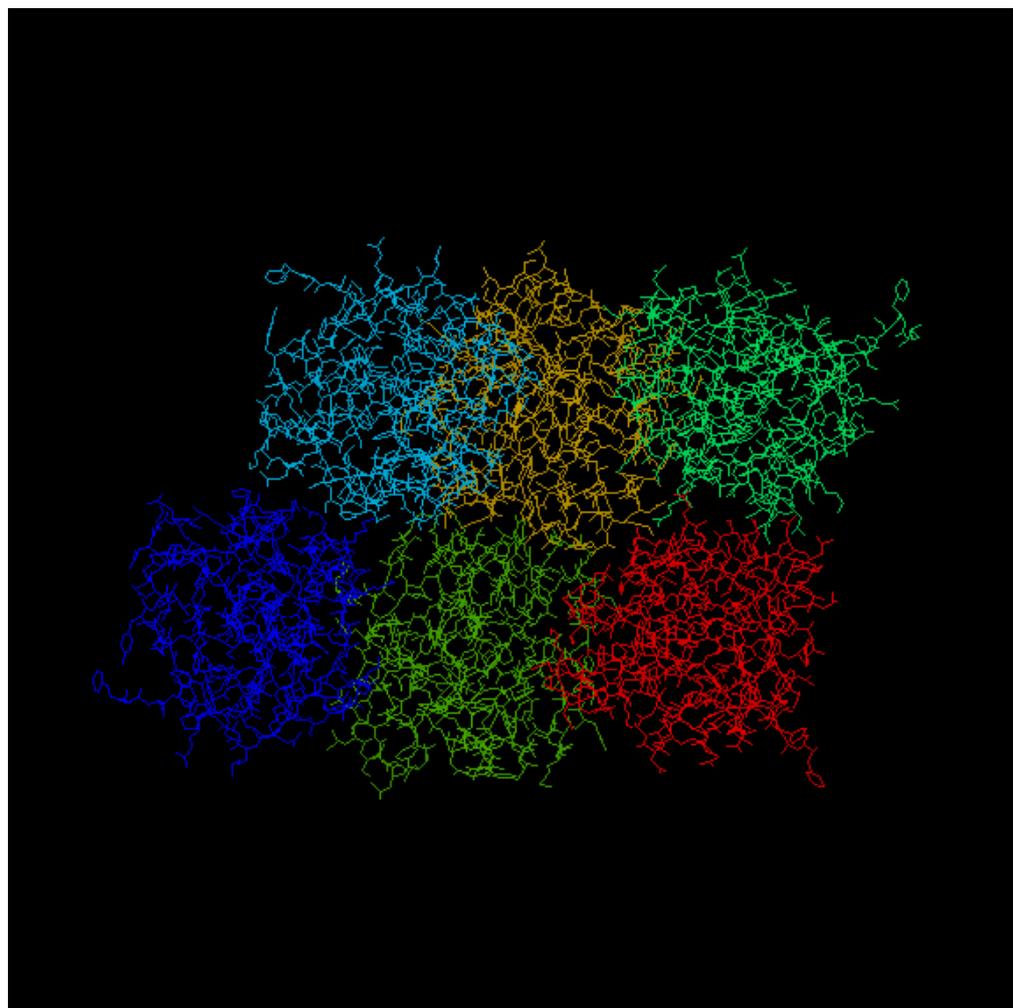


Figura 81. Hexámero de la PrxII F obtenido por difracción de rayos X

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En los últimos años ha generado una atención especial, por sus peculiares características, una nueva familia de enzimas, las Prx, capaces de intervenir en los sistemas de detoxificación de las especies de oxígeno reactivo reduciendo el H₂O₂ y distintos alquilhidroperóxidos. El hecho de que estén presentes en todos los organismos, que no necesiten un cofactor metálico, que sean enzimas bastante resistentes y que presenten una amplia especificidad de sustrato acentúan la importancia de las Prx. A todo esto habría que sumar que están implicadas en procesos tan relevantes como la regulación de factores de transcripción, cáncer, apoptosis, etc.

En vegetales superiores una de las enzimas pertenecientes a esta familia, la PrxII F, se localiza en la mitocondria donde parece estar involucrada en procesos de gran importancia como la protección del DNA mitocondrial, la detoxificación de H₂O₂ y en procesos de señalización celular. Además se le ha atribuido un papel fundamental en la resistencia del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* frente a estrés por Cd. Aunque se ha avanzado notablemente en el conocimiento de estas enzimas aún quedan muchas cuestiones sin resolver. El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral supone el primer estudio sobre la caracterización de la enzima PrxII F de *P. sativum*. Dicho estudio supone un avance en el conocimiento de estas enzimas, a nivel de su funcionamiento, estructura, oligomerización y regulación.

1. AISLAMIENTO DEL cDNA QUE CODIFICA LA PRXII F DE *P. sativum* Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

La disponibilidad en las bases de datos de secuencias correspondientes a PrxII F de diversos organismos así como la presencia de dominios peptídicos altamente conservados en estas secuencias nos permitió el diseño de oligos heterólogos para la obtención del cDNA que codifica la PrxII F de *P. sativum* mediante PCR. Se obtuvo

inicialmente parte de esta secuencia que permitió el diseño de nuevos oligos, ya 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 *P. sativum* que codificaba una PrxII F.

En el extremo 3' se encontraron dos sitios de poliadenilación distintos que diferían en unas 95 pb. Este hecho es bastante frecuente en genes vegetales (Dean *et al.*, 1986; Chan *et al.*, 1998; Magnotta and Gogarten, 2002) y, aunque la función de la presencia de distintos sitios de poliadenilación no está clara, pueden afectar a la eficiencia traduccional y a la estabilidad del mRNA constituyendo un mecanismo de regulación génica en plantas (Gallie., 1993; Tanguay and Gallie, 1996; Chan *et al.*, 1998; Magnotta and Gogarten, 2002). Para las PrxII F mitocondriales de vegetales no se ha descrito esta propiedad hasta la fecha. Sin embargo se ha visto mediante *Northern-blot* la existencia de dos transcritos de la Prx de 2-Cys en espinaca, *Helianthus annuus*, varias monocotiledóneas (Baier and Dietz, 1996a) y en *Phaseolus vulgaris* (Genot *et al.*, 2001). En todos los casos la diferencia entre ambos transcritos oscila entre unas 200 y 300 pb. En el caso de *Phaseolus vulgaris* (Genot *et al.*, 2001) se ha descrito, además, que los dos transcritos presentan un patrón de expresión distinto en los diferentes órganos de la planta así como una diferente respuesta al estrés oxidativo producido por metales pesados. Aunque en un principio se ha considerado que ambos transcritos pueden provenir de un “*splicing*” incompleto o ser dos genes diferentes, puede ser que estos transcritos correspondan a dos regiones 3'UTR distintas como las que hemos encontrado en la PrxII F de *P. sativum*. La presencia de elementos reguladores en el extremo 3' de la PrxII F puede que constituya un mecanismo por el cual esta proteína es regulada post-transcripcionalmente y abre una puerta para estudios de regulación de estas proteínas en respuesta a distintos factores que debería ser abordada en el futuro.

La pauta abierta de lectura del gen de la *PrxII F* con 597 pb codifica una proteína de 199 aminoácidos que mostraba una identidad del 74% con la *PrxII F* de *Arabidopsis thaliana*. Esta elevada identidad nucleotídica, mucho mayor a nivel aminoacídico, junto con otras características han permitido enmarcar nuestra enzima como *Prx* de tipo II F. La proteína contiene en su extremo amino un péptido señal mitocondrial de 28 aminoácidos que al ser escindido dará lugar a la obtención de una proteína madura compuesta por 171 aminoácidos con un punto isoelectrico de 5.92, la cual es similar en tamaño y pI a otras *PrxII F* conocidas. Efectivamente, este péptido señal presenta todas las características típicas de los péptidos señales mitocondriales: de 20 a 50 residuos, argininas y lisinas por un lado y aminoácidos hidrofóbicos por otro. Los programas de predicción de localización subcelular y de péptidos señales así lo corroboran, por lo que la proteína se produce de forma inmadura y posteriormente es importada y procesada en la mitocondria donde da lugar a la forma madura de la enzima.

La *PrxII F* de *P. sativum* presenta las dos cisteínas características de este grupo de enzimas, peroxidática y resolutora, que se encuentran separadas por 24 aminoácidos; asimismo contiene dos motivos altamente conservados alrededor de estas dos cisteínas: -IFGLPGAYTGVCS- y -DSVICV-. También posee dos aminoácidos conservados en las *Prx*, la treonina 56 y la arginina 134 (numeración de la *PrxII F* madura). Los estudios cristalográficos de la *PrxII* de álamo mostraron la relación existente entre estos dos aminoácidos y la Cys-59 catalítica hablándose de una triada catalítica en el centro activo (Wood *et al.*, 2003b; Rouhier *et al.*, 2004a; Echalié *et al.*, 2005). Los residuos de Thr y Arg parecen tener un papel crucial incrementando la reactividad de la cisteína catalítica al estabilizar la forma tiolato de la cisteína, quizás por disminución de su pKa. Igualmente el Triptófano 96 es otro residuo bastante conservado y descrito en varias estructuras cristalográficas (Flohé *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2004a). En este sentido, cabe esperar que la presencia de estos aa conservados también presentes en la *PrxII F* desempeñen la misma función formando parte de la triada catalítica de la enzima.

2. AISLAMIENTO DEL PROMOTOR Y DE LA REGIÓN INTRÓNICA-EXÓNICA DE LA PRXII F DE *P. sativum*

El aislamiento de la región promotora del gen de la *PrxII F* se llevó a cabo mediante PCR Walking. Mediante esta técnica se pudo aislar una secuencia de 1755 pares de bases. En ningún punto de la secuencia se encontró la presencia de cajas “TATA” al igual que ocurre en el promotor de *Arabidopsis thaliana* que consta de 2610 pb. Sin embargo, análisis bioinformáticos realizados con el programa Genomatix-MatInspector y PLACE apuntan a la existencia de hasta 150 cajas reguladoras, muchas de ellas comunes para *Arabidopsis* y guisante, de significado biológico muy variado aún por estudiar.

El conocimiento de la región promotora permitirá en trabajos venideros el estudio de la localización tisular de la *PrxII F* de *P. sativum* mediante la obtención de plantas transgénicas transfectadas con construcciones del tipo GUS-promotor. Así mismo se avista la búsqueda de factores de transcripción que se unan a la región promotora de la enzima. Estos trabajos supondrían un avance significativo en la regulación transcripcional de las Prx vegetales, pues son pocos los datos que de este tipo de estudios se revelan en la literatura actual.

Los genes que codifican una proteína en cuestión tienen exones e intrones. Estos últimos han de ser eliminados en el proceso de maduración del mRNA para así poder ser traducido y dar lugar a una proteína. Como el genoma de *P. sativum* no se encuentra secuenciado en la actualidad, el cDNA de la *PrxII F* tuvo que ser aislado a partir del RNA por lo que se seguía sin conocer la secuencia del gen de la *PrxII F*. Se consideró que el conocimiento del gen de nuestra enzima nos podría servir para compararlo con los de otras *PrxII F* presentes en la base de datos y así poder establecer una homología entre ellas que determinara una cercanía o lejanía evolutiva. La región intrónica-exónica de la *PrxII F* fue aislada por PCR a partir de gDNA de *P. sativum* con cebadores específicos que amplificaban la región ORF de la enzima. La

secuenciación del producto de PCR de 1435 bases contenía 4 intrones posicionados entre los 5 exones del gen de la *PrxII F*, distribución que se reproducía para el mismo gen en *Arabidopsis thaliana*. El estudio comparativo entre las regiones exónicas-intrónicas del gen de la *PrxII F* en *Arabidopsis thaliana* y *P. sativum* queda reflejado en la figura 82. Los genes de ambas proteínas presentan una alta homología entre ellos, hasta el punto de coincidir tanto en el número de aminoácidos de cada exón (excepto en el primero de ellos donde hay una diferencia de dos aminoácidos) como en los sitios para el corte y empalme; en éste sentido, puede observarse cómo los exones de ambas proteínas comienzan y terminan por los mismos aminoácidos. Esta alta conservación a nivel del “*splicing alternativo*” de los ácidos nucleicos indica la cercanía evolutiva de las *PrxII F* de *Arabidopsis thaliana* y *P. sativum* y es además un punto de apoyo a la hora de enmarcar a la *PrxII F* de *P. sativum* dentro del tipo de las *Prx* tipo II mitocondriales vegetales.

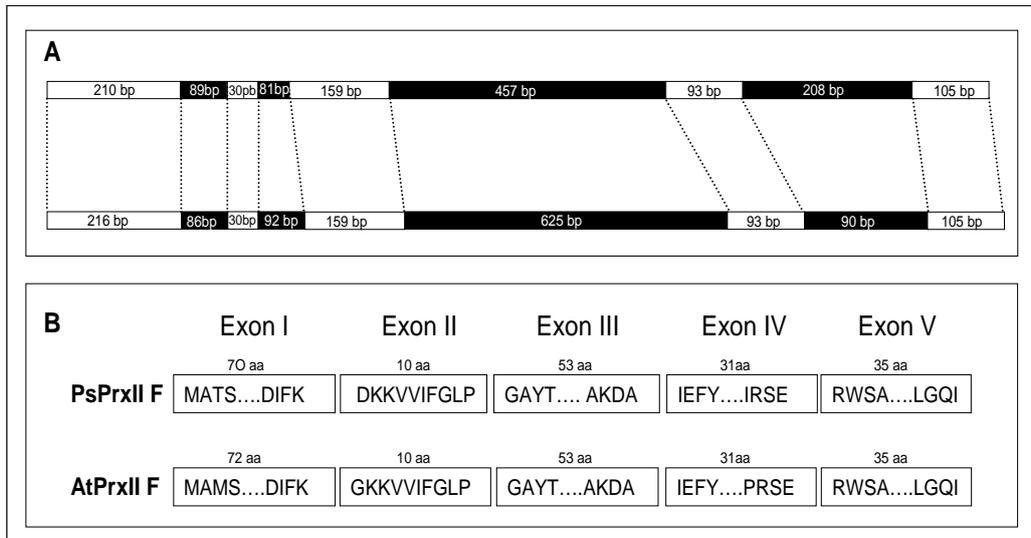


Figura 82. Esquema comparativo de la distribución de los intrones y los exones de la PrxII F de *P. sativum* (*PsPrxIIF*) y *Arabidopsis thaliana* (*AtPrxII F*).

(A) Disposición de las bases nucleotídicas de los intrones y exones. En negro se disponen los intrones, en blanco los exones. (B) Representación de la homología de los exones de las zonas de corte próximas al *Splecing alternativo*.

3. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PRXII F RECOMBINANTE MADURA Y MUTANTES C59S Y C84S

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. En concreto los sistemas de expresión basados en la transcripción por parte de la enzima T7-RNA polimerasa se han extendido ampliamente en los últimos años precisamente por las buenas expresiones que resultan de su uso.

Utilizando el sistema pET (Studier and Moffatt., 1986), la PrxII F madura de *P. sativum* así como las proteínas mutantes C59S o C84S alcanzaron unos niveles de expresión en los extractos crudos solubles de las bacterias entre el 40-50% del total. En algunos casos se ha descrito que la sobreexpresión de proteínas recombinantes resulta tóxica para las bacterias y que no se sobreexpresan adecuadamente o son englobadas en cuerpos de inclusión. Este no es el caso de la PrxII F madura o de sus variantes mutantes, ya que en un principio sus sobreexpresiones no parecen resultar perjudiciales, aunque ciertamente, el hecho de realizar la sobreexpresión a 37°C durante 6 horas llegó a producir en ocasiones la precipitación de la proteína; en estos casos se realizó una sobreexpresión a 28-30°C durante 12 horas.

El protocolo de purificación desarrollado consta de dos pasos cromatográficos precedidos de una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entre el 40 y el 95% que se realizó para eliminar los contaminantes de mayor peso molecular. El primer paso cromatográfico consiste en una separación por filtración molecular con el fin de eliminar las proteínas contaminantes de mayor y menor peso molecular, así como la posible contaminación por DNA bacteriano que pudiera haber presente. La proteína eluye principalmente en una zona correspondiente a una masa molecular de unos 48 kDa, lo cual es lógico ya que aunque el peso molecular teórico para la PrxII F madura de *P. sativum* es de unos 18.5 kDa, se ha visto que las Prx de tipo II existen funcionalmente como homodímeros.

Después de la filtración molecular la muestra se sometió a una cromatografía de tipo hidrofóbico para mejorar su estado de pureza. En este tipo de columnas la interacción proteína – matriz ocurre mediante fuerzas hidrofóbicas que en caso de la PrxII F fueron tan fuertes que ésta quedó fuertemente retenida en la columna Fenil-Superosa sin que pudiera eluir pese a disminuir la fuerza iónica hasta 0 M en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La elución de la PrxII F sólo fue posible haciendo pasar una disolución de urea 6 M a través de la columna Fenil-Superosa. Este hecho apunta a que la PrxII F presenta un grado de hidrofobicidad elevado que la podría hacer interaccionar con

otras proteínas o consigo misma para formar complejos de mayor tamaño. Observaciones similares han sido ampliamente demostradas para las Prx de 2-Cys de vegetales en las que se forman decámeros (Schröder *et al.*, 2000; Alphey *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2002, 2003b) donde las interacciones dímero-dímero que tienen lugar para la formación del complejo son principalmente hidrofóbicas (Alphey *et al.*, 2000; König *et al.*, 2002; Schröder *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2003b). Igualmente, el carácter hidrofóbico de la interfase monómero – monómero para constituir una entidad dimérica ha sido evidenciado en la Prx D tipo II de álamo (Echalier *et al.*, 2005).

Al no poder utilizar la cromatografía hidrofóbica en el proceso de purificación se optó por una cromatografía de intercambio aniónico. En principio cuanto mayor fuese el valor de pH para el desarrollo de esta cromatografía la proteína se encontraría con una mayor carga e interaccionaría mejor con la columna. Como se vio que la proteína quedaba retenida en la cromatografía a un pH de 8.0, eluyendo a una concentración de 0.2 M de NaCl y obteniéndose una buena separación, se mantuvo el pH al mismo valor que previamente para simplificar el protocolo de purificación.

4. AISLAMIENTO DE UNA TRX MITOCONDRIAL DE *P. sativum*

Se consideró que sería interesante estudiar la PrxII F de forma conjunta con su correspondiente donador fisiológico de electrones mitocondrial en *P. sativum*. Así, se procedió al aislamiento del gen correspondiente de la *Trx O2* de *P. sativum*. Para ello se obtuvo el cDNA que la codifica mediante PCR basándonos en la homología que podría existir entre las *Trx O2* de *A. thaliana* y *P. sativum*.

La secuenciación del producto obtenido reveló la existencia de una pauta abierta de lectura en el mRNA de *P. sativum* que codificaba una Trx con gran homología a la *Trx O2* mitocondrial de *A. thaliana* que se había utilizado como base

para obtener la secuencia. El alineamiento nucleotídico de las Trx O2 de *P. sativum* y *A. thaliana* muestra una identidad del 67.9%. Este gran parecido nos permite asemejar nuestra proteína a la de *A. thaliana* y presumir además una localización subcelular similar. La proteína consta de 181 aa y presenta las dos cisteínas características de este grupo de las Trx, separadas por tan sólo 2 aa, así como los motivos conservados alrededor de ellas. Como todas las Trx, posee un centro activo también altamente conservado WCGPC. La escisión del péptido señal mitocondrial de 70 aa daría lugar a una Trx madura más pequeña de unos 12.5 KDa que se corresponde con el tamaño típico de este tipo de enzimas.

Los aminoácidos conservados ya fueron estudiados por Eklund, Gleason y Holmgren quienes analizaron, además, el posible papel que cumple cada uno de ellos en la estructura-función de las tiorredoxinas (Eklund *et al.*, 1991). Por analogía entre las Trx se podría asumir un papel similar de estos aminoácidos en la Trx O2. La glicina y la prolina entre las dos cisteínas contribuyen a mantener una conformación característica del centro activo, principal responsable del elevado potencial reductor de la tiorredoxina. El triptófano 102 (numeración de la proteína con su péptido de tránsito) se encuentra muy expuesto al medio y debe influir también en la conformación del centro activo. Este triptófano se encuentra en interacción mediante un puente de hidrógeno con el aspártico 131, que también está ampliamente conservado. La secuencia -PT- situada en las posiciones 148 y 149 también está muy conservada. Estos aminoácidos se encuentran en interacción directa con el centro catalítico y deben contribuir a la estabilidad de la molécula oxidada. Por último, el papel de la prolina 111 y de las dos glicinas, 156 y 164, es estructural. La prolina 111 provoca un doblamiento en la larga hélice α_2 , contribuyendo a mantener la conformación del centro activo, que se encuentra al comienzo de esta hélice (Lamotte-Guery *et al.*, 1997). Las dos glicinas se encuentran en sendos giros entre elementos estructurales, donde contribuyen por su pequeño volumen a mantener la estructura cerrada de estos giros. La glicina 84 separa las hojas β_4 y β_5 , mientras que la glicina 92 separa la hoja β_5 de la hélice α_4 .

La información obtenida de la secuencia peptídica mediante el uso de programas bioinformáticos predice una localización mitocondrial de la Trx O2 de *P. sativum*. Además, las Trx O2 vegetales presentan una localización mitocondrial según se encuentra descrito en la literatura aunque son pocos los estudio que han abordado este tipo de Prx en vegetales (Laloi *et al.*, 2001). Estos análisis nos hacen, en principio, atribuir una localización subcelular mitocondrial para la Trx O2.

5. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA TRX O2 RECOMBINANTE

Como en el caso de la PrxII F, utilizamos el sistema pET (Studier and Moffatt., 1986) para la sobreexpresión de la Trx O2 recombinante. Con este sistema se alcanzaron unos niveles de expresión de la proteína recombinante en los extractos crudos solubles de las bacterias entre el 40-50% del total. La sobreexpresión de la Trx O2 de *P. sativum* no resulta perjudicial para las bacterias, produciéndose en forma soluble.

El protocolo de purificación desarrollado consta de un paso cromatográfico en Sephacryl S 200 precedido de un calentamiento (80°C durante cinco minutos) y una precipitación con (NH₄)₂SO₄ entre el 40 y el 90% que se realizó para eliminar los contaminantes de mayor peso molecular. El hecho de que la Trx O2 estuviera en la fracción soluble tras el calentamiento indica la gran estabilidad térmica de esta enzima, característica propia de muchas otras Trx.

El paso cromatográfico consiste en una separación por filtración molecular con el fin de eliminar las proteínas contaminantes de mayor y menor peso molecular, así como la posible contaminación por DNA bacteriano que pudiera haber presente. La proteína eluye principalmente en una zona correspondiente a una masa molecular de unos 9 kDa que se corresponde aproximadamente con el peso molecular teórico para la Prx de tipo II de *P. sativum*.

6. ESTADOS DE OLIGOMERIZACIÓN DE LA PRXII F DE *P. Sativum*

Para determinar los tamaños moleculares de la PrxII F y sus variantes C59S y C84S se utilizaron técnicas de cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex HR-200.

Al realizar las cromatografías se observó que para la PrxII F y proteínas mutantes C59S y C84S aparecía un pico correspondiente en tamaño a unos 39 kDa que podría ser un dímero de la proteína. Sólo en las proteínas PrxII F y C84S aparecía además otro pico, al que le corresponde un tamaño de aproximadamente 119 kDa y que se asemeja a un hexámero. En ninguno de los casos pudo observarse la proteína monomérica en solución lo que apunta a que en condiciones fisiológicas estas enzimas se encuentren asociadas, sin que ello implique una interrelación de las subunidades en el mecanismo de acción. Como la proteína mutante C59S carece de la cisteína 59 y sólo puede formar dímeros, se deduce que la presencia de esta cisteína es esencial para la formación de hexámeros, bien sea por la implicación directa de puentes disulfuro entre las subunidades o bien por el cambio conformacional que pudiera implicar la pérdida de este aminoácido.

La electroforesis SDS-PAGE y el Western- blot del pico del hexámero de la PrxII F mostró una única banda en torno a 20 kDa en presencia de DTT, pero sin DTT aparecieron cuatro bandas principales: dos aproximadamente a 40 kDa y otras dos en torno a 20 kDa.

El hexámero del mutante C84S tenía un comportamiento diferente en la electroforesis sin DTT; sólo aparecieron dos bandas, una a 20 kDa y otra a 40 kDa. Esta última banda se corresponde en altura con la banda de menor movilidad de las dos que aparecían en el hexámero de la PrxII F.

La electroforesis SDS-PAGE sin DTT del dímero del mutante C59S mostró dos bandas: una a 40 KDa que se corresponde con la banda de mayor movilidad de las dos que aparecían en el hexámero de la PrxII F y otra banda en torno a 20 KDa. Las bandas en torno a 40 KDa en ausencia de DTT probablemente se corresponden a dímeros por puentes disulfuro intermoleculares entre las Cys 59 (las de menor movilidad, que también aparece en el dímero del mutante C84S que carece de Cys 84) y entre las cisteínas 84 de dos monómeros (las de mayor movilidad, que también aparecen en el dímero del mutante C59S). Como ambos mutantes sólo poseen una cisteína, sólo existe la posibilidad de que formen puentes disulfuro intermoleculares, bien entre Cys59-Cys59 o bien Cys-84-Cys84.

Las dos bandas en torno a 20 KDa del hexámero de la PrxII F sin DTT deben ser monómeros con y sin puente intramolecular entre la Cys59 y Cys84. En el estado oxidado podría formar una molécula más compacta con una mayor movilidad en la electroforesis que la proteína en su estado reducido (Chae *et al.*, 1994c). Sin embargo, los niveles de proteína que aparecen en las bandas monoméricas es pequeño en comparación con la cantidad de proteína observada en las bandas diméricas. Como era de esperar, sólo un monómero apareció en las electroforesis sin DTT de las proteínas mutantes C59S y C84S, ya que al no poder formar puente disulfuro intramolecular se presentan como la banda de menor movilidad.

Además de las cuatro bandas de la electroforesis del hexámero de la PrxII F sin DTT, otras bandas de menor intensidad aparecieron tanto en las electroforesis como en el Western blot a una mayor tamaño molecular (en torno a 60 kDa y por encima de 100 kDa). Se piensa que estas bandas de mayor tamaño molecular probablemente sean polímeros de la PrxII F, en concreto trímeros y hexámeros de la PrxII F. Estos resultados son comparables con los obtenidos en mitocondrias de hojas y raíces de *P. sativum*. El Western-blot de la electroforesis SDS-PAGE reductora de las mitocondrias de hojas reveló cuatro bandas correspondientes en tamaño a las formas de monómero, dímero, trímero y hexámero de la PrxII F nativa que se

corresponden con las obtenidas para la proteína recombinante. En raíces aparecieron sólo dos bandas, monómero y probablemente trímero. La ausencia de DTT no alteró este comportamiento electroforético de la PrxII F de hojas o raíces. Sólo con urea 6M todas las bandas se disociaron a la forma monomérica. Por tanto, existe un paralelismo en el comportamiento de la PrxII F recombinante purificada y la PrxII F nativa de mitocondrias de hoja de guisante. Sin embargo, la fuerza de unión entre los monómeros parece mucho mayor en el caso de la PrxII F salvaje que en la recombinante pues sólo la acción de un potente agente desnaturante como la urea fue capaz de romper la unión entre los monómeros. La presencia de las bandas obtenidas en Western blot de hojas y raíces para la PrxII F también podría entenderse como unión de esta enzima a otras proteínas mitocondriales dando lugar a la formación de heterocomplejos de mayor tamaño molecular. Es en este trabajo donde se describen por primera vez estructuras oligoméricas superiores al dímero para una Prx tipo II. Este hecho no es de extrañar en las Prx; no en balde se han descrito diferentes asociaciones decaméricas toroidales para las Prx de 2-Cys. Otro estudio cristalográfico con la Prx AhpC en estado oxidado de *Mycobacterium tuberculosis*, perteneciente al grupo de las Prx de 2-Cys, describe una estructura toroidal formada por unión de seis dímeros (Guimaraes *et al.*, 2005).

Adicionalmente, la evidencia ya comentada de que la PrxII F recombinante era fuertemente retenida en la columna Phenyl Superosa, y que sólo el uso de urea 6 M permitió su elución, muestra el gran carácter hidrofóbico de esta enzima y podría explicar la presencia de oligómeros en geles SDS-PAGE reductores.

Cuando la PrxII F recombinante y los mutantes se cromatografiaron en Superdex HR-200 en presencia de DTT sólo aparecieron dímeros. Este hecho indica que para formar hexámeros es necesario que la PrxII F esté al menos parcialmente oxidada y, como se ha dicho anteriormente, que posea la Cys59.

De acuerdo con este resultado, la PrxII F oxidada con H₂O₂ durante una hora y cromatografiada a través de Superdex HR-200 aparecía mayoritariamente como hexámero mientras que tan sólo una pequeña cantidad de dímero quedaba remanente. En sentido contrario, cuando el pico hexamérico era recromatografiado por la misma columna en presencia de DTT sólo aparecían dímeros. El hecho de que la PrxII F oligomerice en condiciones de oxidación podría ser interpretado como un mecanismo de reciclaje o una señal reguladora.

Todos estos ensayos concluyen en que el equilibrio dímero – hexámero de la PrxII F recombinante está controlado por el estado redox del medio. En definitiva los hexámeros de la PrxII F recombinante están ensamblados por puentes disulfuro ya que la adición de un agente reductor (DTT o mercaptoetanol) provoca la rotura del homopolímero hasta dímeros. Además se ha probado cómo en el hexámero hay puentes disulfuro entre las subunidades atendiendo a la aparición de bandas diméricas en las electroforesis y Western-blot sin DTT que desaparecen totalmente para formar bandas monoméricas bajo condiciones reductoras. Probablemente la unión entre monómeros para formar un dímero está regida por puentes disulfuro. Así el hexámero podría estar formado por tres dímeros covalentes unidos entre sí por interacciones mayoritariamente hidrofóbicas.

El que ambas cisteínas de la PrxII F se encuentren expuestas al solvente, tal y como se ha observado en la valoración de los grupos SH, podría favorecer la formación de dímeros covalentes para ensamblar finalmente un hexámero.

Este oligómero de PrxII F podría imitar la estructura toroidal del decámero de la Prx de 2-Cys (Bernier-Villamor *et al.*, 2004). Sin embargo, y a diferencia de la PrxII F de guisante, la oligomerización de las Prx de 2-Cys está estabilizada por DTT (König *et al.*, 2002; Bernier-Villamor *et al.*, 2004). Sorprendentemente la Prx de 2-Cys reducida no da lugar a la aparición del monómero, sino que estabiliza la forma decamérica. Esto puede ser debido a que la interacción monómero-monómero, en el

estado reducido, puede encontrarse estabilizada por puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas (Alphey *et al.*, 2000). Probablemente el puente disulfuro entre la Cys peroxidática de una subunidad y la Cys resolutora de la otra subunidad que forma el dímero proporciona una rigidez a la molécula dimérica impidiendo su unión con otros dímeros para formar el decámero. La reducción de los puentes disulfuro puede producir un cambio conformacional en la estructura dimérica facilitando la interacción dímero-dímero. En el estado oxidado, sin embargo, la fuerza iónica para formar el decámero tiene que ser mayor para poder vencer la rigidez de los puentes disulfuro.

El efecto que produce el pH y la fuerza salina sobre la oligomerización de la PrxII F recombinante ha sido ampliamente estudiado en esta tesis doctoral.

Ninguna de las combinaciones de pH en tampón fosfato modificó los niveles relativos de dímero-hexámero de la PrxII F. De los distintos pH con los que se trabajó en TRIS-Cl, sólo a pH 8.9 se produjeron cambios en el estado de oligomerización en la PrxII F manifestados en forma de un aumento en los niveles relativos de la forma dimérica en detrimento del hexámero. A fin de llevar el pH hasta zonas aún más básicas se utilizó el tampón carbonato-bicarbonato pH 9.9; en este caso, tanto la PrxII F como el mutante C84S sufrieron un desplazamiento casi total hacia la forma de dímero. La diferencia de comportamiento oligomérico entre los pH más ácidos y los más básicos indica la presencia de uno o varios grupos que se cargan en estos intervalos de pH y afecta a la oligomerización facilitando en estado protonado la formación del hexámero. Esto podría tener importancia fisiológica ya que el pH de la matriz mitocondrial durante el transporte electrónico puede alcanzar valores de 8.5. Este comportamiento en función del pH es similar a la transición dímero-decámero observada para las Prx de 2-Cys, aunque a menores pH (entre 7.5 y 8.0) (Bernier-Villamor *et al.*, 2004).

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre la oligomerización se realizaron varios pases cromatográficos con tampón Tris-Cl pH 8 a las concentraciones de 150 mM, 1 M o 2 M de NaCl. En ninguno de ellos la fuerza iónica afectó a los niveles relativos de los oligómeros por lo que en principio este factor no tiene un papel crucial en la oligomerización de la PrxII F. Estos resultados no coinciden con los descritos para varias Prx de 2-Cys donde la fuerza iónica ejerce un efecto positivo sobre la formación del decámero. En este grupo de Prx, conforme incrementa la fuerza iónica el decámero aparece en mayor proporción a medida que el dímero disminuye, confirmando así que las interacciones dímero-dímero que tienen lugar para la formación del decámero son principalmente de tipo hidrofóbico (König *et al.*, 2002; Bernier-Villamor *et al.*, 2004).

7. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI PRXII F Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PRXII F DE *P. sativum*

Para probar la eficiencia de nuestros anticuerpos y la afinidad de los mismos por la proteína ante la que se prepararon se procedió a estudiar la interacción PrxII F – anticuerpo anti PrxII F mediante microcalorimetría. Para ello se valoraron los sueros pre-inmune e inmune. Los picos obtenidos de la valoración del suero pre-inmune mostraron que no existía reconocimiento o interacción entre éste y la PrxII F. Además estos datos son consistentes con la ausencia de bandas en los ensayos de Western blot de la proteína frente al suero pre-inmune. Este resultado avala la conclusión de que las bandas observadas en los Western- blot con los anticuerpos anti PrxII F indican una interacción específica entre la proteína y los anticuerpos. Otro aval de especificidad de los anticuerpos usados es la ausencia de bandas en los Western-blot realizados sobre plantas de *Arabidopsis thaliana* K.O. para la PrxII F

Las PrxII F en vegetales superiores son proteínas de codificación nuclear, pero se localizan en la mitocondria (Finkemeier *et al.*, 2005; Dietz *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia aminoacídica mediante programas informáticos de predicción de péptidos señales y localización subcelular daba una alta probabilidad de que la PrxII F de *P. sativum* fuera una proteína mitocondrial. Para confirmar dicha localización mitocondrial con una técnica que resultara altamente sensible y eficaz se llevó a cabo el inmunomarcaje con oro coloidal, seguido de visualización por microscopía electrónica. Esta técnica ha sido utilizada con éxito en estudios de localización de otras PrxII F mitocondrial (Finkemeier *et al.*, 2005).

En el caso de la PrxII F de *P. sativum* hemos comprobado mediante inmunocitoquímica que, efectivamente, la proteína es mitocondrial, si bien aparecen algunas partículas de oro en el citosol que probablemente correspondan al precursor de la proteína antes de su paso a la mitocondria. Dentro de la mitocondria se localiza preferentemente en la matriz como se ha demostrado en los Western-blot realizados sobre matrices y membranas mitocondriales. Estos datos coinciden y corroboran fidedignamente los resultados publicados por Finkemeier *et al.*, (2005) para la PrxII F de *Arabidopsis thaliana*. Quizás esta localización preferentemente matricial de las PrxII F sea otra de las diferencias con otras Prx de vegetales en las que gran parte de la enzima se asocia a la membrana tilacoidal (König *et al.*, 2002, Lankemeyer *et al.*, 2006) postulando que esta unión sea un posible mecanismo de regulación de la enzima que actuaría en la membrana tilacoidal como un sensor estructural redox (König *et al.*, 2003).

En virtud a esta localización mitocondrial, la PrxII F de *P. sativum* desarrollaría funciones similares a las de otras Prx con esa misma localización como son la Prx de 2-Cys (PRDX3) y Prx tipo II (PRXD5) humanas, la Prx de 1-Cys de levadura y la PrxII F de *Arabidopsis*.

8. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA PRXII F DE *P. sativum*

Para estudiar este papel en la PrxII F de *P. sativum* procedimos a realizar un análisis exhaustivo de las propiedades catalíticas de la enzima.

Las Prx son enzimas que presentan una amplia especificidad de sustrato, reduciendo tanto H₂O₂, como alquilhidroperóxidos y peroxinitritos. En este trabajo de tesis se ha estudiado la capacidad que la PrxII F de *Pisum sativum* presenta para detoxificar el H₂O₂.

Rouhier *et al.*, (2002) propusieron un mecanismo de acción para la Prx tipo II de álamo en el que sólo el residuo de cisteína más cercano al extremo N-terminal de esta enzima estaba implicado en la catálisis. Sugerían que la cisteína posicionada en la región C-terminal desempeñaba un papel en la especificidad del reconocimiento del donador de electrones. Para verificar si la PrxII F de guisante operaba por este mismo mecanismo, se generaron dos proteínas mutantes, C59S y C84S que carecían de las cisteínas N-terminal y C-terminal respectivamente. La conversión del H₂O₂ hasta agua catalizada por la PrxII F fue estudiada utilizando DTT como donador de electrones.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Rouhier *et al.*,(2002) tanto en cuanto la proteína mutante C59S era incapaz de reducir el H₂O₂ mientras que el mutante C84S mantenía en torno a un 30% de la actividad en comparación con la PrxII F. Estos datos avalan la teoría de que la Cys-59 es la que realmente interviene en la catálisis. El descenso de la actividad observado en el mutante C84S puede estar relacionado con una modificación en el microambiente de la proteína causado por el reemplazo de la Cys-84 hasta serina. En cualquier caso, la procedencia de esta actividad residual está aún por aclarar.

Los ensayos de especificidad de sustrato de las Prx tipo II realizados hasta el momento muestran cómo estas enzimas pueden catalizar la reducción de gran variedad

de sustratos como peróxido de hidrógeno, cumen hidroperóxido, ácido linoleico, hidroperóxido de fosfatidilcolina etc (Rouhier *et al.*, 2005, Fikemeier *et al.*, 2005). Aunque en el desarrollo de esta tesis no se hayan analizado todas estas moléculas como sustratos para la PrxII F se aventura, en virtud a la similitud existente entre estas enzimas, que tal reducción pueda llevarse a cabo. Igualmente se intuye que la PrxII F pueda utilizar como donadores electrónicos la glutarredoxina, Trx, glutatión y el DTT usado en nuestros ensayos.

La reducción de los alquilhidroperóxidos es un proceso que puede tener implicaciones biológicas importantes pues éstos pueden intervenir en la síntesis de moléculas señales incluyendo el ácido jasmónico que tiene funciones en el desarrollo vegetal y en procesos de adaptación a estrés (Feussner y Wasternack., 2002) por lo que es posible que la PrxII F intervenga regulando estas rutas de señalización, pero para confirmar esta hipótesis serán necesarios futuros estudios. Además, la PrxII F puede que también actúe como sensor de peróxidos, debido a su alta afinidad por éstos. A través de la unión redox, la PrxII F oxidaría otros elementos reguladores como la Trx, glutarredoxina y ciclofilinas cuando la concentración de peróxidos aumenta; de esta manera afectaría a las rutas que están bajo el control de estas proteínas.

La capacidad antioxidante de la PrxII F de *P. sativum* ha sido caracterizada con unos parámetros cinéticos similares a los de otras Prx tipo II (Rouhier *et al.*, 2005) pero son significativamente superiores a los obtenidos para la Prx de 2-Cys de guisante (Bernier-Villamor *et al.*, 2004) tal y como puede observarse en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación de las constantes cinéticas de la PrxII F o otras Prx en la destoxificación del H₂O₂.

Organismo	Enzima	K _M (μM)	k _{cat} (seg ⁻¹)	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ seg ⁻¹)	Referencia
<i>P. sativum</i>	PrxII F	18.86	10.6	5.6 x 10 ⁵	Barranco-Medina <i>et al.</i> , 2006
<i>P. sativum</i>	Prx de 2-Cys	27.61	0.69	0.25·10 ⁵	Bernier-Villamor <i>et al.</i> , 2004
Cebada	Prx de 2-Cys	<2	0.23	1.1·10 ⁵	König <i>et al.</i> , 2003
<i>P. falciparum</i>	Prx de 2-Cys	0.78	1.67	6.7·10 ⁶	Akerman and Müller., 2003
<i>M. tuberculosis</i>	Prx de 2-Cys	5.38·10 ³	0.111	20.63	Chauhan and Mande., 2002

La baja actividad de las Prx en comparación con otras enzimas antioxidantes como la SOD y catalasa podría estar compensado por sus gran abundancia y afinidad o, alternativamente, podría estar relacionado un potencial papel de las Prx en otros procesos como la señalización celular (Dietz *et al.* 2006).

En segundo lugar, realizamos un ensayo *in vitro* viendo la protección de las Prx sobre el DNA plasmídico en presencia de especies de oxígeno reactivo. En una reacción entre DTT, Fe³⁺ y O₂ se forma ROS en la conocida reacción de Fenton y son los radicales hidroxilo los que dañan los ácidos nucleicos (Rouhier *et al.*, 2001). De

las tres proteínas que se ensayaron, PrxII F, C59S y C84S sólo las dos primeras fueron capaces de proteger el DNA plasmídico de la acción deletérea de los radicales libres. La degradación del DNA por radicales libres puede ocurrir en las células por exposición a estrés oxidativo (Imlay and Linn., 1988) por lo que la PrxII F puede constituir un mecanismo de protección del DNA mitocondrial frente a estas especies. Además es lógico pensar que el DNA mitocondrial posea mecanismos alternativos de defensa frente a los ROS ya que se carece de histonas que lo protejan. A tal respecto ya existe un precedente en la literatura donde recientemente se ha publicado cómo la PrxdV de humanos puede proteger *in vivo* al DNA mitocondrial del daño oxidativo producido por el peróxido de hidrógeno (Banmayer *et al.*, 2005). En la literatura científica se encuentran también otros ensayos de protección del DNA por Prx donde el donador electrónico era la ciclofilina (Bernier-Villamor *et al.*, 2004), proteína miembro de la superfamilia de las inmunofilinas y una diana de la droga inmunosupresora ciclosporina A (Dolinski and Heitman., 1997), tiene actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa y actúa catalizando el plegamiento de proteínas (Takahashi *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1989). Aunque hasta la fecha no se ha evidenciado la interacción entre ciclofilinas y Prx de tipo II sí que se han descrito modificaciones en los niveles transcripcionales de las primeras en plantas K.O. de *Arabidopsis* para la PrxII F (Finkemeier *et al.*, 2005) por lo que parecen estar en cierto modo relacionadas.

Los resultados obtenidos a partir de los dos ensayos *in vitro*, actividad peroxidasa y protección del DNA plasmídico, concluyen en la capacidad antioxidante de la PrxII F y en que la Cys59 es el grupo tiólico imprescindible para la actividad catalítica avalando así la hipótesis dada por Rouhier y colaboradores (2002) para la Prx tipo II citosólica de álamo. La mutación de la Cys84 ha mostrados efectos distintos en la actividad antioxidante ya que aunque la proteína C84S redujo notablemente su capacidad de eliminar el peróxido de hidrógeno usando DTT como donador electrónico, mantuvo en cambio la integridad del DNA plasmídico en el ensayo de protección frente a ROS producidos por reacción de Fenton.

9. COMPORTAMIENTO DE LA PRXII F EN GELES BIDIMENSIONALES

Se ha demostrado que las Prx de 2-Cys pueden aparecer en geles bidimensionales como dos spots independientes de igual masa y distinto pI en función de su estado de oxido-reducción (Biteau *et al.*, 2003; Vivancos *et al.*, 2005). Los datos obtenidos sugieren que estas enzimas son muy sensibles a la oxidación y que pueden ser mejores indicadores del estado redox que otras moléculas comúnmente usadas como marcadores (glutathion total y el contenido tiólico total) (Cesaratto *et al.*, 2005).

Hasta la fecha ningún estudio de 2D-PAGE ha abordado este comportamiento en Prx de plantas y en particular sobre la PrxII F. En los últimos tres años se ha demostrado que las Prx que contienen sus cisteínas en estado reducido se posicionan en una región más básica del gel bidimensional que las Prx cuyas cisteínas se encuentran en estados avanzados de oxidación (sulfinico o sulfónico) que lo hacen a un pI más ácido (Chang *et al.*, 2004; Cesaratto *et al.*, 2005;). También ha quedado demostrado cómo el spot situado en una posición más ácida puede corresponderse indistintamente a la forma de sulfinico (SOOH) o sulfónico (SOOOH) (Woo *et al.*, 2003).

A fin de aclarar la respuesta redox de la PrxII F de *P. sativum* se realizaron diferentes ensayos sobre muestras de hoja, raíz, PrxII F purificada y mitocondrias de patata que se analizaron mediante electroforesis bidimensionales.

Los ensayos bidimensionales realizados sobre la PrxII F purificada revelaron dos spots que diferían en su masa y pI. Uno de ellos aparecía a aproximadamente 18 kDa (pI 6.29) correspondiente a la forma monomérica de la enzima; el segundo spot se posicionó a unos 40 kDa (pI 5.8) por lo que parecía corresponder a la forma dimérica de la PrxII F. La formación de las especies diméricas en geles de SDS-PAGE no es un hecho insólito y ha sido puesto de manifiesto para diversos dominios hidrofóbicos (Lemmon *et al.*, 1992).

Tres electroforesis bidimensionales se llevaron a cabo usando extractos proteínicos de guisante y *A. thaliana*. Dos spots eran comunes a los geles obtenidos tanto para guisante (hojas y raíces) como para *arabidopsis* (hojas) y fueron caracterizados con un valor de pI de 6.33 y 5.95. Sin embargo, dos spots adicionales de mayor masa se observaban en los geles de hojas de guisante (pI 6.05 y 5.83) que se corresponden con la forma dimérica de la PrxII F. La dimerización de la PrxII F se ve reflejada no sólo como un cambio en el tamaño molecular sino también como un cambio en los puntos isoeléctricos. La comparación de estos spots con los obtenidos para la proteína purificada revela cómo en ambos casos aparece un spot con un pI en torno a 6.3 correspondiente a la forma monomérica de la PrxII F y otro a aproximadamente 5,8 que representa la forma dimérica de la enzima. La aparición de la PrxII F en su forma dimérica en geles bidimensionales, donde la concentración de agentes desnaturizantes es elevada, vuelve a incidir en la alta tendencia de la enzima a formar oligómeros así como en su estabilidad. De acuerdo con ensayos previos usando Prx de eucariotas (Biteau *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2003; Budanov *et al.*, 2004; Cesaratto *et al.*, 2005), la hiperoxidación de los residuos de cisteína de las Prx (forma sulfinilada o sulfonilada) resultan en un cambio posicional hacia la parte más ácida del gel. Por tanto, parece que los spots ácido y básico observados en nuestros análisis representan las formas oxidadas y reducidas respectivamente de la PrxII F de *P. sativum*.

En mitocondrias de patata no tratadas se revelaron dos manchas correspondientes a la PrxII F en su estado monomérico con unos pI de 6.33 y 5.95 pero al tratarlas con DTT sólo aparecía el spot a 6.33. En base a estos resultados queda claro que la forma reducida de la PrxII F aparece a un pI de 6.33 mientras que la forma oxidada se posiciona a un pI de 5.95. Al forzar las condiciones de oxidación para lograr obtener únicamente el spot de la PrxII F oxidada no sólo aparecían las dos manchas anteriormente mencionadas sino también una serie de spots situados hacia la zona de mayor acidez del gel, todos con igual masa pero distinto pI. Estos spots adicionales, hasta ahora nunca descritos en la literatura, pueden suponer otros estados

de oxidación de la PrxII F u otro tipo de modificaciones químicas. Pese a la elevada concentración de H_2O_2 utilizada, la forma reducida de la PrxII F no desapareció completamente tal y como ha sido demostrado en otras experiencias de oxidación ya publicadas (Budanov *et al.*, 2004; Cesaratto *et al.* 2005). La posible hipótesis de que la aparición del spot reducido de las Prx tras la oxidación de las muestras pudiera deberse a una nueva síntesis de proteínas ha quedado ya descartada gracias al uso de inhibidores de la síntesis proteica (Cesaratto *et al.*, 2005). El comportamiento observado para la PrxII F podría reflejar la capacidad de las mitocondrias para reducir la forma sulfinilada de la proteína mediante otras enzimas antioxidantes como las sulfirredoxinas (Biteau *et al.*, 2005) y sestrinas (Budanov *et al.*, 2004). Tanto las sulfirredoxinas como las sestrinas se han mostrado eficaces para regenerar las Prx de 2-Cys oxidadas y reestablecer de esta forma la barrera antioxidante. Aunque hasta nuestros días no se ha evidenciado la presencia de estas nuevas enzimas regeneradoras en mitocondrias vegetales ni la regeneración de las Prx de tipo II por éstas, parece lógico que puedan existir tal y como ocurre en el cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (Liu XP *et al.*, 2006).

La hipótesis de reactivación contradice en cierto modo la idea de que las Prx oxidadas funcionan como compuerta que modula la respuesta de las células a las concentraciones de peróxido intracelular (Georgiou and Masip, 2003). La sulfinilación reversible de las Prx es ahora propuesto como un nuevo mecanismo de regulación de señalización del H_2O_2 (Woo *et al.*, 2003).

A nuestro saber, este trabajo describe por primera vez la visualización de diferentes estados de oxidación de la PrxII F de plantas tras tratamientos con peróxido de hidrógeno sobre las mitocondrias. Asimismo, las Prx modificadas podrían ser marcadores muy sensibles del grado de estrés oxidativo en el que se encuentran las plantas tal y como propusieron Cesaratto *et al.*,. Su actividad podría estar asociada con la capacidad de regeneración del estado reducido de las peroxirredoxin-reductasas como recientemente ha sido descubierto en levaduras y plantas.

10. REGULACIÓN REDOX DE LA EXPRESIÓN DE LA PRXII F DE *P. sativum* EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO

El estado redox de las células debe estar equilibrado para el funcionamiento óptimo celular. Las alteraciones que se producen en la expresión génica como consecuencia del estrés oxidativo se asocia frecuentemente con la regulación redox dependiente. En los últimos años se ha visto que las Prx juegan un papel importante en la defensa oxidativa celular y se cree que están bajo el control de señales redox (Dietz *et al.*, 2006) por lo que decidimos estudiar la respuesta que se producía en la expresión de la PrxII F de *P. sativum* cuando se sometía a diferentes tipos de estrés oxidativo como son el frío, estrés salino y estrés por metales pesados.

Las leguminosas se consideran menos tolerantes a la toxicidad por cadmio que los cereales y gramíneas y su producción en biomasa se ve severamente afectada a concentraciones sub-micromolares (Metwally *et al.*, 2005). La toxicidad producida por el Cd revela diversos efectos como disminución de la absorción de nutrientes e inducción del estrés oxidativo con alteraciones concomitantes en los sistemas de defensa antioxidante (Sandalio *et al.*, 2001). Igualmente el estrés térmico (frío) y salino afectan el estado redox de las plantas. Estudios previos han mostrado la alteración de la expresión de tres SOD por tratamientos de frío (Tsang *et al.*, 1991) pero hasta hoy no existen referencias de la respuesta de las Prx vegetales a bajas temperaturas.

En todos los tratamientos de estrés realizados, frío (12 y 24 horas), NaCl (25 and 50 mM) y CdCl₂ (10 µM), los niveles de RNA y proteínas en hojas sufrieron una notable inducción. Este hecho hace que la PrxII F de *P. sativum* se pueda considerar como un marcador sensible del estado de estrés en hojas para esta planta pese a que otros trabajos le atribuyen un papel más constitutivo en *Arabidopsis*.

Investigaciones recientes revelan un elevado aumento de los niveles transcripcionales de Srx cloroplastídica de *A.thaliana* en tratamientos por frío (Liu *et al.*, 2006). Como se ha descrito en distintos apartados de esta tesis, la Srx es responsable de la reducción de la forma sobreoxidada de las Prx de 2-Cys. Tanto en cuanto existe una relación de oxido-reducción entre Prx y Srx, y observado el similar comportamiento de ambas enzimas ante el frío, parece que puede existir una regulación acoplada de éstas, tal y como sugerían Biteau *et al.*, (2003).

En ningún caso el aumento de aireación en los cultivos hidropónicos supuso un incremento en los niveles de PrxII F pese a que tal tratamiento aumentara teóricamente el metabolismo aeróbico.

Uno de los aspectos que más han llamado la atención en los tratamientos de estrés es el comportamiento de la PrxII F en raíces de guisante donde no se apreció variación en los niveles de mRNA o proteína entre las plantas control y las tratadas. Finkemeier *et al.* (2005) describieron cómo los tratamientos con Cd sobre *Arabidopsis* afectaban a los niveles de mRNA de la PrxII F en hoja mientras que los niveles proteicos en raíz permanecían inalterados. Según estos datos, la PrxII F, en principio, no altera sus niveles proteicos en raíces en respuesta a los estreses realizados por lo que se comporta en cierto modo como proteína constitutiva en dicho órgano. Sin embargo, los trabajos realizados por el grupo alemán también resaltan cómo la carencia de la PrxII F en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* se reflejaba en una disminución del crecimiento del sistema radicular cuando las plantas se sometían a estrés por Cd por lo que se deduce la importancia fisiológica de esta enzima en el sistema radicular.

Los trabajos realizados por Horling *et al.*, (2002, 2003) no observaron cambios significativos en los niveles de mRNA de la PrxII F de *A. thaliana* en tratamientos oxidativos o por luz. Recientemente se ha publicado cómo la PrxII F parece ser una proteína mucho más constitutiva que otras Prx vegetales (Dietz *et al.*,

2006). No obstante, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sólo adjudican un papel constitutivo de la PrxII F en raíces, mientras en las hojas la expresión de la enzima se presenta de una forma mucho más dinámica.

La controversia de los resultados publicados y los obtenidos en esta tesis deja muchas dudas sobre el comportamiento de la PrxII F en vegetales. La problemática se extiende también al hecho de que plantas transgénicas de *Arabidopsis* que carecen de PrxII F presenten un crecimiento deficitario cuando son tratadas con Cd y que por el contrario, los tratamientos con Cd de plantas de *Arabidopsis* normales no produzcan alteraciones en los niveles de PrxII F.

11. INTERACCIÓN PRXII F-TRX O2

Han sido muchos y variados los intentos de buscar el donador electrónico fisiológico de las Prx si bien todos los ensayos *in vitro* apuntan a las Trx. El estudio *in vitro* más reciente lo realizaron Balmer *et al.*, (2004) quienes evidenciaron la formación de un heterocomplejo entre la PrxII F y una Trx-h citosólica mutada. Sin embargo, ningún trabajo ha sido capaz de demostrar la interacción entre Prx y Trx *in vivo*. Con el firme propósito de caracterizar la interacción del sistema Prx-Trx mitocondrial en guisante se han llevado a cabo a lo largo de esta tesis numerosas experiencias con los resultados que a continuación se discuten.

El primer ensayo que se decidió probar fue la interacción entre la Trx O2 y las proteínas PrxII F, C59S y C84S mediante microcalorimetría e indagar si existían diferencias termodinámicas entre las distintas mezclas. Los ensayos concluyeron en unos resultados claros y rotundos: la Trx O2 mantenía una interacción con la PrxII F clasificada como ultrafuerte mientras que las proteínas mutantes C59S y C84S no eran capaces de interactuar con la Trx O2. Estos datos sugieren el extraordinario papel que juegan ambas cisteínas para interactuar con la Trx a pesar de la presencia de

agentes reductores en el medio. Los parámetros termodinámicos de interacción PrxII F – Trx O₂ excedieron las expectativas en comparación con los valores mucho menores descritos en la literatura para otras proteínas como Cytocromo C peroxidasa – Ferricitocromo C (Kresheck *et al.*, 1995; Leesch *et al.*, 2000).

Se pensó que la mutagénesis dirigida en las cisteínas en las proteínas mutantes podría producir un cambio conformacional que modificara drásticamente la interacción con la Trx. Los cambios de emisión de fluorescencia del triptófano son usados como indicadores de cambios estructurales. Esta fue la razón que nos llevó a medir la fluorescencia del triptófano en las proteínas PrxII F, C59S y C84 tanto en condiciones normales como tras ser oxidadas y comprobar si realmente se producían cambios en los espectros de fluorescencia de estas proteínas. Las medidas fluorimétricas revelaron distintos espectros entre la PrxII F y los mutantes C59S y C84S interpretándose como un cambio estructural. Se hipotetiza que este cambio estructural, fruto de las sustituciones de las cisteínas 59 y 84 por serina, podría obstruir la interacción de las proteínas mutantes con la Trx O₂.

El siguiente paso fue estudiar si los resultados obtenidos por ITC se reflejarían también en ensayos de filtración molecular. Así se ensayó por separado la interacción de la Trx O₂ con las proteínas PrxII F, C58S y C84S en columna Superdex HR-200 tras una hora de incubación y en presencia de DTT. Tal y como ocurría en los ensayos microcalorimétricos, sólo la PrxII F fue capaz de interactuar con la Trx O₂ formando un heterocomplejo estable, con un volumen de elución mucho menor que la Trx O₂ o PrxII F por separado, al que le correspondía un tamaño de 93 kDa. Mediante Western blot se confirmó la presencia de la Trx O₂ y PrxII F en el heterocomplejo.

El hecho de que los mutantes C59S y C84S eluyeran de forma independiente tras la incubación con Trx O₂ y no hubiera formación de heterocomplejo redundante en la importancia de las cisteínas catalítica y peroxidante de la PrxII F para interactuar con la Trx O₂. La formación del heterocomplejo en principio no puede deberse a

puentes disulfuro debido al uso de 0.1 mM de DTT en los tampones de trabajo por lo que probablemente, éste se establezca mediante puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas. Tal y como se ha venido debatiendo a lo largo de la discusión de la tesis, las interacciones de tipo hidrofóbico parecen estar muy presentes en la PrxII F por lo que en principio son las candidatas prioritarias para establecer las uniones proteína – proteína y lograr la estabilidad de la interacción.

Probada ya la interacción *in vitro* entre PrxII F y Trx O2 mediante microcalorimetría y filtración molecular, llegaba el momento de realizar los estudios *in vivo*, de verificar la presencia de los heterocomplejos observados donde fisiológicamente pueden ser relevantes, en la mitocondria. Los fraccionados mitocondriales en Superdex 200 con y sin DTT se analizaron mediante dos ensayos de ELISA independientes con los anticuerpos frente a la Trx O2 y PrxII F. La aparición en ambos ELISA de un pico en la misma alícuota (13.5 ml) al que le correspondía un tamaño molecular (93 KDa) semejante al heterocomplejo observado en los ensayos de filtración molecular con las proteínas recombinantes, vaticinaba que muy probablemente ambas proteínas se encontraban presentes en dicha alícuota formando un heterocomplejo redox-independiente. El Western-blot confirmó la presencia tanto de PrxII F como de Trx O2. Por tanto podemos asumir que el heterocomplejo se encontraba ya formado en la matriz mitocondrial previo a la homogenización y filtración en gel, porque es muy improbable que la PrxII F y la Trx O2 puedan interaccionar tras la dilución a lo largo de la filtración molecular.

Tal y como era de esperar, en ausencia de DTT la PrxII F apareció fundamentalmente en tres picos, hexámero (12.9 ml), heterocomplejo (13.5 ml) y dímero (15.3 ml) mientras que la Trx O2 se mostró como dímero (16.51 ml), heterocomplejo (13.5 ml) y monómero (18.8 ml).

Es de destacar que el juego dímero-hexámero *in vivo* responde al estado redox como se observaba en el caso de las proteínas recombinantes. Los bajos niveles de

hexámero de PrxII F presentes en los fraccionados podrían indicar que la enzima se encuentra fundamentalmente en su forma dimérica o formando el heterocomplejo con la Trx O2 en la mitocondria.

En resumen, estos resultados muestran la interacción *in vivo* e *in vitro* entre la PrxII F y Trx O2 y sugieren que en la matriz mitocondrial se dan las condiciones óptimas para el ensamblaje del heterocomplejo que ambas proteínas constituyen, probablemente a fin de lograr la reducción de la enzima. Estos resultados en sí mismos manifiestan además la localización mitocondrial de la Trx O2.

Los datos obtenidos en las potenciometrías de la PrxII F y la Trx O2 harían explicable y factible la transferencia electrónica desde la Trx O2 (-323 mV) hasta la PrxII F (-309 mV). Con esta teoría y con los resultados fehacientes de que la PrxII F y la Trx O2 interaccionan tanto *in vivo* como *in vitro* se ha dado un paso adelante para poder atribuir a la Trx O2 el papel de donador fisiológico electrónico de la PrxII F.

La co-cristalización del heterocomplejo PrxII F – Trx O2 aportaría valiosa información sobre las zonas preferentes de contacto así como la orientación del mismo. Del mismo modo se podría llegar a entender de una forma más clara el fenómeno de oligomerización que tiene lugar y por qué la eliminación de las cisteínas 59 y 84 puede ser tan crítica.

12. UNIÓN DE LA PRXII F OXIDADA A LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

La incubación de membranas mitocondriales con PrxII F procedente del pico dimérico obtenido por filtración molecular de la PrxII F sobreoxidada con peróxido de hidrógeno evidenció una unión de la misma a las membranas mitocondriales. La

secuenciación de esta proteína aclaraba que la proteína se encontraba formando puentes disulfuro entre la Cys-59 y Cys84.

Este descubrimiento supone la unión de una Prx tipo II a la membrana mitocondrial, hecho que no había sido descrito hasta nuestros días. El significado de esta unión podría ser atribuido a un posible mecanismo de reciclaje de las células vegetales para proteínas oxidadas o bien tener implicaciones para posibles funciones *in vivo* en la señalización redox, aunque este aspecto sigue siendo una incógnita.

Mientras que las forma reducida y oxidada inactiva (estado sulfinilado) de las Prx de 2-Cys de trigo se unen a las membranas tilacoidales (König et al., 2002, König et al., 2003), la PrxII F oxidada de guisante (conteniendo sus Cys unidas por puentes disulfuro) se une a la membrana mitocondrial. El comportamiento de ambas proteínas parece diferente en cuanto a su estado oxidativo y unión a las membranas así como en sus condiciones de oligomerización tanto en cuanto la Prx de 2-Cys forma decámeros en condiciones reductoras y la PrxII F se disocia en un ambiente reductor.

Recientemente se ha publicado la unión de la Prx Q de *A. thaliana* a las membranas tilacoidales y el incremento de dicha localización tras la oxidación de cloroplastos intactos (Lankemeyer et al., 2006). Este comportamiento se asemeja bastante al de la PrxII F en guisante. Por tanto, la oxidación de las Prx parece un papel decisivo para que éstas se adhieran a las membranas celulares donde probablemente desarrollen un papel fisiológico.

13. CRISTALIZACIÓN DE LA PRXII F DE *P. sativum*

La peculiaridad que presenta la PrxII F en sus distintos estados de oligomerización redox-dependiente, mostrando dos conformaciones distintas en solución (dímero y hexámero) y hasta cuatro en extractos crudos de hoja (monómero,

dímero, trímero y hexámero), la unión de ésta con el mecanismo catalítico así como la posible relación que en las PrxII F de vegetales puede haber entre el estado oligomérico y unión a membrana tilacoidal junto con el hecho de que no exista la estructura de ninguna Prx de tipo II mitocondrial descrita en plantas, hacen que la determinación de la estructura tridimensional de la PrxII F de *Pisum sativum* constituya una fuente de información de gran utilidad para un mejor conocimiento de estas enzimas.

Existen distintos métodos para obtener información estructural de una proteína. Tanto la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como la difracción de rayos X permiten obtener la posición precisa de cada átomo en la molécula y por tanto una imagen detallada de la estructura. Mientras que la RMN se utiliza para resolver moléculas pequeñas (hasta unos 20 kDa) la difracción de rayos X es más apropiada para complejos mayores, como es el caso de la PrxII F de *Pisum sativum*. El gran obstáculo a esta técnica lo representa la obtención de cristales que proporcionen una buena difracción.

Hemos establecido unas condiciones para el crecimiento de cristales de la PrxII F de *Pisum sativum*. Los mejores cristales se obtuvieron de gotas que contenían 3 μl de PrxII F a una concentración de 10 mg ml^{-1} en Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y 3 μl de solución reservorio (DTT 5 mM, 20% P/v de PEG 2000 y 1% v/v de propanol en tampón citrato 100 mM pH 5.6) equilibrado frente a 500 μl de solución reservorio.

La celdilla unidad presente en los cristales se corresponde con seis moléculas de PrxII F. Aunque este hecho no implica que fisiológicamente la PrxII F se encuentre como hexámero, se intuye que la cristalización de la proteína en su forma hexamérica no sea azarosa sino que refleje la relevancia de este oligómero tal y como apuntan todos los datos de oligomerización discutidos en esta tesis.

En principio, este cristal de PrxII F hexamérica viene a presentar un nuevo estereotipo en la cristalografía de las Prx de tipo II. Sin embargo, esta cristalización podría asimilarse a las 4 moléculas que cristalizaron en la celdilla unidad para la Prx II citosólica de álamo (Echalier *et al.*, 2005).

Cabe esperar que la interfase monómero - monómero en la PrxII F se presente de forma perpendicular al plano de la lámina β central tal y como ocurre en las Prx tipo II hasta hoy descritas. De ser así, las interacciones entre los monómeros tendrían un carácter altamente hidrofóbico como ocurre en el caso de la PrxII citosólica de álamo. El hecho de que la PrxII F cristalice como hexámero no tendría en principio por qué oponerse a este tipo de interfases monoméricas ya que por ejemplo los decámeros cristalizados de las Prx de 2-Cys las mantienen (Echalier *et al.*, 2005, Dietz *et al.*, 2006).

La resolución completa de la estructura tridimensional de la PrxII F nos permitirá ahondar en el conocimiento de las interacciones monómero – monómero y aclarar así algunos de los aspectos de la oligomerización de las Prx.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo el aislamiento del gDNA y cDNA que codifican la enzima Prx tipo II mitocondrial así como el cDNA de una Trx O2 mitocondrial de *Pisum sativum*. Las secuencias aminoacídicas deducidas presentan gran homología con las secuencias de PrxII F y Trx O2 descritas para otros organismos, mostrando las dos cisteínas características así como los motivos conservados alrededor de ellas. Los estudios comparativos de las regiones intrónicas-exónicas de la PrxII F de *Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana* revelaron una alta conservación de los patrones del “splicing” alternativo lo que indica una conservación evolutiva de la PrxII F en distintas especies.

2. Se han sobreexpresado la PrxII F y Trx O2 recombinantes junto con las proteínas mutantes C59S y C8S mediante la utilización del sistema pET y se ha desarrollado un protocolo simplificado de purificación en dos pasos cromatográficos para la PrxII F y mutantes y en uno para la Trx O2.

3. El análisis por filtración en gel de la PrxII F recombinante purificada demostró la existencia de dos conformaciones, dimérica y hexamérica. La hexamerización se ve favorecida por la oxidación de la proteína así como por el aumento del pH lo que indica un cambio conformacional o de carga, respectivamente, que favorece su oligomerización. Por el contrario la forma dimérica de la PrxII F se estabiliza en condiciones reductoras. Se confirma la participación de los puentes disulfuro que estabilizan el hexámero de la PrxII F recombinante, así como, a partir del análisis con las proteínas mutantes, la importancia de la Cys59 para la formación de la estructura hexamérica.

4. La accesibilidad del DTNB a la Cys59 y Cys84 indica la exposición de ambas en la zona exterior habilitando así la interacción con las cisteínas de otros monómeros para formar estados superiores de oligomerización.

5. Se ha puesto de manifiesto la formación de un heterocomplejo redox-independiente entre la PrxII F y la Trx O₂, tanto *in vivo* como *in vitro*. La imposibilidad de interacción entre las proteínas mutantes C59S y C84S con la Trx O₂, mostrada por ITC o filtración molecular parece deberse, tal y como muestran los ensayos de fluorimetría, a los cambios conformacionales producidos por la ausencia de la Cys59 o Cys84. Así mismo, se ha detectado *in vivo* la presencia de dímeros y hexámeros de la PrxII F.

6. Se ha demostrado mediante inmunocitoquímica la localización mitocondrial de la PrxII F de *P. sativum*. Dentro de la mitocondria la enzima se localiza fundamentalmente en la matriz, asociándose parcialmente a la membrana mitocondrial cuando se encuentra en estado oxidado.

7. La caracterización cinética de la PrxII F y de las proteínas mutantes C59S y C84S pone de manifiesto la actividad antioxidante de la PrxII F, presentando propiedades comparables a las descritas para otras Prx. La pérdida total de actividad de la proteína C59S indica que la Cys59 es imprescindible en el mecanismo de acción de la PrxII F. La pérdida de la Cys84 también condujo a un descenso importante en la actividad peroxidasa dependiente de DTT pero la capacidad para proteger al DNA frente a los radicales libres se vio inalterada en comparación a la Prx II F. Por tanto la Cys84 no parece ser imprescindible para la actividad de la PrxII F.

8. La PrxII F puede presentarse en geles bidimensionales como dos spots de igual masa y diferente pI que se corresponden con los distintos estados de oxidorreducción de la enzima. Los niveles relativos de estos spots suponen una nueva forma para determinar el estado redox celular.

9. La expresión de la PrxII F muestra una regulación positiva en condiciones oxidantes de estrés producidas por frío, NaCl y CdCl₂.

10. Se han obtenido cristales de la PrxII F de *P. sativum* recombinante y se han establecido condiciones para el crecimiento de éstos, lo que supone un punto de partida para la resolución de la estructura tridimensional de la enzima. Los primeros datos estructurales obtenidos por difracción de rayos X han revelado la presencia de un hexámero en la celdilla unidad de estos cristales.

CONCLUSIONS

1. The isolation of the gDNA and cDNA that code for the mitochondrial Prx type II as well as the cDNA of mitochondrial Trx O2 of *Pisum sativum* has been achieved. The deduced amino acid sequences are largely homologous to sequences of PrxII F and Trx O2 described for other organisms, showing the characteristic sequence motives including the two conserved cysteine residues. The comparative studies of the intronic-exonic regions of PrxII F from *P. sativum* and *Arabidopsis thaliana* revealed a high conservation in the alternative splicing places indicating an evolutionary conservation of PrxII F in different species.

2. Trx O2, PrxII F and mutants C59S and C8S have been overexpressed as recombinant proteins using pET expression systems. We have developed a simple protocol for purification of PrxII F proteins and Trx O2 which include respectively two or one chromatographic steps.

3. The gel filtration analysis of recombinant purified PrxII F demonstrated the existence of two oligomeric states namely dimers and hexamers. The hexamerization is favoured by the oxidation of the protein and pH increase. This points to a link between the oligomerisation state and conformational or charge changes. On the contrary, the dimeric form of PrxII F is stabilised under reducing conditions. The participation of disulfide bridges in stabilizing the hexameric state of recombinant PrxII F- is confirmed. Furthermore, Cys59 was found to play an important role in the formation of the hexameric structure.

4. Chemical modification studies using DTNB have revealed that Cys59 and Cys84 are solvent accessible, which allows interaction with the cysteines of other monomers to form higher oligomers.

5. The formation of a redox-independent heterocomplex between PrxII F and the Trx O2 has been revealed *in vivo* and *in vitro*. ITC and gel filtration experiments have shown that the mutants C59S and C84S fail to interact with Trx O2, which is founded in conformational changes produced by the absence of the Cys59 or Cys84, as evidenced by intrinsic fluorescence measurements. Also, the presence of dimers and hexamers of PrxII F has been demonstrated *in vivo*.

6. The mitochondrial localization of PrxII F from *P. sativum* has been demonstrated by means of immunocytochemistry. Inside the mitochondrion, the enzyme is located primarily in the matrix and is partially associated to the mitochondrial membrane when the enzyme is oxidized.

7. The kinetic characterization of the PrxII F and mutants C59S and C84S reveals the antioxidant activity of the PrxII F, presenting properties comparable to previously described Prx. The total loss of activity of the protein C59S indicates that Cys59 is indispensable for the reaction mechanism of the PrxII F. The replacement of the Cys84 also gave rise to an important decrease in the DTT dependent peroxidase activity, but the capacity to protect the DNA against free radicals was similar to the wild enzyme. Therefore, the Cys84 does not seem to be entirely necessary for the PrxII F activity.

8. Two-dimensional electrophoresis studies have lead to the identification of two PrxII population characterised by similar masses but different pI, which are attributed to different oxidoreduction forms of the enzyme. This type of analysis appears to be a convenient tool to determine the cellular redox state of this type of protein.

9. PrxII F was found to be upregulated under stress conditions such as cold, NaCl and CdCl₂.

10. The experimental conditions for the growth of crystals of recombinant PrxII F of *P. sativum* have been determined, which represents the base for the resolution of the three-dimensional structure. The size of the unit cell as determined by X-ray diffraction is consistent with a hexameric state of the enzyme.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aalen RB, Opsahl-Ferstad 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.

Alphey MS, Bond CS, Tetaud E, Fairlamb AH, Hunter WN (2000) The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2-Cys-peroxiredoxins. *J Mol Biol* **300**: 903-916.

Agius SC, Bykova NV, Igamberdiev AU, Moller IM (1998) The internal rotenone-insensitive NADPH dehydrogenase contributes to malate oxidation by potato tuber and pea leaf mitochondria. *Physiol. Plant* **104**: 329-336

Akerman SE, Müller S (2003) 2-Cys peroxiredoxin PfTrx-Px1 is involved in the antioxidant defence of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **130**: 75-81

Alscher RG. (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant* **77**: 457-464

Andrews SC, Harrison PM, Guest JR (1991) A molecular analysis of the 53.3 minute region of the *Escherichia coli* linkage map. *J Gen Microbiol* **137**: 361-367.

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant* **85**: 235-241

Asada K (1994) Molecular properties of ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. In: *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*

Azcon-Bieto J, Lambers H, Day DA (1983) Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative pathway in leaf respiration. *Plant Physiology* **72**: 598-603

Babcock GT, Wikstrom M (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**: 301-309

Baier M, Dietz KJ (1996a) 2-Cys peroxiredoxin BAS 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol--Plant Gene Register* **111**: 651

Baier M, Dietz KJ (1996b) 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 (1996c) 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. Pág. 204-209

Baier M, Dietz KJ (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear encoded chloroplast protein. Its expression, regulation, phylogenetic origin and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J* **12**: 179-190

Baier M, Dietz KJ (1999) Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence for transgenic Arabidopsis. *Plant Physiol* **119**: 1407-1414

Balmer Y, vensel WH, Tanaka CK, Hukman WJ, Gelhave E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schurmann P, Droux M, Buchanan BB (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2642-7

Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoops B (2005) Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DNA damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS letters* **579**: 2327-2333

Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmmaizer M, Gagnon J, Triantaphilides C (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptative response in tomato cells. *Plant J* **13**: 519-527

Berberich T, Ubeler M, Feierabend J (1998) Cloning of a cDNA encoding a thioredoxin peroxidase (TPx) homolog from winter rye (*Secale cereale* L.) (accession no. AF076920). *Plant Physiol-Plant Gene Register* **118**: 98.

Belligni MV and Lamattina L (1999) Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci* **4**: 299-300

Bernier-Villamor L, Navarro E, Sevilla F, Lazaro JJ (2004) Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *J Exp Bot* **55**, 2191-2199

Bitteau B, Labarre J, Toledano MB (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425** 980-984

Black S, Harte EM, Hudson B, Wartofsky L (1960) Specific Enzymatic Reduction of L(-)Methionine Sulfoxide and A Related Nonspecific Reduction of Disulfides. *Journal of Biological Chemistry* **235**:2910-2916

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99

Bodenstein-LangJ, Buch A, Follmann H (1989) Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxin. *FEBS Letter* **258**:22-26

Bollwell GP (1999) Water deficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *J. Plant Physiol* **155**: 255-261

Boveris A, Sánchez RA, Beconi MT (1978) Antimycin and cyanide-resistant respiration and superoxide anion production in fresh and aged potato tuber mitochondria. *FEBS Letters* **92**: 333-338

Boucher IW, McMillan PJ, Gabrielsen M, Akerman SE, Brannigan JA, Schnick C, Brzozowski AM, Wilkinson AJ, Muller S (2006) Structural and biochemical characterization of a mitochondrial peroxiredoxin from *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol.* **61**:948-959

Boveris A (1984) Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* **105**: 429-435

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

Braidot E, Petrusa E, Vianello A, Macri F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS* **451**:347-350

Bréhélin C, Meyer EH, de Souris JP, Bonnard G, Meyer Y (2003) Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol* **132**: 2045-2057

Broin M, Cuine S, Eymery F, Rey P (2002) The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* **14**: 1417-1432

Broin M, Rey P (2003) Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid Peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. *Plant Physiol* **132**: 1335-1343

Bryk R, Griffin P, Nathan C (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**: 211-215

Buchanan BB, Balmer Y (2005) Redox regulation: a broadening horizon. *Ann Rev Plan Biol* **56**: 187-220

Budanov A V, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. (2004) Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **304**: 596-600

Casolo V, Braidot E, Chiandussi E, Macri F, Vianello A (2000) The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *Febs Letters*. **474**: 53-57

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 Research* **39**:255-68

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994a) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**: 27670-27678

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 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

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

Chan MT, Yu SM (1998) The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6543-6547

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

Chamnonpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann HJr, Van Montgau M (1997) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 5818-5823

Chauhan, R, Mande, S C (2001) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem J* **354**: 209–215

Chayen NE (1998) Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**: 8-15

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

Cheong NE, Choi YO, Lee KO, Kim WY, Jung BG, Chi YH, Jeong JS, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Molecular cloning, expression and functional characterization of a 2-Cys peroxiredoxin in *Chinese cabbage*. *Plant Mol Biol* **40**: 825-834

Chew O, Whelan J, Millar AH (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plant. *J. Biol. Chem*. **278** : 46869-46877

Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE (1998) Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct Biol* **5**: 400-406

Choi J, Choi S, Choi J, Cha M-K, Kim I-H, Shin W (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* thiol peroxidase in the oxidized state: Insights into intramolecular disulphide formation and substrate binding in atypical 2-Cys peroxiredoxin. *J. Biol. Chem*. **278**: 49478-49486

Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol* **53**: 159-182

Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2003) The Arabidopsis Plastidial Thioredoxins. *J Biol Chem* **278**: 23747-23752

Collin V, Lankemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new γ -type. *Plant Physiol* **136**:4088-4095

Corpas FJ, Gómez M Hernández JA, Del Rio 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

Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black grass. *The Plant Journal* **18**: 285-292

Claros MG, Vicens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem.* **241**:779-786

Dalton DA., Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CV, Sarath G (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine Max* L. Merr.) root nodules. *Plant Physiol* **102**: 481-489

Dat J Vandenberghe E, Vranová M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusagem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol Life Sci* **57**: 779-795

Dean C, Tamaki S, Dunsmuir P, Favreau M, Katayama C, Dooner H, Bedbrook J (1986) mRNA transcripts of several plant genes are polyadenylated at multiple sites in vivo. *Nucleic Acids Res* **14**: 2229-2240

Declercq JP, Evrard C, Clippe A, Stricht DV, Bernard A, Knoops B (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* **311**: 751-759

Dietz KJ (2003a) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 93-107

Dietz KJ (2003b) Redox control, redox signalling and redox homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology*: **228**: 141-193

Dietz KJ (2005) Plant thiol enzymes and thiol homeostasis in relation to thiol-dependent redox regulation and oxidative stress. In: Smirnov N, ed *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Publishers. 25-52

Dietz KJ, Link G, Pistorius EK, Scheibe R (2001) Redox regulation in oxygenic photosynthesis. *Prog Bot* **63**: 207-245

Dietz KJ, Stork T, Finkemeier I, Lankemeyer P, Li WX, El-Tayeb MA, Michel KP, Baier M, Pistorius E (2004) The role of peroxiredoxin in oxygenic photosynthesis of cyanobacteria and higher plants: peroxide detoxification or redox sensing?. En Demmig-Adams B, Adams W, Mattoo A, eds. *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Berlin: Springer, 303-319

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

Dolinski K, Heitman J (1997) Peptidyl-prolyl isomerases. En: *Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts*. Eds. J Sambrook, S Tooze. Oxford University Press, London. Pág. 359-369

Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. Relationships to resistance. *Plant Physiol.* **113**: 249-257

Echalier A, Trivelli X, Corbier C, Rouhier N, Walker O, Tsan P, Jacquot JP, Aubry A, Krimm I, Lancelin JM (2005) Crystal structure and Solution NMR Dynamics of a D (Type II) Peroxiredoxin Glutaredoxin and Thioredoxin Dependent: a New Insight into the Peroxiredoxin Oligomerism. *Biochemistry* **44**: 1755-1767

Edwards R, Dixon DP, Walbot V (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* **5**: 193-19

Eklund H, Gleason FK, Holmgren A (1991) Structural and Functional Relations Among Thioredoxins of Different Species. *Proteins-Structure Function and Genetics* **11**:13-28

Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cell. En: *Active Oxygen Species, Oxidative Stress, and Plant Metabolism*. (Pell E.J., Steffen, K.L. eds). Pp 13-25. The American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland.

Elthon TE, Nickels RL, McInstosh L (1989) Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol* **89**: 1311-1317

Emmanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* **300**: 1005-1016

Engwall E (1980) Enzyme immunology ELISA and EMIT. *Meth Enzymol* **70**: 419-439

Ernster L, Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol* **91**: 227-255

Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 10237-10241

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. *Journal of Chemical Crystallography* **34**: 553-558

Feng JN, Model P, Russel M. (1999) A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Molecular Microbiology* **34**:745-755.

Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297

Finkemeier I, Goodman M, Lankamayer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Diet KJ (2005) The mitochondrial tupe II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *Jornal of Biological Chemistry.* **280** : 12168-12180

Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**: 476-478

Flohé L, Budde H, Bruns K, Castro H, Clos J, Hofmann B, Kansal-Kalavar S, Krumme D, Menge U, Plank-Schumacher K, Sztajer H, Wissing J, Wylegalla C, Hecht HJ (2002) Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* **397**: 324-335

Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scout IM (1997). Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant* **100**: 241-254

Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in pytosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* **146**: 359-388

Fridovich I (1998) Oxygen toxicity: A radical explanation. *J. Exjp. 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

Gan ZR, Sardana MK, Jacobs JW, Polokoff MA. (1990) Yeast Thioltransferase - the Active-Site Cysteines Display Differential Reactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **282**:110-115

Gallie DR (1993) Posttranscriptional Regulation of Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 77-105

Garfin DE (1990) One-dimensional gel electrophoresis. *Meth Enzymol* **182**: 425-441

Gelhaye E, Rouhier N, Gérard , Jolivet YI, Gualberto J, Navrot N, Ohisson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jaquot JP (2004) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 14545-14550

Genot G, Wintz H, Houlné G, Jamet E (2001) Molecular Characterization of a bean chloroplastic 2-Cys Peroxiredoxin. *Plant Physiol Biochem* **39**: 449-459

Georgiou G, Masip L (2003) An overoxidation journey with a return ticket. *Science* **300**: 592-594

Gray M, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481

Guimaraes BG, Souchon H, Honoré N, Saint-Joanis B, Brosch R, Shepard W, Cole ST, Alzari PM (2005) Structure and Mechanism of the Alkyl Hydroperoxidase AhpC, a key Elementof the *Mycobacterium tuberculosis* Defense System against Oxidative Stress. *J. Biol. Chem* **280**:25725-25742

Greenberg, JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD, Demple B (1990) Positive control of a global antioxidant defense regulation activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**: 6181-6185

Haezlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signalling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial protein. Plant Cell **16**: 241-256

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press. 3 rd ed.

Haslekas C, Stacy RA, Nygaard V, Culianez-Macia FA, Aalen RB (1998) The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. Plant Mol Biol **36**: 833-845

Haslekas C, Viken MK, Grini PE, Nygaard V, Nordgard SH, Meza TJ, Aalen RB (2003) Seed 1-Cysteine Peroxiredoxin Antioxidants Are Not Involved in Dormancy, But Contribute to Inhibition of Germination during Stress. Plant Physiol **133**: 1148-1157

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, Corpas FJ, Gómez M, Del rio LA, Sevilla F (1993) SALT-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. Physiol. Plant **89**: 103-110

Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell Environ **23**: 853-862

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

Hippeli S, Heiser I, Elstner EF (1999) Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insights and analogies between animals and plants. Plant Physiol. Biochem **37**: 167-178

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

Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12333-12338

Hoefnagel MHN, Millar AH, Wiskich JT, Day DA (1995) Cytochrome and alternative respiratory pathways complete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys* **318**: 394-400

Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu.Rev.Biochem.* **54**:237-271

Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* **383**: 347-36

Horling F, Baier M, Dietz K-J (2001) Redox-regulation of expression of the peroxide-detoxifying chloroplast 2-cystein peroxiredoxin in the liverwort *Riccia fluitans*. *Planta* **214**: 304-313

Horling F, König J, Dietz K-J (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

Horling F, Lamkemeyer P, König J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, Dietz K-J (2003) Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 317-325

Huang X, Von Rad U, Durner J (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**: 914-923

Ian M Moller (2001) Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review. Plant Physiology Molecular Biology* **52**: 561-591

Imallay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol* **57**: 395-418

Imlay JA, Linn S (1988) DNA damage and oxygen toxicity. *Science* **240**: 1302-1309

Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S (1996) Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from Komatsuma (*Brassica rapa*). *Plant Science* **120**: 11-18

Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Schell D (1997) Elicitor-stimulated 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) Tansley review no 94 - Thioredoxins: Structure and function in plant cells. *New Phytologist* **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, Cha MK, Kim IH (2000) Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem* **275**:2924-2930

Jeong W, Parck SJ, Chang TS, Lee DY, Rhee SG (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 J.A., del Río L.A, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology.* **114**: 275-284

Johnson TC, Cao RQ, Kung JE, Buchanan BB (1987) Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta* **171**:321-331

Jonsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Poole LB, Lowther WT (2005) Structural basis for the retroreduction of inactivated peroxiredoxin by human sulfiredoxin. *Biochemistry* **44**: 8634-8642

Kallis GB, Holmgren, A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**:10261-10265

- Kandlbinder A, Finkemeier I, Wormuth D, Hanitzsch M, Dietz KJ** (2004) The antioxidant status of photosynthesising leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum* **120**: 63-73
- 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- α . *J Biol Chem* **273**: 6297-6302
- Kantardjieff K, Rupp B** (2003) *Protein Sci* **12**:1865-1871
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Greissen G, Mullineux P** (1997) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*. **284**: 654-657
- Kiba A, Nishihara M, Tsukatani N, Nakatsuka T, Kato Y, Yamasura S.** (2005) A peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. *Plant Cell Physiol* **46**: 1007-1015
- Kieselbach T, Bystedt M, Hynds P, Robinson C, Schröder WJP** (2000) A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* thylakoid lumen. *FEBS Letters* **480**: 271-276
- 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)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem* **263**: 4704-4711
- Kim SJ, Woo JR, Hwang YS, Jeong DG, Shin DH, Kim K, Ruy SE.** (2003) The tetrameric structure of Haemophilus influenzae hybrid Prx5 reveals interactions between electron donor and acceptor proteins. *J. Biol. Chem.* **278**: 10790-10798
- Kitano K, Niimura Y, Nishiyama Y, Miki K** (1999) Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from *Amphibacillus xylanus*. *J Biochem (Tokyo)* **126**: 313-319
- Knoops B, Clippe A, Bogard C, Aarsalane 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
- Knowles RG, Moncada S** (1994) Nitric-oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258

Knox JP, Dodge AD (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* **24**: 889-869

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 co-migratory protein (Bcp). *Biochem J* **351**: 107-114

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

Kowaltowski AJ, Costa ADT, Vercesi A E (1998) Activation of the potato plant uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. *FEBS Letters*. **425**. 213-216

Kresheck GC, Vitello LB, Ermann J E (1995) Calorimetric studies on the interaction of horse ferricytochrome c and yeast cytochrome c peroxidase. *Biochemistry* **34**: 8398-405

Kropotov AV, Grudinkin PS, Plekach NM, Gavrilov BA, Tomilin NV, Zhivotovky B (2004) Downregulation of peroxiredoxin V stimulates formation of etoposide-induced double-strand DNA breaks. *FEBS Letters* **572**: 75-79

Kruft V, Eubel H, Jansch L, Werhahn W, Braun HP (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 1694-1710

Kummar S, Patil BC, Sinha SK (1990) Cyanide resistant respiration is involved in temperature rise in ripening mangoes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 818-822

Kwon SJ, Park JW, Choi WK, Kim IH, Kim K (1994) Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **201**: 8-15

Laloi C, Rayapuram M, Chartier Y, Grienenberger J-M, Bonnard G, Meyer Y (2002) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14144-14149

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, Grienberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *PNAS* **98**:14144-14149

Lambers H (1982) Cyanide-resistant respiration. A non-phosphorylating electron-transport pathway acting as an energy overflow. *Physio. Plant.* **58**:148-154

Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* **18**: 1250-1256

Lamotte-Guery F, Pruvost C, Minard P, Delsuc MA, Miginiac-Maslow M, Schmitter JM, Stein M, Decottignies P (1997) Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha 2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Engineering* **10**:1425-1432

Lankemeyer 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. *The Plant Journal*. **45**: 968-981

Laurent, Moore EC, Reichard P (1964) Enzymatic Synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *E. coli* B. *J.Biol.Chem.* **239**:3436-3444

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

Leesch VW, Bujons J, Mauk AG, Hoffman BM (2000) Cytochrome C peroxidase-cytochrome c complex: locating the second binding domain on cytochrome c peroxidase with site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**: 10132-9

Lemaire S (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosyn. Res.* **79**:305-318

Lemmon MA, Flanagan JM, Treutlein HR, Zhang J, Engelman DM (1992) Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* **31**: 12719-12725

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593

Lim MJ, Chae HZ, Rhee SG, Yu DY, Lee KK, Yeom YI (1998) The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene* **216**: 197-205

Lim YS, Cha MK, Kim HK, Uhm TB, Park JW, Kim K, Kim IH (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 273-280

Lindley H. (1960) Study of the Kinetics of the Reaction Between Thiol Compounds and Chloroacetamide. *Biochemical Journal* **74**:577-584

Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Oin HJ, Wang DW (2006) Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Research*. **16**: 287-296

Loh E (1991) *Methods* **2**: 11-19

Magnotta SM, Gogarten J (2002) Multi site polyadenylation and transcriptional response to stress of a vacuolar type H⁺-ATPase subunit A gene in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **2**: 3

Majander A, Finel M, Wikstrom M (1994) Diphenyliodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial nadh-ubiquinone oxidoreductase (Complex-I). *J. Biol. Chem.* **269**: 21037-21042

Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll Maite chloroplasts determined by comparative proteomics. *The plant Cell*. **17**: 3111-3140

Marcus F, Chamberlain S, Chu C, Masiarz F, Shin S, Yee BC, Buchanan BB (1991) Plant Thioredoxin h: an Animal-like Thioredoxin Occurring multiple cell compartments. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **287**: 195-198

Matsuda Y, Okuda T, Sagisaka S (1994) Regulation of protein synthesis by hydrogen peroxide in crowns of winter wheat. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 906-909

Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 8271-8276

- McIntosh L** 1994 Molecular-biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **105**: 781-786
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol Chem.* **244**:6049-6055
- Meeuse BJD** (1975) Thermogenic respiration in aroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology.* **26**: 117-126
- Mehler, AH** (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**: 65-77
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP** (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol* **347**:394-402.
- Millar HA, Haezlewood JL, Kristensen BK, Braun HP, Moller IM** (2005) The plant mitochondrial proteome. *TRENDS in Plant Science.*10: 36-43
- Millar HA, Sweetlove LJ, Giegé P, Leaver CJ** (2001) Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome. *Plant Physiology.* 127: 1711-1727
- Millenaar FF., Benschop JJ, Wagner AM, Lambers H** (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **118**: 599-607
- Mittler R, Zilinskas BA** (1992) Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.* **267**: 21802-21807
- Moller IM** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 561-591
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EJA** (1991) Nitric-oxide-physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews.* **43**: 109-142
- Montemartini M, Kalisz HM, Hecht HJ, Steinert P, Flohe L** (1999) Activation of active-site cysteine residues in the peroxiredoxin-type trypanothione peroxidase of *Crithidia fasciculata*. *Eur J Biochem* **264**: 516-524

Moore AL, Siedow JN (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant-mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1059**: 121-140

Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN (1985) Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8059-8063

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

Motohasi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11224-11229

Mullineaux P, Ball L, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Karpinski S (2000) Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of Arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy?. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1531-1540

Navaza J (1994) *Acta Crystal A* **50**: 157-163

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 1237-1247

Nguyen-nhu T and Knoops B (2003) Mitochondrial and cytosolic expression of human peroxiredoxin 5 in *Saccharomyces cerevisiae* protect yeast cells from oxidative stress induced by paraquat. *FEBS Lett* **544**: 148-152

Noctor, G, Foyer, CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol.* **498**: 249-279

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

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

Ordentlich A, Linzer RA, Raskin I (1991) Alternative respiration and heat evolution in plants. *Plant Physiology.* **97**: 1545-1550

Palmer JM (1976) The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann Rev. Plant Physiol.* **27**: 133-157

Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **275**: 5723-5732

Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* **275**: 16296-16301

Peltier J B, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Libertes DA, Soderberg L, Roepstorff P, von Heijne G, van Wijk KJ (2002) Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell.* **14**: 211-236

Peltier JB, Ytterberg AJ, Sun Q, van Wijk KJ (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast and versatile fractionation strategy and functional implications. *J. Biol. Chem.* **279**: 49367-49383

Peng Y, Yang PH, Ng SSM, Lum CT, Kung HF, Lin MC (2004) Protection of *Xenopus laevis* embryos against alcohol-induced delayed gut maturation and growth retardation by peroxiredoxin 5 and catalase. *J. Mol. Biol.* **340**: 819-827

Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628

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*

Prasad TK, Anderson MD, Stewart CR (1995) Localization and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling-acclimated maize seedlings. *Plant Physiol.* **108**: 1597-1605

Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR. (1994). Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell.* **6**: 1301-1310

Prospéri MT, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G (1993) A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem* **268**: 11050-11056

Puntarulo S, Sanchez RA, Boveris A (1988) Hydrogen-peroxide metabolism in soybean embryonic axes and the onset of germination. *Plant Physiol.* **86**: 626-630

Purvis AC, Shewfelt RL (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant-tissues. *Physiol. Plant.* **88**: 712-718

Purvis AC, Shewfelt RL, Gepgogaine JW (1995) Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit. *Physiol. Plant.* **94**: 743-749

Purvis AC 1997 Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol Plant.* **100**: 165-170

Rao MV and Davis KR (1999) Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *Plant J.* **17**: 603-613

Raskin I, Ehmann A, Melander WR, Meese BJD (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat-production in *Arum Lilies*. *Science.* **237**: 1601-1602

Rasmusson AG, Mendelhartvig J, Moller IM, Wiskich JT (1994) Isolation of rotenone-sensitive NADH-ubiquinone reductase (Complex-I) from red beet mitochondria. *Physiol. Plant.* **90**: 607-615

Rasmusson AG, Heiser V, Zabaleta E, Grohmann L (1998) Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics.* **1364**: 101-111

Rey P, Cuine 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.* **41**: 31-42

Rhee SG, Kang SW, Chang T-S, Jeong W, Kim K (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **52**: 35-41

Rhee GS (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. *Current opinion in cell biology.* **17**: 173-189

Rhee GS, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. *Free Radical Biology and Medicine* **38**: 1543-1552

Rho BS, Hung LW, Holton JM, Vigil D, Kim SI, Park MS, Terwilliger TC, Pedelacq JD Functional and Structural Characterization of a Thiol Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **361**:850-863

Ribas-Carbo M, Berrly JA, Azcon-Bieto J, Siedow JN (1994) The reaction of the plant mitochondrial cyanide resistant alternative oxidase with oxygen. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* **1188**: 205-212

Ritcher C. and Schweizer M (1997) Oxidative stress in mitochondria. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 169-200. Scandalios J.G (ed), Cold spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr J.E, Rodermeil S, Inze D, Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* **32**: 329-342

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, Jacquot JP (2002a) 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, Gelhaye E, Corbier C, Jacquot JP (2004a) Active site mutagenesis and phospholipid hydroperoxide reductase activity in poplar type II peroxiredoxin. *Physiologia Plantarum.* **120**: 57-62

Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP (2004b) Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol.* **134**: 1027-1036

Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martín F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP (2004b) Poplar peroxiredoxin Q: a thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiology.* **134**: 1207-1038

Rouhier N, Jacquot JP (2003) Molecular and catalytic properties of a peroxiredoxin glutaredoxin hybrid from *Neisseria meningitidis*. *FEBS Letters*. **554**: 149-153

Rouhier N and Jacquot JP (2005) The plant multigenic family of lthiol peroxidases. *Free Radicals Biology and Medicine*. **38**: 1413-1421

Sakamoto A, Tsukamoto S, Yamamoto H, Ueda-Hashimoto M, Takahashi M, Suzuki H, Morikawa H (2003) Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant J* **5**: 841-851

Sandalio LM, Del Rio LA (1987) Localization of superoxide dismutase in gluoxisomes from *Citrullus vulgaris*. Functional implications in cellular metabolism. *J. Plant Physiol*. **127**: 395-409

Scandalios JG, Tong W-F, Roupakias DG (1980) Cat3, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: genetics, intracellular location, and some biochemical properties: *Mol. Gen. Genet*. **179**: 33-41

Scandalios JC (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*. **101**: 7-12

Scheffler IE (2000) A century of mitochondria research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*. **1**: 3-31

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

Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol Plant* **112**: 487-494.

Siedow JN (1995) Presidents symposium: unraveling unique features of plant mitochondria. *Plant Physiol*. **108**: 10

Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**: 20346-20354

Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. **279**: 43821-43827

Skubatz H, Williamson PS, Schneider EL, Meeuse BJD (1990) Cyanide-intensive respiration in thermogenic flowers of *Victoria* and *nelumbo*. *J. Exp. Bot.* **41**: 1335-1339

Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to wather deficit and desiccation. *Tansley Review. 52: New Phytol* **125**: 27-58

Smirnoff N (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Ann. Bot.* **78**: 661-669

Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**:1455-1464

Smith Amo, Ratcliff R.G. Sweetlove L.J (2004) Activation and function of plant mitochondrial uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 51944-51952

Stacy RA, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB (1996) A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Mol Biol* **31**: 1205-1216

Stacy RA, Nordeng TW, Culianez-Macia FA, Aalen RB (1999) The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, *PER1*, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J* **19**: 1-8

Storz G, Jacobson FS, Tartaglia LA, Morgan RW, Silveira LA, Ames BN (1989) An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of *ahp*. *J Bacteriol* **171**: 2049-55

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-30

Takahashi N, Hayano T, Suzuki M (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**: 473-475

Tanguay RL, Gallie DR (1996) The effect of the length of the 3'-untranslated region on expression in plants. *FEBS Lett* **394**: 285-288

Thurman RG, Ley HG and Scholz R (1972) Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase. *Eur J Biochem* **25**: 420-430

Tiwari BS., Belenghi B, Levine A (2002) Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of mitochondrial Permeability Transition and Programmed Cell Death.. *Plant Physiology*. **128**: 1271-1281

Vanlerberghe GC, McInthosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. **48**: 703-734

Vedel F, Lalanne E, Sabar M, Chetrit P, De Paepe R (1999) The mitochondrial respiratory Chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies: *Plant Physiol. Biochem*. **37**: 629-643

Venugopalan C, Kapoor HC (1997) Single step isolation of plant RNA. *Phytochemistry* **46**: 1303-1305

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

Verniquet F, Gaillard J, Neuburger M, Douce R (1991) Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem J*. **276**: 345-353

Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, Toledano MB, Hidalgo E (2005) A cysteine-sulfenic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **21**:8875-8880

Wadsworth GJ, Redinbaugh MG, Scandalios JG (1988) A procedure for the small-scale isolation of plant RNA suitable for RNA blot analysis. *Anal Biochem* **172**: 279-283

Wagener AM (1995) A role for active oxygen species and second messengers in the induction of alternative oxidase gene-expression in *petunia hybrida* cells. *Febs Letters*. **368**: 339-342

Wagner AM, Krab K (1995) The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiol. Plant*. **95**: 318-325

Wang MX, Wei A, Yuan J, Trickett A, Knoops B, Murell GAC (2002) Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis. *FBBS Letters* **531**: 359-362

Watanabe T. and Sakai S (1998). Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). *Planta* **206**: 570-576

Wenk J Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharffetter-Kochanek K (1999) Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1 mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* **174**: 25869-25876

Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D, Langebartels CH, Sandermann Jr H (1994) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **106**: 1007-1014

Wisniewski JP, Cornille P, Agnel JP, Montillet JL (1999) The extensin multigene family responds differentially to superoxide or hydrogen peroxide in tomato cell cultures. *FEBS Letters.* **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, 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

Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus A (2002) Dimers to doughnuts: Redox-sensitive oligomerization of 2-Cysteine peroxiredoxins. *Biochemistry* **41**: 493-5504

Wood ZA, Pool LB, karplus PA. (2003a) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signalling. *Science.* **300**: 592-594

Wood ZA, Schröder E, Harris JL, Poole LB (2003b) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 32-40

Wu G, Schortt BJ, Lawrence E, Fitzsimmons KC, Sham DM. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucanase oxidase in transgenic potato plants. *The plant Cell.* **7**: 1357-1368

Wu G, Shortt BJ, Lawrence E, Fitzsimmons KC and Levine EB. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* **115**: 427-435

Xu ZY, Mayer A, Muller E, Wickner W. (1997) A heterodimer of thioredoxin and I-2(B) cooperates with Sec18p (NSF) to promote yeast vacuole inheritance. *Journal of Cell Biology* **136**:299-306

Yamamoto H, Miyake C, Dietz KJ, Tomizawa K, Murata N, Yokota A (1999) Thioredoxin peroxidase in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* **447**: 269-273.

Yang KS, Kang SW, Woo HLA, 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

Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY (2000) Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **268**: 921-927

