

105



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

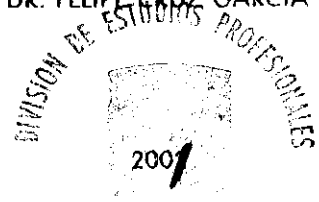
IDENTIFICACION DE UN cDNA QUE CODIFICA PARA UNA TIORREDOXINA TIPO h EN Nicotiana glauca.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JAVIER ANDRES JUAREZ DIAZ



TESIS CON
FOLIO DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FELIPE CRUZ GARCIA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARIA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**“Identificación de un cDNA que codifica para una tioredoxina tipo h en  
*Nicotiana glauca*”**

realizado por JUAREZ DIAZ JAVIER ANDRES

con número de cuenta 09755697-2, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Felipe Cruz Garcia

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario

Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Suplente

Dra. Sonia Vázquez Santana

**FACULTAD DE CIENCIAS  
U N A M.**

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García y con apoyos de los proyectos:

- CONACyT J31752-N
- DGAPA IN202 799

Además, durante el desarrollo de esta tesis se recibió la beca de CONACyT No. 2918.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, **Edna Díaz** y **Jesús Juárez**, quienes saben que el amor, apoyo y confianza que pueden darles a un hijo son fundamentales para su desarrollo como ser humano porque me lo han dado en abundancia. Por eso les debo todo lo que soy y tengo hoy en día. Los amo con todas las fuerzas de mi corazón.

A mi hermana **Edna Suárez** que siempre ha estado junto a mi brindándome un enorme amor y apoyo incondicional en todo.

A mi hermano **Carlos Suárez** que con su amor y confianza ha sido un gran apoyo para mí. Además, me ha dado la oportunidad de tener unos sobrinos maravillosos, a los que quiero con toda el alma: **Carlos, Pablo** y **Daniela**.

A mi otro hermano, **Luis Toledo**, cuyo apoyo incondicional ha sido de gran importancia en mi vida y de quien he aprendido muchos valores de la vida.

A **Felipe Cruz García**, quien además de dirigir maravillosamente mi trabajo, ha sabido ser un gran amigo al que quiero, admiro, respeto y considero como segundo padre.

De manera MUY ESPECIAL, quiero agradecer a **Judith Márquez** (mi “mamá puma”) todo el entusiasmo y confianza que depositó en mí a lo largo de la carrera para que este paso de mi vida se haya hecho posible.

A todos los profesores que tuve a lo largo de mi carrera por compartir conmigo, como estudiante, parte de su conocimiento. En especial quiero agradecer a **Mague Collazo, Pedro García, Luis Felipe Jiménez, Judith Márquez, Adolfo Navarro** y **Victor Valdés**, quienes, a lo mejor sin saberlo, el entusiasmo con el que imparten sus clases y comparten momentos con sus alumnos, hicieron que mi deseo de continuar el camino para llegar a ser un gran biólogo sea aún mayor.

A mis amigos del alma: **Gaby Galindo, Jazmín y Gloria Ménez, Oscar Hans Serrano, Iliana Bello, Eduardo de la Peña, Juan José Quijano, Yuridia Cruz, Vanessa Murray, Reyna Ma. Pacheco, Erwin Martí, Karina Jiménez** y **Patty Morales** por todos los momentos que hemos vivido y por el apoyo que me han brindado todo el tiempo que llevamos juntos.

A mi abuelita **Rosa**, a mi tío **Rodolfo Díaz** (tío “Chapa”), a mis tíos y padrinos **Eduardo** y **Vicky Mouret**, así como a mis primos **Lalo, Alejandro** y **Luis Adrián Mouret** por estar siempre conmigo dándome un constante estímulo para seguir adelante.

A **Mary Paz Sánchez** por darme los *tips* necesarios para poder producir los anticuerpos. En especial quiero agradecer a **Atonatiu E. Gómez** y **Rosalío** por su gran ayuda en el bioterio de la Facultad de Química para la obtención de los anticuerpos. Por otra parte, también a **Manuela Nájera** por todas las porras y ánimos que me dio cuando pensaba que todo estaba perdido.

También les agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio: **Grethel Busot**, a la que quiero y admiro muchísimo; **Gaby García** por ser también una gran compañera y amiga; **Carmen Parra** por todos sus regaños y consejos técnicos; **Vanessa Maya** y **Adriana Camacho** por su gran compañerismo, consejos y *cigarette brakes*; **Dra. Irma Bernal** que, aunque no nos deje oír música en el laboratorio, contribuye a formar el ambiente tan agradable que existe en nuestro laboratorio. Finalmente, en forma muy especial, a **Luis Sánchez** por su apoyo a nivel tanto técnico como personal.

A todos ustedes y muchos otros más: ¡¡¡GRACIAS!!!



"La ciencia, que tiene por objeto la verdad, es difícil desde un punto de vista y fácil desde otro. Lo prueba la imposibilidad que hay de alcanzar la completa verdad, y la imposibilidad de que se oculte por entero. Cada filósofo explica algún secreto de la naturaleza. Lo que cada cual en particular añade al conocimiento de la verdad no es nada, sin duda, o es muy poca cosa, pero la reunión de todas las ideas presenta importantes resultados."

Aristóteles.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.1 Tiorredoxinas	2
1.2 Tiorredoxina reductasa	4
1.3 Tiorredoxinas vegetales	5
1.4 Tiorredoxinas cloroplastídicas (Trx m y Trx f)	6
1.5 Tiorredoxinas citoplásmicas (Trxs h)	9
1.6 Algunas funciones biológicas de las tiorredoxinas animales	12
ANTECEDENTES INMEDIATOS	14
2.1 Autoincompatibilidad en angiospermas	14
2.2 Autoincompatibilidad gametofítica	14
2.3 Genes modificadores	15
OBJETIVOS	16
ESTRATEGIA	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1 Determinación del producto codificado en el cDNA AFLP-25 83.6	18
5.2 Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes tiorredoxinas incluyendo la estructura primaria inferida a partir del cDNA TrxN	18
5.3 Amplificación de la región codificante del cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TrxN)	19
5.4 Clonación del cDNA TrxN	22
5.5 Sobreexpresión del cDNA TrxN	24
5.6 Comprobación de que la proteína que muestra un patrón de sobreexpresión es la proteína de fusión	26
5.7 Preparación de sonicados bacterianos a gran escala con la proteína de fusión	27
5.8 Purificación de la proteína de fusión	28
5.9 Proteólisis de la proteína de fusión para obtener a la posible tiorredoxina libre de la GST	29
5.10 Cuantificación de proteínas	30
5.11 Ensayo de actividad enzimática para tiorredoxinas	30

5.12	Producción y semipurificación de los anticuerpos policlonales contra la TrxN	31
5.13	Titulación de anticuerpos	32
5.14	Ensayo de inmunodetección en extractos de proteína total de estilos de <i>N. alata</i> con los anticuerpos policlonales contra la TrxN	33
<b>RESULTADOS</b>		<b>34</b>
6.1	Producto codificado por el cDNA AFLP-25 83.6	34
6.2	Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes tiorredoxinas	35
6.3	Amplificación y clonación del cDNA TrxN	37
6.4	Sobreexpresión del cDNA TrxN	38
6.5	Purificación y separación de la proteína de fusión para la obtención de la posible tiorredoxina	43
6.6	Ensayo de actividad de tiorredoxinas	45
6.7	Producción de anticuerpos policlonales contra la TrxN	46
6.8	Inmunodetección de tiorredoxina en estilos de <i>N. alata</i> utilizando los anticuerpos policlonales de conejo contra la TrxN	47
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>49</b>
7.1	¿Para qué codifica el marco de lectura contenido en el cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TrxN)?	49
7.2	Comprobación de la identidad del producto codificado por el cDNA TrxN por medio de un ensayo de actividad enzimática específico para las tiorredoxinas	50
7.3	Producción de anticuerpos policlonales de conejo contra la TrxN	51
7.4	Perspectivas	52
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>56</b>
<b>APÉNDICE</b>		<b>61</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1.</b> Mecanismo de la reacción de reducción de disulfuro de una proteína blanco dependiente de NADPH por el sistema de tiorredoxina.	2
<b>FIGURA 2.</b> Esquema del mecanismo redox de la tiorredoxina (Trx) sobre una proteína blanco (Bco).	9
<b>FIGURA 3.</b> Esquema del vector pGEX 4T-2.	20
<b>FIGURA 4.</b> Secuencia del cDNA AFLP-25 correspondiente a la clona 83.6.	34
<b>FIGURA 5.</b> Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes secuencias de tiorredoxinas incluyendo a la Trx de <i>N. alata</i> , inferida a partir del cDNA TrxN ( <i>N. alata</i> TrxN).	36
<b>FIGURA 6.</b> Amplificación por PCR del cDNA TrxN.	37
<b>FIGURA 7.</b> Análisis de las colonias transformantes con el vector pGEX 4T-2 recombinante.	38
<b>FIGURA 8.</b> Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del cDNA TrxN original (cDNA TrxN), de la clona B (pGEX TrxN B) y H (pGEX TrxN H).	40
<b>FIGURA 9.</b> Alineamiento de los 50 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la secuencia aminoacídica inferida a partir del cDNA TrxN original (Prot cDNA TrxN) con aquéllas inferidas a partir del pGEX cDNA TrxN B (Prot B) y H (Prot H) tomando en cuenta la supuesta inserción (CI) y considerándola como error de secuenciación (SI).	40
<b>FIGURA 10.</b> Análisis electroforético por SDS-PAGE de la sobreexpresión del cDNA TrxN.	41
<b>FIGURA 11.</b> Análisis por western-blot de la proteína de fusión (GST-tiorredoxina).	42
<b>FIGURA 12.</b> Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad.	43
<b>FIGURA 13.</b> Proteólisis de la proteína de fusión.	44

<b>FIGURA 14.</b> Análisis por SDS-PAGE de los procesos de purificación y proteólisis de la proteína recombinante.	45
<b>FIGURA 15.</b> Ensayo de actividad de tiorredoxina.	46
<b>FIGURA 16.</b> Titulación de los anticuerpos policlonales contra la tiorredoxina recombinante obtenidos a partir de suero de conejo.	47
<b>FIGURA 17.</b> Análisis por western-blot de los anticuerpos policlonales de conejo contra la TrxN sobre 6µg de proteínas totales estilares de <i>N. alata</i> .	48

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>TABLA 1.</b> Secuencias reguladoras de las enzimas blanco en cloroplasto y su principal tiorredoxina activadora.	8
<b>TABLA 2.</b> Clasificación de los genes modificadores en el sistema de AI de acuerdo a su función.	15
<b>TABLA 3.</b> Reactivos y concentraciones de cada uno de los utilizados para la amplificación del cDNA.	22
<b>TABLA 4.</b> Condiciones de PCR para la amplificación del cDNA TrxN.	22
<b>TABLA 5.</b> Diluciones utilizadas para determinar el título de los anticuerpos obtenidos.	32

## ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Autocompatible
<b>AFLP</b>	Amplificación de fragmentos polimórficos en longitud
<b>AI</b>	Autoincompatibilidad / autoincompatible
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FAD / FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido oxidado / reducido
<b>FBPasa</b>	Fructosa 1,6-bifosfatasa
<b>FTR</b>	TrxR heterodimérica dependiente de ferredoxina
<b>G6PDH</b>	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
<b>GST</b>	Glutación-S-transferasa
<b>IPTG</b>	Isopropiltiogalactósido
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>NADP<sup>+</sup> / NADPH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado / reducido
<b>PBS</b>	Amortiguador fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PRDX</b>	Tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina
<b>PRK</b>	Fosforribulocinasa
<b>Membrana PVDF</b>	Membrana de difluoruro de polivinilideno
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>SBPasa</b>	Sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa
<b>SDS</b>	Sodio dodecil sulfato
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>Trx</b>	Tiorredoxina
<b>TrxR</b>	Tiorredoxina reductasa
<b>Trx-S<sub>2</sub></b>	Tiorredoxina oxidada
<b>Trx-(SH)<sub>2</sub></b>	Tiorredoxina reducida

## RESUMEN

Las tiorredoxinas (Trxs), proteínas ubicuas y pequeñas (12-14 kDa), son las enzimas más representativas de una familia de proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas desde procariontes hasta eucariontes y que poseen actividad de oxidorreductasa ditiol-disulfuro. Contienen un sitio extremadamente activo cuya secuencia consenso es -Cys-Gly-Pro-Cys-, el cual es reducido a partir de NADPH por medio de la reducción de la flavoproteína tiorredoxina reductasa (TrxR), siendo entonces la Trx el sustrato de la TrxR.

Las Trxs están involucradas en varios sistemas bioquímicos, entre los que se encuentra el sistema de autoincompatibilidad (AI) esporofítico de *Brassica* (Brassicaceae). En nuestro grupo de investigación se estudia el sistema de AI gametofítico en *Nicotiana glauca* (Solanaceae). En este sistema de AI, las S-RNasas son las determinantes genéticas del rechazo del polen alelo-S específico. Sin embargo, se ha demostrado que otros factores, conocidos como genes modificadores, son necesarios para modular la actividad biológica de las S-RNasas. Con el fin de identificar y clonar genes modificadores dentro de dicho sistema, por medio de la técnica cDNA-AFLP, se aisló un cDNA, denominado cDNA AFLP-25 83.6, que contiene un marco de lectura abierto (cDNA TrxN) que codifica para una proteína de aproximadamente 16.8 kDa con un dominio de tiorredoxina en su estructura primaria.

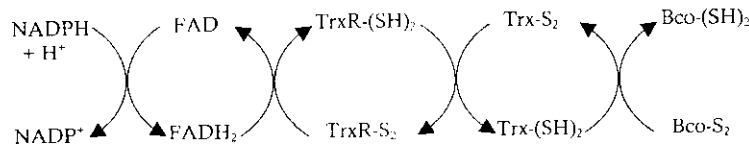
En este trabajo se sobreexpresó y purificó el producto del cDNA TrxN, el cual es una proteína citoplásmica con actividad de tiorredoxina (Trx tipo *h*). Además, se generaron las herramientas fundamentales, como lo son la proteína recombinante pura y los anticuerpos policlonales contra la TrxN, que serán de gran utilidad para poder realizar los estudios correspondientes que puedan proveer de la información necesaria para entender la función de esta tiorredoxina dentro de las redes de interacción polen-pistilo, en específico dentro del sistema de AI gametofítico en *N. glauca*.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 TIORREDOXINAS

Las tiorredoxinas (Trxs) son proteínas ubicuas y pequeñas (12-14 kDa) que tienen un sitio extremadamente activo (Meyer *et al.*, 1999), cuya secuencia consenso es -Cys-Gly-Pro-Cys-. Son las enzimas más representativas de una familia de proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas y poseen actividad de oxidoreductasa ditiol-disulfuro (Wollman *et al.*, 1988).

La primera Trx fue purificada de *Escherichia coli* y se encontró que actúa como una proteína donadora de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa (RRasa), que es una enzima esencial para la síntesis de DNA (Laurent *et al.*, 1964). La energía necesaria para la reducción de ribonucleótidos se origina a partir de NADPH y es transferida por medio de una cascada de tres proteínas por intercambios ditiol-disulfuro. Primero, la flavoproteína tiorredoxina reductasa (TrxR) dependiente de NADPH colecta los electrones de NADPH y los usa para reducir el puente disulfuro de su propio sitio activo. Este ditiol entonces reduce el puente disulfuro de la Trx oxidada (Trx-S<sub>2</sub>), permitiendo así que la Trx reducida (Trx-(SH)<sub>2</sub>) reduzca a la RRasa (Laurent *et al.*, 1964; Meyer *et al.*, 1999). Por lo tanto, la tiorredoxina es el sustrato de la tiorredoxina reductasa, la reducción es dependiente de NADPH y se forma el sistema de Trx y NADPH-TrxR (Meyer *et al.*, 1999) (figura 1).



**Figura 1.** Mecanismo de la reacción de reducción de disulfuro de una proteína blanco dependiente de NADPH por el sistema de tiorredoxina. El sitio activo de la tiorredoxina reductasa oxidada (TrxR-S<sub>2</sub>) se reduce (TrxR-(SH)<sub>2</sub>) vía FAD, el cual es reducido (FADH<sub>2</sub>) a partir de NADPH + H<sup>+</sup>. La tiorredoxina oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) es entonces reducida por TrxR-(SH)<sub>2</sub> y la tiorredoxina reducida (Trx-(SH)<sub>2</sub>) rompe el puente disulfuro de su proteína blanco por reducción, generando en ésta dos grupos tiol (Bco-S<sub>2</sub> → Bco-(SH)<sub>2</sub>).

Las Trxs reportadas desde procariontes hasta eucariontes tienen del 27 al 69% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con la Trx de *E. coli*. Los modelos indican

que todas estas proteínas tienen estructuras tridimensionales similares a pesar de la gran variación que existe en sus secuencias aminoácidas (Eklund *et al.*, 1991). Por ejemplo, la estructura primaria de la tiorredoxina del bacteriófago T4 (Trx T4), reportada por Sjöberg y Holmgren (1972), al ser comparada con la de la Trx de *E. coli* (Holmgren, 1968) no se encontró suficiente similitud entre ellas; sin embargo, la cristalización de la Trx T4 en su forma oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) y la determinación de su estructura tridimensional (Söderberg *et al.*, 1978) mostró que ésta y la de *E. coli* (cristalizada por Holmgren y Söderberg (1970) y descrita su estructura tridimensional por Holmgren *et al.*(1975)) tienen un plegamiento y estructura tridimensional similares (Holmgren, 1985).

Todas las tiorredoxinas comparten un plegamiento común con una sucesión de elementos estructurales secundarios, incluyendo a más del 75% de los residuos de la proteína (Holmgren, 1985):  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  y  $\alpha 4$ , que le brinda una estructura compacta globular con cinco láminas beta, tres paralelas y dos antiparalelas (Holmgren, 1985), formando una región hidrofóbica rodeada por cuatro  $\alpha$ -hélices sobre la superficie externa (Holmgren, 1985; Powis y Montfort, 2001). Esta conformación inusualmente compleja para una proteína de 12 kDa (la de *E. coli*) explica la estabilidad excepcional de las Trxs (Holmgren, 1985).

Como es de esperarse, los residuos en la región del sitio activo de las tiorredoxinas se encuentran altamente conservados. Los dos residuos de cisteína, involucrados en la formación del puente disulfuro del centro activo, forman una protuberancia entre la segunda lámina beta y la segunda hélice, formando la primera vuelta de la segunda hélice (Holmgren, 1985; Eklund *et al.*, 1991). A esta estructura terciaria estable que se forma por el sitio activo se le conoce como dominio Trx (Eklund *et al.*, 1991). De esta manera, el sitio activo queda accesible en un lado de la estructura, es decir, queda expuesto al solvente y así participa en reacciones redox a través de la oxidación reversible de su sitio activo de Trx-(SH)<sub>2</sub> a Trx-S<sub>2</sub>, catalizando las reacciones de intercambio ditiol-disulfuro de sus proteínas blanco (Clement-Metral *et al.*, 1986).

Además de los residuos del sitio activo, Cys-32, Gly-33, Pro-34 y Cys-35, también se encuentran conservados entre diferentes Trxs: Phe-12, Val-25, Asp-26, Phe-27, Ala-29, Trp-31, Pro-40, Asp-61, Pro-76 y Gly-92 (Eklund *et al.*, 1991), tomando como referencia de posición a la estructura primaria de la Trx de *E. coli*. Gly-33, Pro-34, e Ile-75 por un lado. Pro-76 más Val-91, Gly-92 y Ala-93 por otro, forman un área plana e hidrofóbica

alrededor del dominio Trx (Eklund *et al.*, 1984), el cual se cree que está involucrado en la unión de la tiorredoxina a otras moléculas proteicas. Del otro lado del sitio activo hay un grupo de residuos cargados, incluyendo Glu-30, Lys-36 y Lys-57 y un residuo aromático, Trp-28, los cuales también se encuentran conservados en otras tiorredoxinas conocidas (Eklund *et al.*, 1984). Los residuos sobre esta última región pueden participar en las reacciones redox, en especial Lys-36 puede formar un ion par tiol-base hacia la reducción de la Trx-S<sub>2</sub> (Kallis y Holmgren, 1980).

Con respecto a los animales, tanto la Trx-1 humana, que es de 104 aminoácidos con una masa molecular de 12 kDa, como la de otros mamíferos contienen, además de las dos cisteínas del sitio activo, tres residuos de cisteína extras, Cys-62, Cys-69 y Cys-73, tomando como referencia de posición la Trx-1 humana (Deiss y Kimchi, 1991; Gasdaska *et al.*, 1994), los cuales pueden conferirle a la Trx-1 propiedades biológicas únicas de mamíferos (Gasdaska *et al.*, 1995; Gasdaska *et al.*, 1996).

Por lo general, a cada proteína que se descubre se le adjudica un nombre y su función relacionándola con un sistema bioquímico en particular. En el caso de las tiorredoxinas, se ha descubierto que están involucradas en al menos doce diferentes sistemas bioquímicos. Las funciones de las tiorredoxinas en los diferentes organismos han evolucionado a partir de una reacción común fundamental a una gran cantidad de funciones especializadas, lo cual es una prueba de su gran importancia, utilidad y especificidad (Arnér y Holmgren, 2000).

## 1.2 TIORREDOXINA REDUCTASA

Para tener una idea clara de la función de las tiorredoxinas, se debe considerar el papel que desempeñan las tiorredoxina reductasas (TrxRs), las cuales son las únicas enzimas conocidas capaces de reducir el sitio activo oxidado de las tiorredoxinas (Powis y Montfort, 2001).

Las TrxRs de mamíferos son enzimas que pertenecen a la familia de las flavoproteínas de nucleótido-disulfuro piridina oxidorreductasas que incluye, como ejemplo, a la glutatión reductasa. Los miembros de esta familia son proteínas homodiméricas y en cada monómero incluye un grupo prostético FAD, un sitio de unión



a NADPH y un sitio activo que contiene un disulfuro redox-activo (Mustacich y Powis, 2000). La TrxR de mamíferos es de 116 kDa y presenta mayor similitud tanto en estructura como en función hacia la glutatión reductasa (Holmgren y Björnstedt, 1995). A diferencia de ésta, la TrxR de *E. coli* tiene un peso de 70 kDa y es un dímero (Holmgren y Björnstedt, 1995). Las TrxRs se dividen en dos clases (Luthman y Holmgren, 1982): (1) las de bajo peso molecular (35 kDa por subunidad), como la de *E. coli* y otros procariontes, levadura, micoplasmas, *Giardia duodenalis*, *Arabidopsis thaliana* y *Methanococcus jannaschii* (Williams *et al.*, 2000) y (2) las de alto peso molecular (55 kDa por subunidad), las cuales se encuentran en eucariontes superiores y están relacionadas en estructura y función a la glutatión reductasa, lipoamida deshidrogenasa y otros miembros de la familia de nucleótido-disulfuro piridina oxidorreductasas (Arscott *et al.*, 1997).

### 1.3 TIORREDOXINAS VEGETALES

Entre los eucariontes, sólo en las plantas existe un gran polimorfismo de tiorredoxinas, ya que en ellas se encuentran tres tipos: la Trx tipo *m* (Trx *m*), la Trx tipo *f* (Trx *f*) y la Trx tipo *h* (Trx *h*), las dos primeras son cloroplastídicas y la tercera citosólica. Los tres tipos de Trxs están codificados en el núcleo, a excepción de la Trx *m* de algas rojas que se encuentra codificada en el genoma del cloroplasto (Reynolds *et al.*, 1994; Reith y Munholland, 1997). En *Arabidopsis* se han descrito cuatro secuencias de Trx *m*, dos del tipo *f* y al menos cinco del tipo *h* (Meyer *et al.*, 1999; Schürmann y Jacquot, 2000). Sin embargo, a diferencia de los animales y *Saccharomyces cerevisiae*, en plantas no se ha encontrado ninguna secuencia de Trx mitocondrial a pesar de que se ha detectado actividad de reductasa disulfuro en este organelo, lo que sugiere que al menos debe existir una Trx mitocondrial vegetal (Meyer *et al.*, 1999; Schürmann y Jacquot, 2000).

La Trx *m* y la Trx *f* son reductoras eficaces *in vitro* en la regulación redox de la malato deshidrogenasa (MDH) y la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), respectivamente (Meyer *et al.*, 1999; Schürmann y Jacquot, 2000). Ambas son reducidas por una TrxR heterodimérica dependiente de ferredoxina (FTR), la cual obtiene su poder reductor a partir de la ferredoxina reducida. Estas tiorredoxinas cloroplastídicas no están involucradas en el flujo energético, sino que actúan modificando estructuralmente a las

proteínas blanco (Meyer *et al.*, 1999). En cuanto a las Trxs h, llamadas así por haber sido originalmente identificadas en tejidos no fotosintéticos (heterótrofos) (Meyer *et al.*, 1999; Schürmann y Jacquot, 2000), son reducidas por una TrxR dependiente de NADPH.

#### 1.4 TIORREDOXINAS CLOROPLASTÍDICAS (TRX M Y TRX F)

Las proteínas reguladas por luz e implicadas en el metabolismo de azúcares fueron las primeras proteínas blanco identificadas en plantas; ésto permitió el descubrimiento de la Trx m y la Trx f (Ruelland y Miginiac, 1999 *in Meyer et al.*, 1999). Las primeras fueron aisladas de cloroplastos de espinaca y chícharo (Meyer *et al.*, 1999). La investigación sobre la regulación por luz de enzimas fotosintéticas en los cloroplastos de plantas resultó en el aislamiento de dos proteínas reguladoras, llamadas ARP<sub>b</sub> y ARP<sub>a</sub> (Schürmann *et al.*, 1976). En 1977 se mostró que la ARP<sub>b</sub> es una tiorredoxina de cloroplasto (Wolosiuk y Buchanan, 1977) y que la ARP<sub>b</sub> de hígado de rata es también una tiorredoxina (Holmgren *et al.*, 1977). Este descubrimiento estimuló el estudio de las funciones reguladoras de la Trx como mensajero redox y también dio lugar al descubrimiento de la FTR, específica de células fotosintéticas oxigénicas (Buchanan, 1980).

El hecho de que existan varias isoformas de tiorredoxinas de cloroplasto y muchas posibles proteínas blanco, ha hecho que su estudio sea bastante complejo y aún sigan sin conocerse bien (Meyer *et al.*, 1999).

El análisis de las secuencias disponibles en la base de datos indica que todas tienen una secuencia en el extremo amino terminal que podría ser un péptido señal compatible con su localización cloroplastídica (Meyer *et al.*, 1999). La secuencia aminoacídica de la Trx f comparte una baja identidad con las otras secuencias conocidas de la familia de las tiorredoxinas, incluyendo a la Trx m. La similitud de secuencia entre la Trx f y la Trx m es del 29%, la cual es ligeramente menor que la que existe entre la Trx f y las tiorredoxinas de mamíferos (Eklund *et al.*, 1991), cuyo porcentaje es cerca del 30% con un máximo de 35% en el caso de la Trx humana (Capitani *et al.*, 2000). De hecho, en condiciones *in vitro*, no siempre se obtiene una clara distinción entre la Trx m y la Trx f y sólo pueden distinguirse por sus estructuras primarias (Schürmann y Jacquot, 2000).

La Trx m está presente en procariontes oxigénicos, algas, monocotiledóneas y dicotiledóneas y se parece mucho a la tiorredoxina de procariontes tanto heterótrofos como fotosintéticos anoxigénicos (Schürmann y Jacquot, 2000). En plantas y algas verdes, esta tiorredoxina se encuentra codificada en el núcleo, pero en las algas rojas su gen fue encontrado en el genoma del cloroplasto (Reynolds *et al.*, 1994; Reith y Munholland, 1997). Lo anterior apoya su origen bacteriano endosimbionte y, por lo tanto, las tiorredoxinas del tipo *m* son consideradas como tiorredoxinas de tipo bacteriano y entre éstas existe una clara relación al compararse las estructuras primarias de todas las Trxs m disponibles en la base de datos (Schürmann y Jacquot, 2000).

De las tiorredoxinas tipo *f* se conocen menos secuencias y se considera que este tipo de Trxs se encuentra restringido a los organismos fotosintéticos eucariontes. Al igual que la Trx m, la Trx f se encuentra codificada en el núcleo y aparentemente derivó del hospedero eucarionte durante la evolución (Shürman y Jacquot, 2000). Las tiorredoxinas del tipo *f* se encuentran altamente conservadas, con un 75 a 90% de identidad de residuos en la proteína madura de dicotiledóneas y con un 60 a 70% de identidad entre dicotiledóneas y monocotiledóneas (Schürmann y Buchanan, 2000 *in* Shürman y Jacquot, 2000).

#### 1.4.1 Enzimas blanco de las tiorredoxinas cloroplastídicas

El hecho de que se puede generar *in vitro* el aumento de la actividad enzimática dependiente de luz por compuestos sulfhidrilos como ditiotreitól (DTT) fue inicialmente asumido como evidencia de que se encuentra involucrada una tiorredoxina reducida. Sin embargo, la prueba final de un evento redox que involucre a la tiorredoxina necesita evidencia experimental de un requerimiento total y la demostración de un puente disulfuro accesible sobre la estructura blanco. De hecho, se ha confirmado la presencia de puentes disulfuro redox-activos en la mayoría de las enzimas reguladas por luz y se ha verificado su papel por mutagénesis sitio-dirigida. Para algunas enzimas, los modelos tridimensionales, basados en cristalografía por rayos X o en modelos inferidos por homología, han dado nociones acerca de los posibles cambios estructurales que se presentan debido a la reducción (Schürmann y Jacquot, 2000).

Las Trxs cloroplastídicas no están involucradas en un flujo energético, sino que actúan como reguladoras de sus proteínas blanco por medio de modificaciones

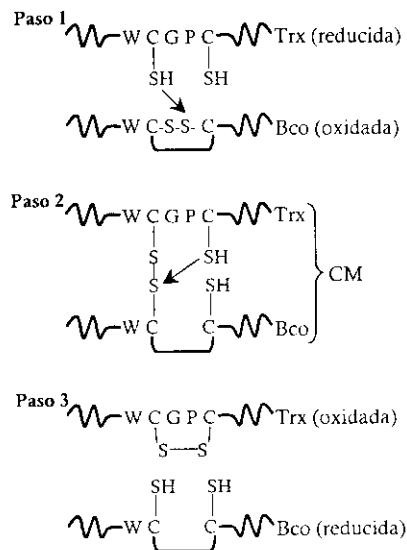
estructurales sobre éstas (Meyer *et al.*, 1999). La comparación de las estructuras primarias de dichas proteínas blanco revela que no existen consensos que contengan residuos de cisteína en la mayoría de las enzimas blanco reguladas por luz, aunque en algunas se ha encontrado una secuencia CXXXXC como el elemento responsable o parte de éste. No obstante, las dos cisteínas pueden también estar separadas por muchos residuos (tabla 1). Para algunas enzimas, en especial aquéllas presentes como isoformas citoplásmicas (*e. g.* FBPasa y MDH), las estructuras reguladoras disulfuro están localizadas sobre orquillas extras o extensiones, indicando que fueron adicionadas durante la adaptación a su función fotosintética. Estas observaciones sugieren que la adaptación de las enzimas a la regulación redox mediada por luz surgió varias veces a lo largo de la evolución (Schürmann y Jacquot, 2000).

**Tabla 1.** Secuencias reguladoras de las enzimas blanco en cloroplasto y su principal tiorredoxina activadora. Los residuos Cys reguladores están en negritas y los residuos adicionales conservados en cursivas (Schürmann y Jacquot, 2000). FBPasa: fructosa 1,6-bifosfatasa; SBPasa: sedoheptulosa 1,7-bifosfatasa; PRK: fosforribulocinasa; NADP-MDH: malato deshidrogenasa dependiente de NADP; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Enzima blanco	Planta	Sitio regulador	Activador
FBPasa	Espinaca	<b>Cys-155</b> X <sub>18</sub> <b>Cys-174</b> Val Val Asn Val Cys179	Trx f
SBPasa	Trigo	<b>Cys-52</b> Gly Gly Thr Ala <b>Cys-57</b>	Trx f
PRK	Espinaca	<b>Cys-16</b> X <sub>38</sub> <b>Cys-55</b>	Trx f
ATP sintasa (subunidad $\gamma$ de CF <sub>1</sub> )	Espinaca	<b>Cys-199</b> Asp Ile Asn Gly Lys <b>Cys-205</b>	Trx f
NADP-MDH	Sorgo	<b>Cys-24</b> Phe Gly Val Phe <b>Cys-29</b>	Trx f (m)
G6PDH	Papa	<b>Cys-149</b> Arg Ile Asp Lys Arg Glu Asp <b>Cys-157</b>	Trx m
Rubisco activasa	<i>Arabidopsis</i>	<b>Cys-392</b> X <sub>18</sub> <b>Cys-411</b>	Trx f

La reducción de los disulfuro reguladores de las enzimas blanco ocurre como la reducción de la Trx, es decir, con la formación de un complejo heterodisulfuro transitorio entre las dos partes de la reacción (Trx-proteína blanco). La cisteína reactiva, que es el residuo accesible más cerca al extremo amino terminal de la Trx, rompe el disulfuro de la enzima blanco por un ataque nucleofílico, formándose así un disulfuro mixto unido covalentemente. En un segundo paso, de manera rápida, el segundo sulfhidrilo, que se

encuentra inaccesible al solvente, ataca el disulfuro mixto y como producto se obtiene a la Trx-S<sub>2</sub> y a la enzima blanco reducida (Schürmann y Jacquot, 2000) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema del mecanismo redox de la tiorredoxina (Trx) sobre una proteína blanco (Bco). En el paso 1 ocurre un primer ataque nucleofílico de la primera cisteína de la Trx sobre un átomo de azufre de la proteína blanco, lo cual provoca la formación de un complejo intermedio mixto (CM) e inestable (paso 2). El anión tiolato de la segunda cisteína del sitio activo de la Trx entonces rompe el puente disulfuro entre la Trx y la proteína blanco para liberarla (paso 3), quedando así la tiorredoxina oxidada y la proteína blanco reducida (Meyer *et al.*, 1999). W: triptofano; C: cisteína; G: glicina; P: prolina.

### 1.5 TIORREDOXINAS CITOPLÁSMICAS (TRXS H)

La presencia de muchas tiorredoxinas en el mismo compartimento celular posee el problema de su redundancia funcional o especificidad (Jacquot *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999). Desde un punto de vista evolutivo, el hecho de haber obtenido proteínas híbridas con un espectro de actividad mucho más amplio que las dos Trxs h progenitoras de *Arabidopsis* con actividad restringida ha reforzado la hipótesis de un origen común de las tiorredoxinas vegetales de tipo *h* a partir de un ancestro totipotente, a partir del cual, por duplicaciones génicas, aparecieron mutaciones que dieron lugar a determinantes

necesarias para la interacción con blancos en particular, resultando en una especialización de las Trxs h vegetales (Bréhélin *et al.*, 2000).

Todas las secuencias deducidas de Trxs h comparten un alto grado de identidad, excepto que la secuencia del sitio activo -Cys-Gly-Pro-Cys- cambia a -Cys-Pro-Pro-Cys- en algunos miembros, como es el caso de una tiorredoxina de *Arabidopsis* (AtTRX3) (Schürmann y Jacquot, 2000; Bréhélin *et al.*, 2000) y una que se clonó a partir de una biblioteca de ratón YAC y localizada en el núcleo, llamada nucleorredoxina (Kurooka *et al.*, 1997). Se ha probado que los dos aminoácidos entre las dos cisteínas tienen un papel muy importante en el potencial redox del sitio activo de las tiorredoxinas y proteínas relacionadas (Chivers y Raines, 1997).

Las secuencias de las Trxs h son un poco más largas que la de *E. coli*. La mayoría posee extensiones hacia el extremo amino y/o carboxilo terminal. De acuerdo con los análisis de las estructuras primarias, el modelo indica que la Trx h vegetal está mucho más relacionada con la Trx humana que con la de *E. coli* (Schürmann y Jacquot, 2000).

Las Trxs h parecen carecer de un péptido de transporte y por lo tanto, se asume que son proteínas citoplásmicas. Sin embargo, se ha demostrado en arroz y en muchas otras plantas que la Trx h también está presente en el floema. Al no haber una señal de secreción, se cree que las tiorredoxinas son transportadas a través de los plasmodesmos debido a su tamaño (Meyer *et al.*, 1999); por microinyección de Trx h recombinante, se ha demostrado que la proteína misma tiene la capacidad de mediar su propio transporte de célula a célula a través de los plasmodesmos (Ishiwatari *et al.*, 1998). Al compararse con la tiorredoxina humana, Trx-1, la cual es secretada masivamente a la sangre por linfocitos, hepatocitos, fibroblastos y una variedad de células cancerígenas (Powis y Montfort, 2001), se ha sugerido que las tiorredoxinas tienen la capacidad de actuar como mensajeros en la transducción de señales (Meyer *et al.*, 1999; Powis y Montfort, 2001). Ésto sugiere que la Trx h es un elemento móvil en las plantas y puede también actuar como portadora de mensajes (Schürmann y Jacquot, 2000) como se describió en el caso del receptor con actividad de cinasa del locus S (SRK) en *Brassica* (Brassicaceae) (Bower *et al.*, 1996; Cabrillac *et al.*, 2001).

En el caso de que las tiorredoxinas de plantas también puedan actuar como moléculas de señal en los tejidos vegetales por sus propiedades de regulación redox, ésto les puede permitir la interacción con receptores específicos. De hecho, Cabrillac *et al.*

(2001) demostraron que es una tiorredoxina la que inhibe la autofosforilación espontánea de SRK en *Brassica*, evitando así que haya una respuesta de rechazo del polen aunque sea una polinización compatible, lo que provocaría esterilidad en la planta (Cabrillac *et al.*, 2001).

Para las tiorredoxinas citoplásmicas, o de tipo *h*, se han sugerido también otras diversas funciones. Un ejemplo de esto se presenta durante la germinación de semillas, donde es muy probable que esté involucrada la reducción de las proteínas de almacenaje e inhibidores de enzimas, así como la regulación de una proteasa dependiente de redox, como la tiocalsina (Kobrehel *et al.* 1992; Besse *et al.*, 1996). La relación de las Trxs *h* con la germinación y desarrollo de la semilla sugiere que la Trx *h* es reducida por la TrxR con NADPH metabólicamente generado y que actúa en las etapas tempranas del desarrollo de la semilla para iniciar la movilización del nitrógeno y carbón al endospermo, que es el sitio principal de almacenaje de reservas en los cereales (Kobrehel *et al.*, 1992; Lozano *et al.*, 1996). El NADPH requerido para esta reducción puede ser generado enzimáticamente a partir de los carbohidratos almacenados en el endospermo por medio de la glucosa 6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas (Lozano *et al.*, 1996).

Los estudios de expresión de las tiorredoxinas de tipo *h*, a nivel de mRNA y proteína, indican que las Trxs están presentes en muchos órganos vegetales y que su expresión está regulada durante el desarrollo (Schürmann y Jacquot, 2000). Por ejemplo, la transcripción del gen en *Chlamydomonas* se encuentra bajo el control de la luz y un ritmo circadiano (Lemaire *et al.*, 1999a). Además, se activa fuertemente después de la adición de metales pesados, tales como  $Cd^{2+}$ , a células de algas (Lemaire *et al.*, 1999b). Sin embargo, como en el caso de las tiorredoxinas de cloroplasto, aún queda sin resolverse la identidad de los componentes involucrados en el sistema de las Trxs de citoplasma (Meyer *et al.*, 1999).

Existen varios reportes que indican que en cianobacterias y plantas, la Trx está involucrada en la desintoxicación por  $H_2O_2$  por medio de la enzima tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (PRDX) (Schürmann y Jacquot, 2000), la cual pertenece a la familia conservada de proteínas antioxidantes y usa los grupos tiol como reductores equivalentes para atrapar a los oxidantes (Chae *et al.*, 1994). En el citosol, la PRDX puede ser un blanco de la Trx *h*, ya que esta enzima ha sido aislada como un blanco *in vivo* de la tiorredoxina vegetal de tipo *h* en levadura por medio de la estabilización del disulfuro

mixto intermedio (Verdoucq *et al.*, 1999). Se han encontrado los equivalentes estructurales y funcionales de la peroxirredoxina de la levadura y mamíferos en células vegetales. El tipo de PRDXs de dos cisteínas se cree que funcionan como antioxidantes y también se han caracterizado en plantas, tales como *Hordeum* y *Spinacia* (Baier y Dietz, 1996).

En el caso de haber una tiorredoxina mitocondrial, se le ha adjudicado la función de activar/estabilizar el complejo 2-oxoácido deshidrogenasa y la regulación redox de la oxidasa cianuro-resistente alterna en la cadena de transporte de electrones en plantas (Schürmann y Jacquot, 2000).

#### 1.6 ALGUNAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS TIORREDOXINAS EN ANIMALES

La Trx-1 actúa como un factor de crecimiento y es producida por una gran variedad de células. Es secretada hacia el torrente sanguíneo por linfocitos, hepatocitos, fibroblastos y varias células cancerígenas (Powis y Montfort, 2001). El mecanismo por el cual se lleva a cabo la secreción no se conoce, pero como la Trx-1 no tiene una secuencia de transporte, el mecanismo parece involucrar una ruta independiente a la ruta secretora del sistema retículo endoplásmico-aparado de Golgi (Rubartelli *et al.*, 1992; Rubartelli y Sitia, 1991). Esta Trx estimula el crecimiento de los linfocitos (Wakasugi *et al.*, 1990), fibroblastos normales (Oblong *et al.*, 1994) y de una variedad de líneas celulares tumorales (Gasdaska *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1992).

La Trx-1 tiene propiedades antioxidantes, ya que elimina al peróxido de hidrógeno (Spector *et al.*, 1988). También se ha reportado que es un donador eficiente de electrones a la glutatión peroxidasa de plasma (Björnstedt *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque se ha sugerido que la Trx-1 tiene un papel antioxidante en el plasma (Nakamura *et al.*, 1997), ésta se presenta a muy bajas concentraciones, cerca de 6 nM, mientras que el plasma contiene niveles de alrededor de 1  $\mu$ M de glutatión reducido (Hogarth *et al.*, 1996; Berntsen *et al.*, 1998), lo cual indica que la actividad como antioxidante de la Trx-1 no debe ser muy relevante (Powis y Montfort, 2001).

La Trx-1 también activa selectivamente la unión al DNA de un gran número de factores de transcripción (Powis y Montfort, 2001). Entre estos factores de transcripción, se encuentra NF- $\kappa$ B, el cual es importante para la respuesta celular al estrés oxidativo,



apoptosis y origen de tumores (Moore y Bose, 1988; Gilmore *et al.*, 1996), incrementando su unión al DNA (Powis y Montfort, 2001). Otros factores de transcripción cuya unión al DNA aumenta por la Trx-1 son AP-2 (Huan y Domann, 1998), el receptor de estrógeno (Hayashi *et al.*, 1997) y el factor de transcripción PEBP2/CBF (Akamatsu *et al.*, 1997).

El factor de transcripción AP-1 (homo- y heterodímeros), cuya activación está correlacionada con el incremento del crecimiento celular, se encuentra regulado por oxidoreducción (Meyer *et al.*, 1993; Schenk *et al.*, 1994). La unión de AP-1 se aumenta por la reducción de un residuo de cisteína conservado en el dominio de unión al DNA de cada uno de los homodímeros (Jordan y Reichard, 1998). La Trx-1 no reduce directamente a AP-1 sino que lo realiza a través de otra proteína nuclear redox, Ref-1 (Abate *et al.*, 1990), la cual es una proteína de 37 kDa y que también tiene una actividad de endonucleasa de reparación apurina/apirimidina y un dominio altamente conservado en una familia de enzimas de reparación de DNA de procariontes y eucariontes (Xanthoudakis *et al.*, 1994).

## ANTECEDENTES INMEDIATOS

En nuestro grupo de investigación estamos interesados en estudiar las redes de interacción polen-pistilo, en especial el sistema de autoincompatibilidad (AI) gametofítico en *Nicotiana glauca* (Solanaceae), lo cual implica conocer a todos los genes involucrados y cómo participan sus productos en la vía bioquímica del rechazo del polen alelo-S específico.

### 2.1 AUTOINCOMPATIBILIDAD EN ANGIOSPERMAS

La autoincompatibilidad (AI) en plantas superiores es un sistema de reconocimiento célula-célula y actúa como una barrera a la autofecundación. Se define como la incapacidad de una planta fértil hermafrodita de producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977).

En la mayoría de las especies la AI se encuentra regulada por un solo *locus* multialélico, denominado *S* (Bateman, 1955; de Nettancourt, 1977).

Existen dos sistemas de AI homomórfica descritos: el esporofítico y el gametofítico. En el primer caso, el polen expresa el fenotipo de compatibilidad de la planta diploide de donde fue originado; mientras que en el segundo, el polen expresa el fenotipo de compatibilidad de su genotipo haploide *S* (Cruz-García y McClure, 2001).

### 2.2 AUTOINCOMPATIBILIDAD GAMETOFÍTICA

En el caso de las solanáceas el alelo *S* codifica para glucoproteínas con actividad de ribonucleasa (RNasa) (McClure *et al.*, 1989) que actúan degradando el RNA ribosomal (rRNA) del tubo polínico en su recorrido temprano por el tejido de conducción del estilo (McClure *et al.*, 1990). Por lo tanto, el grano de polen germina al llegar al estigma pero muere en el tejido de conducción estilar antes de alcanzar el ovario.

### 2.3 GENES MODIFICADORES

Como se ha mencionado, el producto del alelo *S* es el determinante genético de la especificidad en el sistema de autoincompatibilidad. Sin embargo, se ha visto también que se requiere de otros genes en los sistemas de AI tanto esporofítico como gametofítico (East, 1932; Marin, 1968; Ai *et al.*, 1991; Nasrallah *et al.*, 1992; Bernatzky *et al.*, 1995; Ikeda *et al.*, 1995; Tsukamoto *et al.*, 1999 in Cruz-García y McClure, 2001). McClure *et al.* (2000) clasificaron tales genes o factores en tres grupos de acuerdo a la función que podrían tener en la reacción de AI como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación de los genes modificadores en el sistema AI de acuerdo a su función.

Genes modificadores	Función
Grupo I	Afectan directamente la expresión de los genes <i>S</i> que determinan la especificidad.
Grupo II	Interactúan genética o bioquímicamente con los determinantes de la especificidad pero no afectan su expresión.
Grupo III	Poseen funciones tanto en el sistema de autoincompatibilidad como en otras dentro de la fecundación.

De acuerdo con esta clasificación, los que presentan funciones específicas en el sistema de AI (grupos I y II) al ser mutados se obtienen plantas autocompatibles (AC), mientras que los del grupo III producen esterilidad (Cruz-García y McClure, 2001).

Con el fin de identificar y clonar genes modificadores que estén involucrados en la reacción de AI gametofítica diferentes a las S-RNasas, a partir de una población híbrida segregante de *Nicotiana*, se clonó un cDNA utilizando la técnica de cDNA-AFLP, al cual se le denominó cDNA AFLP-25 83.6. La secuencia de este cDNA contiene un marco de lectura abierto denominado cDNA TrxN (Trx: tiorredoxina; N: *Nicotiana glauca*) que codifica para una proteína de 153 aminoácidos con un dominio de tiorredoxina hacia el extremo amino terminal (figura 4). Sin embargo, el hecho de que la proteína inferida a partir de este cDNA contenga dicho dominio, no es una razón definitiva para decir que el cDNA TrxN codifica para una proteína con actividad de Trx, ya que no se tiene una evidencia funcional.

## OBJETIVOS

1. Comparar la secuencia aminoacídica codificada por el cDNA TrxN con otras tiorredoxinas.
2. Sobreexpresar y purificar el producto codificado en el cDNA TrxN en *E. coli*.
3. Corroborar que la proteína sobreexpresada tiene actividad de tiorredoxina.
4. Producir anticuerpos policlonales en conejo contra la proteína recombinante (TrxN).
5. Evaluar si los anticuerpos policlonales contra la TrxN reconocen a una tiorredoxina estilar en *N. alata*.

## ESTRATEGIA

- a) Realizar un alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos utilizando la secuencia de la proteína inferida a partir del marco de lectura abierto contenido en el cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TrxN) y otras tiorredoxinas.
- b) Clonación de la región codificante del cDNA AFLP-25 83.6, denominada cDNA TrxN (figura 4), en pGEX 4T-2, el cual es un vector de expresión inducible por IPTG (figura 3), para sobreexpresarlo en la cepa BL21(DE3)pI<sub>1</sub>.ysS de *E. coli*.
- c) Purificación de la proteína recombinante en un solo paso por medio de una cromatografía de afinidad hacia la glutatión-S-transferasa (GST), la cual se encuentra codificada en el vector de expresión pGEX 4T-2 y a la que se fusiona en su extremo carboxilo terminal la proteína en estudio (figura 3).
- d) Por medio de un ensayo de actividad específico para el tipo de proteína identificado, corroborar que la proteína recombinante, producto del cDNA TrxN, es biológicamente funcional.
- e) Utilizar la proteína recombinante pura como antígeno e inmunizar a un conejo para que éste produzca anticuerpos policlonales contra el producto del cDNA TrxN.

# MATERIAL Y MÉTODOS<sup>1</sup>

## 5.1 DETERMINACIÓN DEL PRODUCTO CODIFICADO EN EL CDNA AFLP-25 83.6

Previo a este trabajo, se aisló un fragmento de cDNA mediante la técnica de cDNA-AFLP, el cual fue denominado cDNA AFLP-25. Utilizando este cDNA como sonda en una biblioteca de cDNA se identificó una clona, la 83.6, con un cDNA que contenía un marco de lectura abierto. Este cDNA fue denominado cDNA AFLP-25 83.6 (figura 4).

El marco de lectura abierto contenido en este cDNA se encontró utilizando el programa Vector NTI Suite 5.5. La secuencia de la proteína codificada dentro de este marco de lectura (cDNA TrxN) se obtuvo a partir de la traducción de la secuencia nucleotídica a aminoácidos comenzando con el codón de inicio ATG que codifica para metionina y finalizando con el codón de término TAA.

Como parte de esta investigación, la estructura primaria de esta proteína fue comparada con otras secuencias aminoácidas en la base de datos y así se pudo determinar hipotéticamente la identidad del producto codificado en el cDNA TrxN.

## 5.2 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE A NIVEL DE AMINOÁCIDOS DE DIFERENTES TIORREDOXINAS INCLUYENDO LA ESTRUCTURA PRIMARIA INFERIDA A PARTIR DEL CDNA TRXN

Del resultado anterior se pudo inferir que la proteína codificada en el marco de lectura abierto de aproximadamente 16.8 kDa (figura 4) en el cDNA AFLP-25 83.6, incluía un dominio de tiorredoxina. Como las comparaciones de las estructuras primarias de proteínas homólogas indican cuáles de los residuos son esenciales para su función, cuáles son menos importantes y cuáles tienen poca función específica (Voet *et al.*, 1999), utilizando el componente AlignX del programa Vector NTI Suite 5.5, se realizó un alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes secuencias de tiorredoxinas de

---

<sup>1</sup> La forma de preparación de ciertos reactivos y algunas metodologías adicionales se encuentran anexas en el apéndice.

la base de datos y aquella inferida a partir del cDNA TrxN. Así se pudo tener una visión más detallada de la estructura primaria de la posible tiorredoxina de *N. alata*.

### 5.3 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TRXN)

Una vez conocida la secuencia de la región codificante del cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TrxN) se diseñaron los siguientes oligonucleótidos<sup>2</sup>:

- Fthipex (*Bam*-HI)

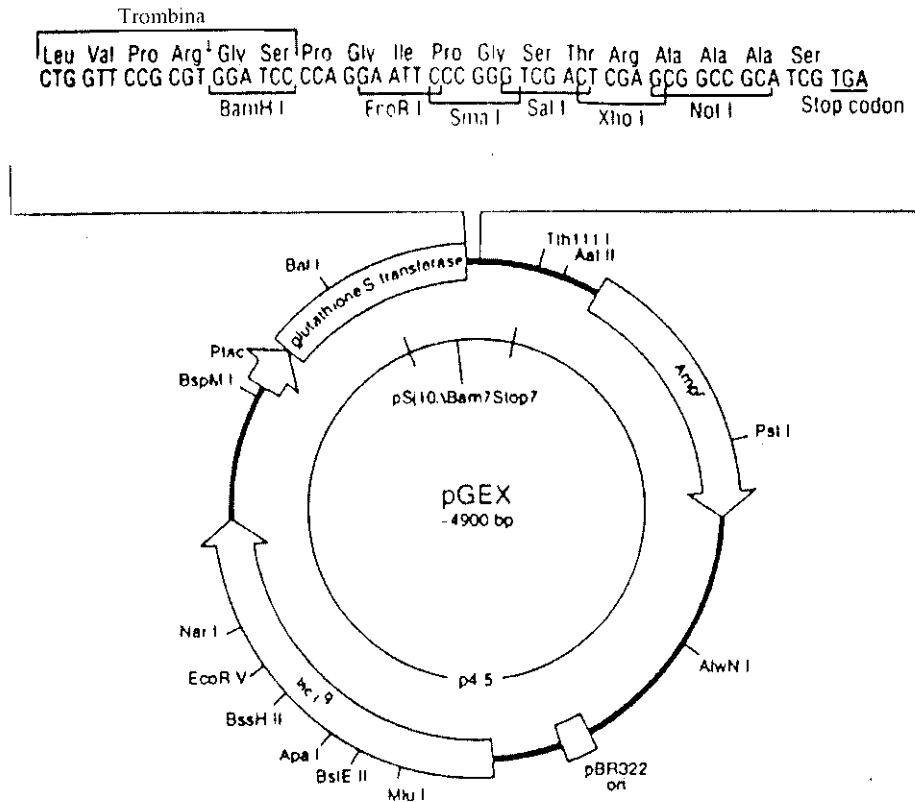
5' CGCGCG**GATCC**ATGGGATCGTATCTTTCAA 3'

- Rthipex (*Eco*-RI)

5' GCGCGCGG**GAATT**CAATTTATTGGACATGAAA 3'

Estos oligonucleótidos fueron diseñados para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del cDNA TrxN para flanquearlo en el extremo 5' por un sitio de restricción *Bam*-HI (Fthipex) y en el 3' (Rthipex) un sitio de restricción *Eco*-RI. Por otro lado, en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pGEX 4T-2, donde fue clonado este cDNA, el sitio de restricción *Bam*-HI permite la conservación del marco de lectura entre el último codón del extremo carboxilo terminal de la glutatión-S-transferasa (GST) y el primero del amino terminal de la proteína a fusionar (TrxN), mientras que el sitio de restricción *Eco*-RI localizándose abajo del *Bam*-HI permite que el cDNA se inserte direccionalmente en el plásmido (figura 3) y la conservación de un codón de término debajo de este sitio (TGA).

<sup>2</sup> En las secuencias de los oligonucleótidos diseñados, los sitios de restricción incluidos se encuentran indicados en negritas y subrayadas



**Figura 3.** Esquema del vector pGEX 4T-2. La secuencia muestra el sitio múltiple de clonación, donde se encuentran los diferentes sitios de restricción. Nótese cómo el sitio *Bam*-HI no altera el marco de lectura. El sitio de reconocimiento para la trombina se encuentra al final de la secuencia codificante para GST. Además, el vector cuenta con un gen marcador de resistencia a ampicilina (*Amp*<sup>r</sup>).

Para amplificar el cDNA Trx N se utilizó la técnica de PCR usando un sistema enzimático de expansión de alta fidelidad (Expansion High Fidelity, Roche). Este sistema está compuesto por una mezcla de las enzimas, *Taq* DNA polimerasa y *Pwo* DNA polimerasa, que garantiza tener un alto rendimiento, fidelidad y especificidad en los productos amplificados. Como la *Pwo* DNA polimerasa tiene una actividad inherente de exonucleasa 3'-5' de corrección de errores introducidos durante la polimerización (Dabrowski y Kur, 1998), este sistema de amplificación resulta en una síntesis de DNA con alta fidelidad.



La mezcla de reacción que se utilizó para la amplificación se muestra en la tabla 3 y las condiciones de PCR pueden verse en la tabla 4.

Los productos de la amplificación fueron fraccionados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. El DNA amplificado fue purificado a partir del mismo gel de acuerdo al protocolo de productos QIAGEN, como sigue:

- a) Cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa con una navaja limpia.
- b) Pesar la rebanada de gel en un tubo incoloro. Agregar 3 volúmenes de buffer *QG* por volumen de gel (100 mg ~ 100 ml).
- c) Incubar a 50°C por 10 minutos o hasta que el gel se disuelva completamente. Con el fin de acelerar la disolución del gel, se puede mezclar con vortex cada dos o tres minutos durante el tiempo de incubación.
- d) Una vez que el gel se haya disuelto completamente, verificar que el color de la mezcla sea amarillo, lo cual indica que se tiene un  $\text{pH} \leq 7.5$ .
- e) Agregar un volumen de gel de isopropanol a la muestra y mezclar con vortex.
- f) Colocar una columna *QIAquick* en un tubo colector de 2 ml.
- g) Para unir el DNA, aplicar la muestra a la columna y centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto.
- h) Desechar el flujo y regresar la columna al mismo tubo colector.
- i) Para quitar cualquier rastro de agarosa, agregar 0.5 ml de buffer *QG* a la columna y centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto.
- j) Para lavar, agregar 0.75 ml de buffer *PE* a la columna y centrifugar a 13,000 rpm durante un minuto.
- k) Desechar el flujo y centrifugar la columna un minuto adicional.
- l) Colocar la columna *QIAquick* en un tubo limpio.
- m) Para eluir el DNA, agregar 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada estéril al centro de la membrana de la columna y dejar reposar por un minuto. Finalmente, centrifugar a 13,000 rpm por un minuto.

**Tabla 3.** Reactivos y concentraciones de cada uno de los utilizados para la amplificación del cDNA.

Reactivo	Concentración final
Primer Fthipex (10 mM)	0.5 $\mu$ M
Primer Rthipex (10 mM)	0.5 $\mu$ M
DNTPs <sup>3</sup> (Roche) (10 mM)	0.2 mM
Buffer con MgCl <sub>2</sub> (10X)	1X
Exp. H Fidelity <sup>4</sup> (3.5 u/ $\mu$ l)	2.5 u
DNA templado <sup>5</sup>	- - -
<b>Volumen final<sup>6</sup></b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

**Tabla 4.** Condiciones de PCR para la amplificación del cDNA TrxN.

	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
• Desnaturalización inicial	94	1.0
• Amplificación (40 ciclos)		
Desnaturalización	94	0.5
Alineamiento	60	1.0
Elongación	72	1.0
• Elongación final	72	1.0

#### 5.4 CLONACIÓN DEL cDNA TRxN

El producto de amplificación por PCR del cDNA TrxN fue digerido con las enzimas de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI, ligado al vector de expresión previamente linealizado con las mismas endonucleasas y finalmente utilizado para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Las digestiones, tanto del cDNA (producto de PCR) como del vector, se llevaron a cabo con las enzimas de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI (GIBCO BRL), dejando incubar la reacción a 37°C por dos horas. Las muestras fueron purificadas a partir de un gel de agarosa al 1.5% después de una electroforesis, siguiendo el protocolo de productos QIAGEN antes descrito. Luego, el DNA fue ligado al vector de expresión utilizando la T<sub>4</sub> DNA ligasa (GIBCO BRL) e incubando la mezcla de reacción a 4°C toda la noche.

<sup>3</sup> Es una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos en misma cantidad.

<sup>4</sup> Se refiere a la mezcla de DNA polimerasas del que consiste el sistema de expansión de alta fidelidad.

<sup>5</sup> En este caso el DNA templado fue el plásmido recombinante pZ1.1 purificado a partir de la clona 83.6

<sup>6</sup> El volumen final se alcanza agregando H<sub>2</sub>O desionizada estéril.

El producto de la reacción de ligado se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico, bajo el siguiente protocolo.

- a) A 100  $\mu$ l de células competentes se les agrega 5  $\mu$ l de la reacción de ligado.
- b) Incubar en hielo por 30 minutos.
- c) Incubar a 42°C por 40 segundos.
- d) Adicionar 450  $\mu$ l de medio LB con glucosa a una concentración de 20 mM.
- e) Incubar a 37°C con agitación (~200 rpm) por una hora.
- f) Centrifugar a 13,000 rpm 30 segundos.
- g) Resuspender el botón celular con 100  $\mu$ l de medio LB.
- h) Esparcir en una placa de LB con ampicilina (Roche) a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml.
- i) Incubar a 37°C toda la noche.

Para corroborar que las colonias transformantes, seleccionadas por su resistencia a ampicilina (50  $\mu$ g/ml), contenían el plásmido recombinante, se purificó el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina y se digirió con las endonucleasas de restricción bajo las condiciones antes mencionadas. Por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% se fraccionaron los productos de las reacciones de digestión.

El procedimiento para purificar el DNA plasmídico de células transformantes es el siguiente:

- a) Sembrar una colonia aislada en 3 ml de medio LB con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) e incubar a 37°C con agitación (~200 rpm) de 12 a 15 horas.
- b) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm por 3 minutos.
- c) Resuspender el botón bacteriano en 250  $\mu$ l de GTE.
- d) Agregar 400  $\mu$ l de una solución de NaOH 0.2 M y SDS al 1%. Mezclar por inversión 6 veces.
- e) Agregar 400  $\mu$ l de acetato de potasio 3 M pH 4.8 y mezclar por inversión 6 veces.
- f) Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos.
- g) Recuperar el sobrenante y medir el volumen.
- h) Agregar PCI (fenol (50):cloroformo (49):alcohol isoamílico (1)) en proporción 1:1 al volumen del sobrenadante obtenido.
- i) Mezclar vigorosamente con vortex.

- j) Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos.
- k) Recuperar la fase acuosa y medir su volumen.
- l) Agregar 1/3 volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
- m) Mezclar vigorosamente con vortex.
- n) Incubar a -20°C por un mínimo de 30 minutos.
- o) Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
- p) Desechar cuidadosamente el sobrenadante y esperar a que el etanol se evapore.
- q) Resuspender el botón en agua desionizada estéril con RNasa A a una concentración final de 600 µg/ml (de una solución madre a 15 mg/ml).
- r) Incubar a 37°C por 30 minutos.
- s) El DNA plasmidico se almacena hasta su uso a -20°C.

## 5.5 SOBREENPRESIÓN DEL CDNA TRXN

Para sobreexpresar el cDNA TrxN y con el fin de obtener un alto rendimiento en cuanto a la producción de la proteína de interés, en este caso la posible tiorredoxina, se utilizó una cepa de *E. coli* denominada BL21(DE3)pLysS, la cual contiene el gen *I* del bacteriófago T7 que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac* UV5, por lo que se puede inducir su expresión con isopropiltiogalactósido (IPTG), un análogo de lactosa no hidrolizable. Además, esta cepa también contiene el plásmido pLysS, el cual expresa a la lizosima T7 en el citoplasma bacteriano reprimiendo la expresión proteica en ausencia de inducción, evitando así la expresión de proteínas tóxicas (en el caso de los vectores tipo pET). El mecanismo de astringencia adicional es que la lizosima T7 se une e inactiva a la T7 RNA polimerasa (expresada a niveles muy bajos en ausencia de inducción) e inhibe la transcripción. Después de la inducción con IPTG, la cantidad de T7 RNA polimerasa es suficiente para superar la inhibición por dicha lizosima (Dabrowski y Kur, 1998).

El vector de expresión que se usó es del tipo pGEX (pGEX-4T-2) (figura 3). Este tipo de vectores está diseñado para que los polipéptidos puedan ser expresados en *E. coli* en forma tal que permita su purificación bajo condiciones no desnaturizantes. Los polipéptidos que se expresan están fusionados al extremo carboxilo de la glutatión-S-

transferasa (GST) (figura 3), la cual es una proteína citoplásmica de 26 kDa común en eucariontes. Sin embargo, la GST que se obtiene a partir de este tipo de vectores tiene una masa molecular de 29 kDa debido a los codones que fueron agregados para formar el sitio múltiple de clonación antes del codón de término propio de la proteína.

Por lo común, las proteínas producidas permanecen solubles dentro de la bacteria y pueden ser purificados a partir de un lisado celular por sonicación. La proteína quimérica o proteína de fusión se rompe utilizando una proteasa específica para un determinado sitio. En este caso se utilizó trombina, ya que ésta separa a la proteína de fusión rompiendo a la cadena polipeptídica entre los residuos de arginina y glicina dentro de la secuencia -Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser- (figura 3) y, además la estructura covalente de la posible tiorredoxina inferida a partir del cDNA TrxN no contiene el sitio de corte de esta enzima proteolítica.

El DNA plasmídico purificado a partir de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fue secuenciado para evitar la sobreexpresión de un cDNA mutado y también fue utilizado para transformar a las células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS siguiendo la misma metodología de transformación antes mencionada; sin embargo, en este caso la selección de las colonias transformantes se hizo con ampicilina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. Las colonias obtenidas fueron conservadas a -80°C en glicerol al 15% diluido con medio LB.

Para inducir la sobreexpresión de la proteína se realizó un experimento piloto bajo el siguiente protocolo.

- a) Tomar 15  $\mu$ l de un cultivo congelado con glicerol e inocularlos en 3 ml de medio 2xYTA<sup>7</sup>.
- b) Incubar a 37°C con agitación (~200 rpm) hasta que se alcance una  $A_{600}$  de 0.5 a 0.7.
- c) A los cultivos de inducción se les agrega IPTG (GIBCO BRL) de una solución madre 100 mM a una concentración final de 0.1 mM y seguir la incubación de 2 a 3 horas.
- d) Centrifugar por 5 segundos a 13,000 rpm y desechar el sobrenadante.
- e) Resuspender cada botón bacteriano en 300  $\mu$ l de PBS 1X a 4°C. Tomar 10 $\mu$ l de las células resuspendidas para un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE).
- f) Lisar a las células utilizando un sonicador.

- g) Centrifugar a 4,000 rpm por 5 minutos para remover el material insoluble, el cual, después de transferir el sobrenadante a un tubo limpio, debe ser resuspendido en 300  $\mu$ l de PBS 1X para tomar 10  $\mu$ l y analizarlo por SDS-PAGE.
- h) Del sobrenadante tomar otros 10  $\mu$ l y analizarlo por SDS-PAGE junto con las otras muestras para saber la localización de la proteína en ambas fases del sonicado.

El análisis de las alícuotas obtenidas, como se ha mencionado a lo largo del protocolo, se hizo por SDS-PAGE. Esta electroforesis se efectuó en dos fases: (1) gel apilador o concentrador, el cual contiene una concentración de 4% de acrilamida y pH 6.8 y (2) gel separador, cuya concentración de acrilamida es del 10 ó 12.5% y pH 8.8. Finalmente, la tinción de las proteínas en el gel se hizo con azul brillante de Coomassie (figura 10).

#### **5.6 COMPROBACIÓN DE QUE LA PROTEÍNA QUE MUESTRA UN PATRÓN DE SOBREENXPRÉSÓN ES LA PROTEÍNA DE FUSIÓN**

Con el fin de tener resultados consistentes, se realizó una inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra GST incubándolos con la fase soluble de extractos de proteína total bacteriana provenientes de una clona con el plásmido no recombinante y otros de clonas recombinantes. En el primer caso es posible inmunodetectar a la GST, mientras que en el segundo a la proteína de fusión (GST + posible Trx).

Se hicieron dos geles de poliacrilamida al 10% para realizar SDS-PAGE. Uno de éstos se transfirió a una membrana de PVDF a 25 V, 300 mA por 1.5 horas para realizar la inmunodetección de las proteínas GST y la quimérica; mientras que el otro gel fue teñido con nitrato de plata y sirvió como duplicado del primero (figura 11).

Las condiciones para la inmunodetección fueron las siguientes:

- a) Incubar la membrana en solución de bloqueo con suave agitación constante a temperatura ambiente toda la noche.
- b) Desechar la solución.

---

<sup>2</sup> Se debe tener en cuenta que se necesita tener medios de cultivo que contengan las colonias transformantes con el plásmido sin el inserto y otros con el plásmido recombinante para: (1) inducción con IPTG; (2) control de inducción (sin IPTG) y; (3) para medir la densidad óptica.

- c) Agregar solución de bloqueo fresca con el primer anticuerpo (anti GST) a un título de 1:2,000 e incubar con suave agitación por dos horas a temperatura ambiente.
- d) Desechar la solución.
- e) Lavar la membrana con PBS 1X dos veces (5 minutos cada lavado).
- f) Lavar con PBS 1X más NaCl 1.0 M por 15 minutos.
- g) Agregar a la membrana solución de bloqueo con el segundo anticuerpo (anticonejo, marcado con peroxidasa) a una dilución de 1:2,500 e incubar a temperatura ambiente con agitación suave por dos horas.
- h) Desechar la solución.
- i) Realizar tres lavados a temperatura ambiente con PBS 1X (15 minutos cada lavado).
- j) Revelar con los reactivos para detección de anticuerpos marcados con peroxidasa (RPN 2109 ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

#### 5.7 PREPARACIÓN DE SONICADOS BACTERIANOS A GRAN ESCALA CON LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

Una vez que se analizaron los resultados obtenidos a partir de la sobreexpresión del cDNA TrxN a baja escala (figuras 10 y 11), se prepararon sonicados bacterianos a gran escala con el fin de obtener mayor cantidad de la proteína recombinante para una posterior purificación, ensayos de actividad y producción de anticuerpos policlonales. El protocolo es el siguiente (tomando en cuenta que se necesita inducir a las colonias tanto portadoras del plásmido no recombinante como del recombinante):

- a) Tomar 15  $\mu$ l de cultivo congelado con glicerol e inocularlos en 3 a 10 ml de medio 2xYTA e incubar a 37°C con agitación (~200 rpm) de 12 a 15 horas.
- b) Hacer una dilución del cultivo 1:100 en medio 2xYTA ocupando el 25% del volumen del matraz para asegurar una aireación adecuada. Incubar a 37°C con agitación (~200 rpm) hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.5 a 0.7.
- c) Agregar a los cultivos IPTG 100 mM a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión y continuar la incubación de 3 a 4 horas.
- d) Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm por 10 minutos a 4°C para sedimentar a las células.
- e) Descartar el sobrenadante y drenar el botón celular (ponerlo en hielo).

- f) Resuspender completamente el botón en 50 µl de PBS 1X a 4°C por cada mililitro de cultivo.
- g) Lisar a las células con un sonicador por periodos de 15 a 30 segundos, entre un intervalo de 30 segundos a un minuto de reposo, a una frecuencia de 20 a 30 MHz hasta que la solución sea un poco transparente (sonicar sobre hielo).
- h) Agregar tritón X-100 al 20% a una concentración final del 1%. Mezclar suavemente por 30 minutos en hielo para mejorar la solubilización de la proteína de fusión.
- i) Centrifugar a 10,000 rpm y pasar el sobrenadante a un tubo limpio.

### 5.8 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

La purificación de la proteína quimérica se efectuó a partir de la fase soluble del sonicado bacteriano por cromatografía de afinidad en solución. Se utilizó la resina de agarosa, glutatión sepharosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB) porque que ésta permite que la purificación se realice en un solo paso. La GST presenta afinidad hacia el glutatión oxidado, el cual está unido covalentemente a la matriz de agarosa. La elusión de la proteína se efectúa por competencia con glutatión reducido, ya que éste presenta una mayor afinidad hacia el glutatión que la misma GST, liberándola así de la resina.

La metodología para la purificación es la siguiente:

- a) A la fase soluble del sonicado se le agregan 2 ml de glutatión sefarosa 4B al 50% por cada 100 ml de sonicado.
- b) Incubar con rotación continua a temperatura ambiente por 60 minutos.
- c) Centrifugar la suspensión a ~1,000 rpm por 5 minutos para sedimentar la matriz. Eliminar el sobrenadante y salvar una alícuota de éste para analizarlo por SDS-PAGE.
- d) Lavar el botón con 10 volúmenes de cama con PBS 1X (1 volumen de cama = 0.5 volumen de glutatión sefarosa 4B al 50%) y centrifugar a ~1,000 rpm por 5 minutos. Desechar el sobrenadante.
- e) Repetir el lavado dos veces más.

La elusión se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) A la matriz sedimentada agregar 1 ml de amortiguador de elusión por cada mililitro de volumen de cama.



- b) Mezclar suavemente para resuspender la matriz. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para eluir a la proteína de fusión de la matriz.
- c) Centrifugar a ~1,000 rpm por 5 minutos para sedimentar la matriz y salvar el sobrenadante en un tubo limpio.
- d) Repetir los tres pasos anteriores dos veces más y juntar los tres eluatos.

El resultado de la purificación fue analizado también por SDS-PAGE bajo las condiciones antes descritas.

### **5.9 PROTEÓLISIS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN PARA OBTENER A LA POSIBLE TIORREDOXINA LIBRE DE LA GST**

La proteasa trombina separa a la tiorredoxina de la GST haciendo un corte entre ambas proteínas en el extremo carboxilo terminal de la GST y el amino de la supuesta tiorredoxina (TrxN). Esta reacción proteolítica se puede llevar a cabo sobre la proteína de fusión eluida de la resina o unida a ésta, la cual es una forma más adecuada para obtener a la posible tiorredoxina pura, es decir, libre de la GST, ya que ésta permanece unida a la resina, mientras que la tiorredoxina queda mayoritariamente en el sobrenadante. Para ambos experimentos se agregó (a la solución de la proteína de fusión o a la matriz sedimentada con dicha proteína unida a ella) la mezcla de reacción que consiste de 50 µl de trombina (Amersham Pharmacia Biotech) resuspendida (50 unidades) y 950 µl de PBS 1X por cada mililitro de volumen de cama, dejando incubar con rotación continua a temperatura ambiente por 14 a 16 horas.

El realizar la proteólisis sobre la proteína de fusión eluida sirvió para corroborar que era la posible tiorredoxina la que se liberaba, ya que se le volvió a aplicar glutatión sefarosa 4B al 50% para demostrar que era ésta la que se había liberado y la GST la que se quedaría unida (figura 13).

Cuando se hizo la reacción proteolítica con trombina sobre la proteína de fusión unida a la resina se siguió el siguiente protocolo:

- a) Centrifugar a ~1,000 rpm por 5 minutos para sedimentar la matriz y recuperar el sobrenadante.

- b) Hacer un lavado con 1 ml de PBS 1X por cada mililitro de volumen de cama. Centrifugar a ~1,000 rpm por 5 minutos y recuperar el sobrenadante.
- c) Repetir dos veces más el lavado y juntar los tres sobrenadantes con el obtenido en el primer paso.

#### 5.10 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación se hizo siguiendo el método de Bradford. Se utilizaron diluciones de albúmina de suero bovino (BSA, GIBCO BRL) a partir de 0.1 mg/ml a 1 mg/ml (a intervalos de 0.1) y se disolvieron en el reactivo de Bradford en una proporción de 1:100 para obtener la curva patrón de absorbencia/concentración. De la misma manera y en la misma proporción se aplicaron las muestras problema. Las lecturas de absorbencia se realizaron a temperatura ambiente y a una longitud de onda de 595 nm.

#### 5.11 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA TIORREDOXINAS

Para demostrar que el marco de lectura contenido en el cDNA AFLP-25 83.6 efectivamente codifica para una tiorredoxina, se utilizó un método espectrofotométrico específico para tiorredoxinas (Holmgren, 1979). En este ensayo se mide la turbidez de precipitación de la cadena B al liberarse de la cadena A por la reducción de los puentes disulfuro que las unen en la insulina. Dicha reducción es catalizada por la tiorredoxina utilizando como donador de electrones al ditioneitol (DTT).

Para desarrollar la técnica, se preparó una solución de insulina a una concentración de 10 mg/ml resuspendiendo 46 mg de insulina (SIGMA) en 3.68 ml de Tris- Cl 50 mM pH 8.0. Con HCl 1M se ajustó el pH de la solución a 2, se tituló rápidamente a pH 8.0 con NaOH 1M y se aforó a un volumen de 4.6 ml con agua.

Para el ensayo de actividad, en cada celda se colocaron 500 µl de insulina a una concentración de 1 mg/ml disuelta en fosfato de potasio 0.1 M pH 7.0 y EDTA 2 mM pH 8.0. A cada muestra se le agregó 100 µl a una concentración de 75 ng/µl de tiorredoxina, GST o agua (a los dos controles). Para empezar la reacción se les agregaron a todas las

muestras 10 µl de DTT 100 mM, excepto al blanco, cuyo volumen final (610 µl) se aforó con agua. Las lecturas se hicieron a temperatura ambiente a una longitud de onda de 650 nm por 40 minutos a intervalos de un minuto entre cada una (figura 15).

El utilizar como control a la GST sirve para demostrar que, en caso de haber contaminación, el resultado de la evaluación de actividad enzimática sólo depende de la tiorredoxina.

#### 5.12 PRODUCCIÓN Y SEMIPURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA TRXN

Una vez asegurado el hecho de que la proteína obtenida a partir del cDNA TrxN es una tiorredoxina, entonces se empezó con la producción de los anticuerpos policlonaes contra ésta. Con el objetivo de asegurar la producción de anticuerpos en conejo, se acopló la tiorredoxina a hemocianina y se utilizó el adyuvante completo de Freund (SIGMA), ya que como se ha mencionado, la tiorredoxina es una proteína bastante conservada entre los organismos tanto procariontes como eucariontes. El protocolo es el siguiente:

- a) Disolver 2 mg de hemocianina en 800 µl de agua desionizada estéril.
- b) Adicionar 200 µl de PBS 1X.
- c) A la solución obtenida, agregar 100 µl de glutaraldehído en solución acuosa al 25% diluido en PBS 1X en una proporción de 1:10.
- d) Incubar a temperatura ambiente con rotación continua por un mínimo de 12 horas.
- e) Utilizando un tubo centrífugo 30, eliminar el exceso de glutaraldehído centrifugando a 2,000 rpm durante 30 minutos. Agregar 500 µl PBS 1X y repetir la centrifugación. Recuperar la solución que contiene a la hemocianina.
- f) A la solución con hemocianina, adicionar 400 µg de la TrxN diluida en PBS 1X.
- g) Incubar a temperatura ambiente con rotación continua por un mínimo de 12 horas.
- h) Adicionar en proporción de 1:1 adyuvante completo de Freund.
- i) Inmunizar conejos por inyección subcutánea.

Las inmunizaciones se hicieron una vez por semana durante 5 semanas. Una semana después de la cuarta inmunización se tomó la primera muestra serológica con la cual se hizo la titulación de los anticuerpos. Una semana después de la quinta

inmunización, por medio de una punción cardiaca, se obtuvieron 60 ml de sangre del conejo.

Para separar el suero de la sangre, ésta se dejó coagular a 4°C de 1 a 2 horas y se procedió como a continuación se describe:

- a) Centrifugar a 4,000 rpm 10 minutos a 4°C.
- b) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y medir el volumen.
- c) Adicionar 0.5 de volumen de solución saturada de sulfato de amonio al 77.7%, pH 7.3.

La adición debe ser lenta para asegurar que la concentración de sal local alrededor del sitio de adición no exceda la concentración de sal deseada.

- d) Incubar con rotación continua a 4°C por 12 horas.
- e) Centrifugar a 4,000 rpm 30 minutos a 4°C. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio.
- f) Como ya se realizó una precipitación (paso c), agregar el mismo volumen de la solución de sulfato de amonio que se agregó en la primera.
- g) Incubar con rotación continua a 4°C por 12 horas.
- h) Centrifugar a 4,000 rpm 30 minutos a 4°C. Decantar y quedarse con el botón.
- i) Resuspender el botón con 1/3 del volumen inicial de suero de PBS 1X.

### 5.13 TITULACIÓN DE ANTICUERPOS

El título se determinó utilizando diferentes diluciones en solución de bloqueo de los anticuerpos semipurificados (tabla 5) incubándolos contra diferentes cantidades de tiorredoxina recombinante pura (1, 3, 5 y 7 µg), la cual fue separada electroforéticamente por SDS-PAGE y electrotransferida (25 V, 300 mA, 1.5 horas) a una membrana PVDF.

**Tabla 5.** Diluciones utilizadas (×) para determinar el título de los anticuerpos obtenidos.

Muestra	Diluciones				
	1:1,000	1:2,000	1:3,000	1:5,000	1:10,000
Suero preinmune	×				
Primera muestra (cuarta semana)	×	×	×	×	×
Muestra definitiva (quinta semana)				×	×

Las condiciones para la inmunodetección fueron las mismas que se utilizaron anteriormente con los anticuerpos contra GST, excepto:

- a) Primer anticuerpo: la dilución varió de acuerdo al título.
- b) No se realizó el lavado con NaCl, únicamente con PBS 1X.
- c) Segundo anticuerpo (anticonejo, SIGMA): se utilizó a una dilución de 1:10,000.

#### **5.14 ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN EN EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL DE ESTILOS DE *N. ALATA* CON LOS ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA TRxN**

Para demostrar que los anticuerpos policlonales, además de reconocer a la tiorredoxina recombinante de *N. alata* (TrxN), inmunodetectan a alguna tiorredoxina de la planta, se preparó un extracto de proteínas totales de estilos maduros de *N. alata* como sigue:

- a) Macerar el tejido vegetal (20 estilos aproximadamente) con 500 µl de amortiguador de extracción de proteínas en un mortero frío (4°C).
- b) Recuperar la mezcla en un microtubo.
- c) Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C.
- d) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio (mantenerlo en hielo o guardarlo a -80 °C hasta su uso).

Se hicieron dos geles de poliacrilamida al 12.5% para realizar SDS-PAGE y así separar a las proteínas del extracto. Uno de éstos se utilizó para la inmunodetección de la TrxN nativa y el otro fue teñido con nitrato de plata y sirvió como duplicado del primero (figura 17).

Las condiciones para la inmunodetección fueron las mismas utilizadas para la determinación del título de los anticuerpos.

## RESULTADOS

### 6.1 PRODUCTO CODIFICADO POR EL CDNA AFLP-25 83.6

Para la búsqueda de un marco de lectura abierto dentro de la secuencia del cDNA AFLP-25 83.6 se utilizó el programa Vector NT1. La secuencia de la proteína codificada dentro de este marco de lectura se obtuvo a partir de la traducción de la secuencia nucleotídica a aminoácidos comenzando con el codón de inicio ATG que codifica para metionina y finalizando con el codón de término TAA (figura 4).

Al comparar la estructura primaria obtenida en la base de datos, se encontró que ésta presenta homología con proteínas que poseen actividad de oxidoreductasa ditiol-disulfuro (Wollman *et al.*, 1988), propio de la superfamilia de las tioredoxinas. Por esta razón a la región codificante del cDNA AFLP-25 83.6 se le ha denominado cDNA TrxN.

		EcoRI	
1	CCACGCGTCC	GGGAAAATCG	AATCACAAT
	AGCAGTGTCT	TTTATTACCG	TCTCAGTAGT
51	TTCTTCCCTA	TTTTGACTAC	
+2			Met Gly Ser Tyr Leu
101	TTTGTGGGTA	AGGAGAGAGA	GAGAGTGAAG
	AATCCAATGG	GATCGTATCT	
+2	Leu Ser Ser Leu	Leu Gly Gly Gly	Ala Ala Glu Ala Ala Glu Ala Glu Ser Gly
151	TTCAAGTTTG	CTCGGTGGAG	GCGCGGGCGA
	AGCGGCAGAG	GCAGAATCAG	
+2	Gly Ser Ser Ser	Glu Pro Ser Arg	Val Ile Ala Phe His Ser Ser Asn Arg
201	GATCGTCGTC	AGAACCCTCG	CGTGTGATIG
	CTTTTCATTC	TCCAATCGG	
+2	Tyr Gln Ieu His	Phe Asn Ser Ser	Lys Gln Leu Asn Lys Leu Ile Val Val
251	TGGCAACTTC	ACTTCAATTC	CTCCAAGCAA
	TAAATAAAC	TGATAGTTGT	
+2	Val Asp Phe Ala	Ala Thr Trp Cys	Gly Pro Cys Lys Met Met Glu Pro Val Ile
301	GGATTTTGGC	GCTACATGGT	GTGGGCCCTG
	CAAAATGATG	GAGCCGGTTA	
+2	Ile Asn Ala Met	Ser Ala Lys Tyr	Thr Asp Val Asp Phe Val Lys Ile Asp
351	TTAAGCCCAT	GTCTGCCAAG	TATACCGAGC
	TTGACTTCGT	CAAAATCGAC	
+2	Val Asp Glu Leu	Ser Asp Val Ala Gln Glu	Phe Gly Val Gln Ala Met Pro
401	GTCCGATGAC	TCTCAGATGT	AGCACAAGAG
	TTGGAGTAC	AAGCTATGCC	
+2	Pro Thr Phe Leu	Leu Leu Lys Gln	Gly Lys Glu Val Glu Arg Val Val Gly Ala
451	AACATTTTIG	CTGCTGAAGC	AAGGAAAGGA
	AGTAGAGAGA	GTGGTTGGGG	
+2			Ala Lys Lys Asp Gln Leu Glu Lys Lys Ile Leu Lys His Arg Glu Ala Pro
501	CTAAGAAAGA	TGAGCTCGAG	AAAAAGATTG
	TCAAGCACAG	GGAAGCTCCT	
+2	Lys Phe Ala Ala	Ser Asn Tyr Arg	Thr Lys Phe His Val Gln *** Ile
551	AAATTTGGTG	CTAGTAATTA	TGGAATAAA
	TTTCATGTCC	AATAAATTA	
601	CAGAAAAGAA	AAGCATCATT	TTTACTTTAC
	TACCGGATTG	GGATGAACCG	
651	AATATTGNTG	AATTGCTTTG	GGGGANTAAA
	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAAG	
701	GGCGCCGTT	TA	
			AvaI

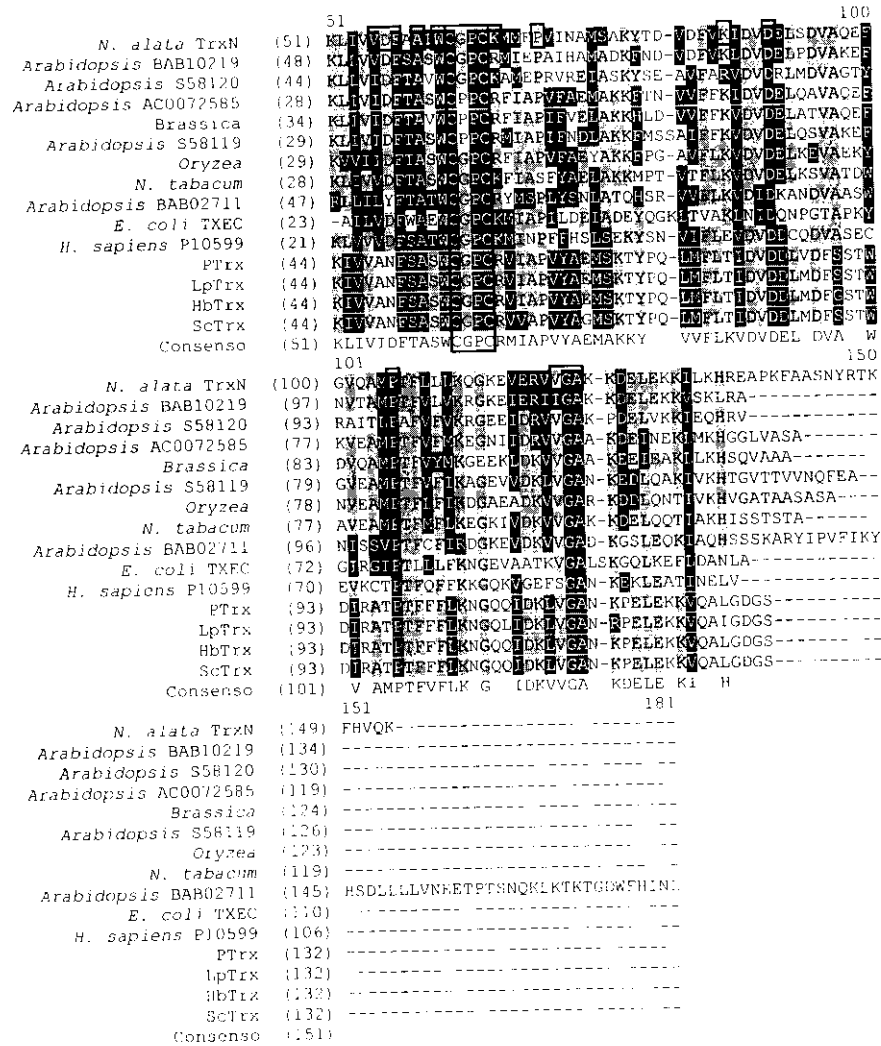
Figura 4. Secuencia del cDNA AFLP-25 correspondiente a la clona 83.6. Las letras pequeñas indican el aminoácido correspondiente a cada codón, dando como resultado una proteína de ~16.8 kDa. Dentro de la secuencia codificante se encuentra un sitio de restricción *Ava*I y antes de ésta uno *Eco*RI.

6.2 ALINEAMIENTO MÚLTIPLE A NIVEL DE AMINOÁCIDOS DE DIFERENTES TIORREDOXINAS

Para evaluar las relaciones de identidad con otras tiorredoxinas de plantas, de *E. coli* y humano se realizó un alineamiento múltiple (figura 5), en el cual se encontró un 55.6% de identidad con una de las tiorredoxinas de *Arabidopsis* (BAB10219) y del 20.1% con la de *E. coli* (TXEC). Asimismo se pudo observar que la secuencia comparada, además de conservar el sitio activo típico de las tiorredoxinas (Cys-62, Gly-63, Pro-64 y Cys-65 en la estructura primaria inferida a partir del cDNA TrxN), contiene 9 de los 10 aminoácidos que se encuentran también muy conservados entre estas proteínas. En la tiorredoxina de *E. coli* estos aminoácidos son Phe-12, Val-25, Asp-26, Phe-27, Ala-29, Trp-31, Pro-40, Asp-61, Pro-76 y Gly-92 (Eklund *et al.*, 1991) y en la tiorredoxina inferida son Val-55, Asp-56, Phe-57, Ala-59, Trp-61, Pro-70, Asp-90, Pro-105 y Gly-121 (figura 5). Como se puede ver en este alineamiento, en lugar de la Phe-12 de *E. coli*, en la estructura primaria de la proteína codificada en el cDNA TrxN se presenta un residuo de triptofano en la posición 39, aunque hay un residuo de fenilalanina cercano en la posición 43 y otro en la 33.

En la Trx de *E. coli* los residuos de glicina y prolina localizados entre las dos cisteínas del sitio activo e Ile-75 por un lado y Pro-76 más Val-91, Gly-92 y Ala-93 por otro, forman un área plana e hidrofóbica que posiblemente está involucrada en la unión de la tiorredoxina a otras moléculas proteicas (Eklund *et al.*, 1984), por lo que fue importante encontrar a la mayoría de estos residuos conservados en la estructura primaria de la proteína codificada en el cDNA TrxN (Gly-63, Pro-64, Pro-105, Val-120, Gly-121 y Ala-122). De igual manera, fue importante reconocer que de los residuos cargados y uno aromático que se encuentran del otro lado del sitio activo en la Trx de *E. coli* (Glu-30, Lys-36, Lys-57 y Trp-28) (Eklund *et al.*, 1984) se encuentran conservados en la TrxN Lys-66 y Lys-86 (figura 5).

		1		50
<i>N. alata</i> TrxN	(1)	MESY...SLLGGGAARAARAEASGSSNEFSRVIAFESNNRWQLHFNS	SEQLN	
<i>Arabidopsis</i> BAB10219	(1)	NGCALSTVFGGEGDATAAGTE--SEDPQVTFEFSARWQLHFNEIFESN		
<i>Arabidopsis</i> S58110	(1)	-----MGSNVSEVHDVHSSMEITSNGIWVEEFSRRQWKSIFDMSKGGN		
<i>Arabidopsis</i> ACC072595	(1)	-----MAGEGGEVIAQHTLEWVWNRKDKAKESK		
<i>Brassica</i>	(1)	-----MAATAEVLPAGEVIAQHTLEWVWNRKDKAKESK		
<i>Arabidopsis</i> S58119	(1)	-----MAAEEGQVIGCHTNEVWTVQIDKAKESN		
<i>Oryza</i>	(1)	-----MAAEHGQVIAQHNKDEEFAQDTKAKEAG		
<i>N. tabacum</i>	(1)	-----MAERGOVIGVHTVDAWNEHLOKGLDDK		
<i>Arabidopsis</i> BAB02711	(1)	--HLIPHAVSTAFYLRNSANPDQNRVISEHISELFAKTKAAKAS		
<i>E. coli</i> TXEC	(1)	-----MSDEIHLTDSEEDTDLKADG--		
<i>H. sapiens</i> P10599	(1)	-----MVKQTESKTAGQEAIDDAAG--D		
PTx	(1)	----MGGCVGNDRKLVDEKLEFRGGNVHVTTRKEDWDQVFAEANKDG		
lpTx	(1)	----MGGCVGSDRSIVDEKLEFRGGNVHVTTRKEDWDQVFAEANKDG		
hPTx	(1)	----MGGCVGNDRSIVDEKLEFRGGNVHVTTRKEDWDQVFAEANKDG		
seTx	(1)	----MGGCVGGRKSTVSEKLEFRGGNVHVTTRKEDWDQVFAEANKDG		
consensu	(1)		G V I T T E W L A	



**Figura 5.** Alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de diferentes secuencias de tioredoxinas incluyendo a la Trx de *N. alata*, inferida a partir del cDNA TrxN (*N. alata* TrxN). Se utilizó el componente AlignX del programa Vector NTI Suite 5.5. En el recuadro se agrupan los aminoácidos correspondientes al sitio activo de las tioredoxinas (Cys-62, Gly-63, Pro-64, Cys-65 en la Trx de *N. alata*). Los recuadros sobre la secuencia de la tioredoxina de *N. alata* indican los residuos que, además de los contenidos en el sitio catalítico, generalmente se conservan entre las Trxs, los cuales en la estructura primaria de esta Trx corresponden a Val-55, Asp-56, Phe-57, Ala-59, Trp-61, Lys-66, Pro-70, Lys-86, Asp-90, Pro-105, Val-120, Gly-121, Ala-122 (ver en el texto).

Finalmente, para inferir la localización celular del producto del cDNA TrxN se realizó la búsqueda de un péptido señal o de tránsito en el extremo amino terminal utilizando el programa Clorop I.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/Clorop/](http://www.cbs.dtu.dk/services/Clorop/)) (Emanuelsson *et al.*, 1999). Los



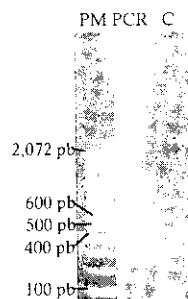
resultados obtenidos indican que en la secuencia aminoacídica no se encuentra una señal de tránsito a algún organelo ni de excreción, por lo que se puede concluir que la proteína codificada en el cDNA TrxN es citoplásmica y por lo tanto, una posible tiorredoxina tipo *h*.

### 6.3 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL CDNA TRXN

Con el fin de evaluar si realmente el cDNA TrxN codifica para una proteína con actividad de tiorredoxina, fue necesario clonarlo en el vector pGEX 4T-2 porque así es posible que la proteína de fusión, expresada a partir del plásmido recombinante, pueda ser purificada bajo condiciones no desnaturalizantes y en un solo paso por cromatografía de afinidad hacia la GST. De esta manera, al sobreexpresar este cDNA y purificar su producto se puede evaluar la capacidad de la proteína obtenida de reducir puentes disulfuro.

Para clonar el cDNA TrxN en el vector de expresión pGEX 4T-2, se hizo una amplificación por PCR con oligonucleótidos diseñados para flanquear toda la región codificante contenida en el cDNA AFLP-25 83.6 incluyendo dos sitios de restricción, *Bam*-HI en el extremo 5' y *Eco*-RI en el 3'.

El producto de la amplificación por PCR fue analizado electroforéticamente y, como se puede ver en la figura 6, se obtuvo un producto mayoritario a una longitud de aproximadamente 450 pb, el cual es similar al codificado por la secuencia del cDNA TrxN utilizada como plantilla, que es de 459 pb.

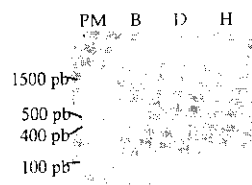


**Figura 6.** Amplificación por PCR del cDNA TrxN. Fraccionamiento electroforético del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PM: marcador de peso molecular; PCR: producto de amplificación utilizando como plantilla el cDNA AFLP-25 83.6 clonado en el plásmido pZL1; C: control de amplificación (H<sub>2</sub>O) (3).

El producto de PCR fue digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI, separado electroforéticamente y purificado a partir del gel para la reacción de ligado al

vector pGEX 4T-2, el cual fue previamente linearizado con las mismas enzimas de restricción. La razón de incluir dichos sitios de restricción fue porque en el sitio múltiple de clonación del vector, el sitio de restricción *Bam*-HI permite conservar el marco de lectura que codifica para el extremo carboxilo terminal de la glutatión-*S*-transferasa (GST) (figura 3), permitiendo así que el resultado de la traducción sea la posible tiorredoxina fusionada a la GST (proteína de fusión), ya que con el sitio de restricción *Eco*-RI en el extremo 3' del cDNA TrxN también se asegura de que éste sea ligado en la orientación correcta.

Con el producto de la reacción de ligado se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se aislaron 9 colonias transformantes (seleccionadas por su resistencia a crecer en presencia de ampicilina), de las cuales, después de haber purificado el DNA plasmídico y digerirlo con las enzimas de restricción antes mencionadas, sólo las clonas B, D y H contenían al plásmido recombinante, ya que como se muestra en la figura 7, al analizar electroforéticamente los productos de la digestión del DNA plasmídico, se observa una banda de aproximadamente 450 pb, indicando que el plásmido de estas clonas contiene al cDNA TrxN flanqueado por los sitios de restricción *Bam*-III y *Eco*-RI.



**Figura 7.** Análisis de las colonias transformadas con el vector pGEX recombinante. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del DNA plasmídico digerido con *Bam*-HI y *Eco*-RI, teñido con bromuro de etidio. PM: marcador de peso molecular; B, D y H: DNA plasmídico proveniente de las clonas B, D y H, respectivamente.

#### 6.4 SOBREENPRESIÓN DEL CDNA TRXN

Para sobreexpresar el cDNA TrxN, se debe tener la certeza de que en las células transformantes éste no presente alguna inserción o deleción que pudiese alterar el marco de lectura. Para descartar esta posibilidad se secuenciaron los cDNAs de los plásmidos recombinantes provenientes de las clonas de *E. coli* DH5 $\alpha$  B, D y H. Se hizo un alineamiento con las secuencias de estos cDNAs y se encontró que únicamente las clonas B y H no presentaron ninguna mutación relevante (figura 8), razón por la cual sólo el DNA plasmídico de estas clonas fue usado para la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS,

descartando el DNA plasmídico de la clona D. Esta cepa fue utilizada porque en el vector pGEX 4T-2 la GST se encuentra bajo el control del promotor T7 y como estas células contienen el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac* UV5, entonces la sobreexpresión del gen blanco puede ser inducida por IPTG (Dabrowski y Kur, 1998).

En el alineamiento a nivel de nucleótidos de las diferentes clonas recombinantes, mostrado en la figura 8, se puede observar que las secuencias de los cDNAs de las clonas B y H son casi idénticas al cDNA TrxN excepto porque presentan una inserción, la cual es una citosina en la posición 440 (primer recuadro de la figura 8); mientras que la clona B además tiene una sustitución de guanina por citosina en la posición 452 (figura 8, segundo recuadro). Se considera que las supuestas inserciones pueden deberse a errores de secuenciación, ya que si éstas fueran verdaderas se generaría un codón de término prematuro y no se obtendría un producto de aproximadamente 16.8 kDa, tal y como se obtuvo cuando se indujo la expresión en las clonas H1 y H2, ya que éstas fueron las que se utilizaron para tales ensayos (figuras 10 y 11). Sin embargo, se alinearon las secuencias aminoácidas inferidas a partir de las secuencias de los cDNAs tanto con la inserción como sin ella (figura 9) y el codón de término prematuro producido por dicha mutación sólo evita la traducción de 10 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la posible tiorredoxina. Por otro lado, si se ignora tal inserción, la proteína inferida a partir del cDNA de la clona B sí es diferente en el residuo 146, razón por la cual éste no fue utilizado para la expresión de la proteína.

		1		50
cDNA TrxN	(1)	----- ATGGGATCGTATCTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGA		
pGEX TrxN B	(1)	GGATCCATGGGATCGTATCTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGA		
pGEX TrxN H	(1)	GGATCCATGGGATCGTATCTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGA		
Consenso	(1)	GGATCCATGGGATCGTATCTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGA		
		<i>Bam</i> -III		
		51		100
cDNA TrxN	(45)	AGCGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTG		
pGEX TrxN B	(51)	AGCGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTG		
pGEX TrxN H	(51)	AGCGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTG		
Consenso	(51)	AGCGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTG		
		101		150
cDNA TrxN	(95)	CTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCTCCAATTCC		
pGEX TrxN B	(101)	CTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCTCCAATTCC		
pGEX TrxN H	(101)	CTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCTCCAATTCC		
Consenso	(101)	CTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCTCCAATTCC		
		151		200
cDNA TrxN	(145)	TCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGGCGCTACATGGTG		
pGEX TrxN B	(151)	TCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGGCGCTACATGGTG		
pGEX TrxN H	(151)	TCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGGCGCTACATGGTG		
Consenso	(151)	TCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGGCGCTACATGGTG		
		201		250
cDNA TrxN	(195)	TGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGT		
pGEX TrxN B	(201)	TGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGT		
pGEX TrxN H	(201)	TGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGT		
Consenso	(201)	TGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGCTGCCAAGT		

		251		300
cDNA TrxN	(245)	<b>ATACCGACGTTGACTTCGTC</b> AAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTA		
pGEX TrxN B	(251)	<b>ATACCGACGTTGACTTCGTC</b> AAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTA		
pGEX TrxN H	(251)	<b>ATACCGACGTTGACTTCGTC</b> AAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTA		
Consenso	(251)	ATACCGACGTTGACTTCGTC	AAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTA	
		301		350
cDNA TrxN	(295)	<b>GCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTT</b> TGCTGCTGAAGCA		
pGEX TrxN B	(301)	<b>GCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTT</b> TGCTGCTGAAGCA		
pGEX TrxN H	(301)	<b>GCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTT</b> TGCTGCTGAAGCA		
Consenso	(301)	GCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTT	TGCTGCTGAAGCA	
		351		400
cDNA TrxN	(345)	<b>AGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGA</b>		
pGEX TrxN B	(351)	<b>AGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGA</b>		
pGEX TrxN H	(351)	<b>AGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGA</b>		
Consenso	(351)	AGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGA		
		401		450
cDNA TrxN	(395)	<b>AAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGC</b> TAGTAATTAT		
pGEX TrxN B	(401)	<b>AAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGC</b> TAGTAATTAT		
pGEX TrxN H	(401)	<b>AAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGC</b> TAGTAATTAT		
Consenso	(401)	AAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGC	TAGTAATTAT	
		451		483
cDNA TrxN	(444)	<b>CGAACTAAATTCATGTCCAATAA</b> -----		
pGEX TrxN B	(451)	<b>CGAACTAAATTCATGTCCAATAAATGAATTC</b>		
pGEX TrxN H	(451)	<b>CGAACTAAATTCATGTCCAATAAATGAATTC</b>		
Consenso	(451)	CGAACTAAATTCATGTCCAATAAATGAATTC		

Eco-RI

**Figura 8.** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del cDNA TrxN original (cDNA TrxN), de la clona B (pGEX TrxN B) y H (pGEX TrxN H). Los sitios de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI incluidos en la amplificación por PCR se encuentran indicados por su nombre. En el recuadro grande se indica la supuesta inserción en la posición 440, mientras que en el pequeño se muestra la sustitución de guanina por citosina en la posición 452 del cDNA proveniente de la clona B.

		103		153
Prot cDNA TrxN	(103)	<b>MPTFLLKQK</b> EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAASNYTKFHVQK		
Prot B (CI)	(103)	<b>MPTFLLKQK</b> EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAA-----		
Prot B (SI)	(103)	<b>MPTFLLKQK</b> EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAASNYTKFHVQ-		
Prot H (CI)	(103)	<b>MPTFLLKQK</b> EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAA-----		
Prot H (SI)	(103)	<b>MPTFLLKQK</b> EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAASNYTKFHVQ-		
Consenso	(103)	MPTFLLKQK	EVERVVGAKKDELEKKILKHREAPKFAASNY TKFHVQ	

**Figura 9.** Alineamiento de los 50 últimos aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la secuencia aminoacídica inferida a partir del cDNA TrxN original (Prot cDNA TrxN) con aquellas inferidas a partir del pGEX cDNA TrxN B (Prot B) y H (Prot H) tomando en cuenta la supuesta inserción (CI) y considerándola como error de secuenciación (SI). En el recuadro se indica la diferencia de aminoácidos resultado de la mutación presente en la posición 452 del cDNA de la clona B.

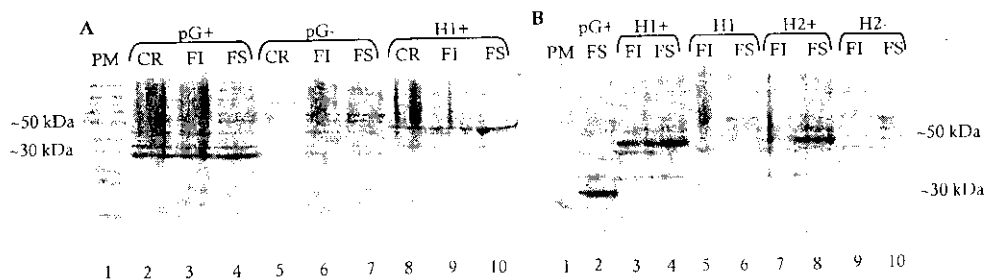
De la transformación de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS se aislaron cuatro colonias transformantes, dos de ellas contenían el DNA plasmídico proveniente de la clona B (B1 y B2) y otras dos de la clona H (H1 y H2). En las clonas H1 y H2 se indujo la sobreexpresión con IPTG del cDNA TrxN y se hizo un primer análisis electroforético de los extractos proteicos totales por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos indican que las clonas H1 y H2 sobreexpresaron favorablemente a la proteína de fusión (figura 10).

Para determinar la eficiencia del método y cuál es la proteína sobreexpresada por las células inducidas con IPTG, se indujo la sobreexpresión sobre una clona que contiene el plásmido no recombinante (sólo expresa la GST) y fueron analizados los extractos proteicos totales. En la fase soluble se observó una banda menor a los 30 kDa con mayor intensidad

con respecto a las demás bandas dentro de la misma fase del extracto, lo que indica que hay una sobreexpresión inducida por el IPTG de una proteína con una masa molecular similar a la de la GST que es de 29 kDa (carriles 4 y 2 de las figuras 10A y B, respectivamente). Otro punto importante es que la GST sobreexpresada se localiza mayoritariamente en la fase soluble, tal y como se puede ver en los carriles 2, 3 y 4 de la figura 10A.

Al no utilizar IPTG sobre la misma clona y hacer el análisis por SDS-PAGE, la banda correspondiente a la GST no se distingue del resto de las bandas, indicando que es expresada en un grado basal (carriles 5, 6 y 7 de la figura 10A).

Por otro lado, se obtuvo que las clonas H1 y H2 sobreexpresaron favorablemente la proteína de fusión, localizada principalmente en la fase soluble del lisado celular y presentando una migración cercana a 50 kDa (figura 10B, carriles 3, 4, 7 y 8). Fue fácil determinar cuál era la proteína sobreexpresada en estos casos porque al comparar estos resultados con los obtenidos utilizando la clona con el plásmido no recombinante, se puede observar una banda más prominente en comparación con el resto de las proteínas cuando se utiliza IPTG (carriles 4 y 8 de la figura 10B). Además, la masa de esta proteína corresponde a la suma de la GST (29 kDa) y la de la proteína codificada por el cDNA TrxN (~16.8 kDa).

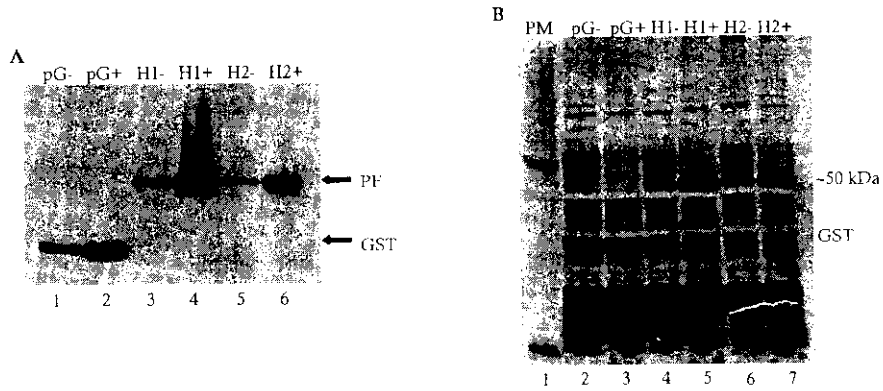


**Figura 10.** Análisis electroforético por SDS-PAGE de la sobreexpresión del cDNA AFLP-25 83.6. Extractos de proteína total bacteriana obtenidos por sonicación y fraccionados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5% y teñido con azul brillante de Coomassie. A y B: PM: marcador de peso molecular; CR: células resuspendidas en PBS 1X; FI: fase insoluble; FS: fase soluble; pG+: inducción sobre el plásmido no recombinante con IPTG; pG-: control de inducción sobre el plásmido no recombinante (sin IPTG); H1+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H1 con IPTG; H1-: control de inducción sobre la clona H1 (sin IPTG); H2+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H2 con IPTG; H2-: control de inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H2 (sin IPTG). 1.a inducción de la sobreexpresión se realizó sobre cultivos bacterianos a una  $A_{600}$  de 0.5 - 0.7 por 3 horas a 37°C y con IPTG a una concentración final de 0.1 mM.

Una evidencia más de la existencia de la proteína de fusión en las clonas H1 y H2 fue la inmunodetección de la proteína GST fusionada al producto del cDNA TrxN. La inmunodetección se realizó utilizando extractos proteicos bacterianos de la fase soluble transferidos a una membrana PVDF, la cual se incubó con un anticuerpo contra la GST. Este

anticuerpo únicamente detectó a una proteína de 29 kDa en la fase soluble del extracto proveniente de la clona que contiene el plásmido no recombinante (figura 11A, carriles 1 y 2) y otra menor a 50 kDa en las fases solubles de los extractos de las clonas H1 y H2 (figura 11A, carriles 3, 4, 5 y 6), lo cual indica que esta última es efectivamente la proteína de fusión.

Cabe mencionar que la inmunodetección indica que existe una expresión basal tanto de la GST en una clona transformante con el vector no recombinante como de la proteína de fusión en las clonas H1 y H2 (figura 11A, carriles 1, 3 y 5), la cual no se puede apreciar con una tinción utilizando azul brillante de Coomassie o nitrato de plata, tal y como se muestra en los carriles 2, 4 y 6 de la figura 11B. Sin embargo, es claro que con IPTG se induce una sobreexpresión de ambas proteínas (GST y proteína de fusión), ya que la intensidad de las bandas correspondientes es mucho mayor que cuando no hay inducción.

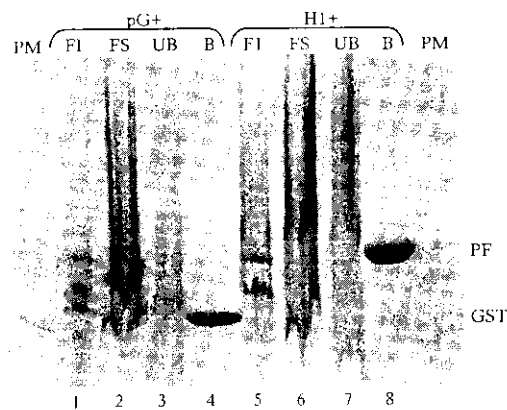


**Figura 11.** Análisis por western-blot de la proteína de fusión (GST-tiorredoxina). Las proteínas de las fases solubles obtenidas por sonicación fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE al 10%, transferidas a una membrana PVDF y revelado con anticuerpos policlonales contra GST (A). Tinción de las proteínas de los mismos extractos en el gel de poliacrilamida con nitrato de plata; PM: marcador de peso molecular (B). A y B. pG-: control de inducción sobre el plásmido no recombinante (sin IPTG); pG+: inducción de la sobreexpresión con IPTG sobre el plásmido no recombinante; H1-: control de inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H1 (sin IPTG); H1+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H1 con IPTG; H2-: control de inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H2 (sin IPTG); H2+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H2.

### 6.5 PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LA POSIBLE TIORREDOXINA

Una vez demostrado por inmunodetección que se tiene a la proteína de fusión, principalmente en la fase soluble, se purificó por medio de una cromatografía de afinidad utilizando glutatión sepharosa 4B.

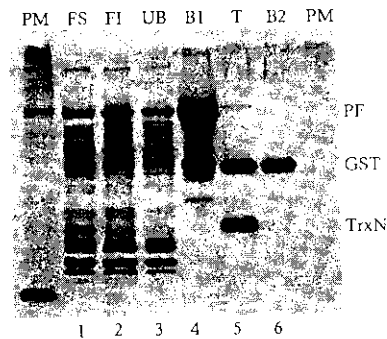
A la glutatión sepharosa 4B se le aplicó por separado la fase soluble del extracto proteico obtenido después de inducir la sobreexpresión con IPTG, tanto de la clona con el vector no recombinante como de la clona H1. Las proteínas unidas específicamente a esta resina fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE. En la figura 12 (carriles 4 y 8) se muestra que tanto la GST como la proteína de fusión se unieron de manera mayoritaria y específica a la resina glutatión sepharosa 4B, lo cual permitió purificar a ambas proteínas en un solo paso.



**Figura 12.** Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad. Tinción con azul brillante de Coomassie. PM: marcador de peso molecular; pG+: inducción sobre el plásmido no recombinante con IPTG; H1+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H1 con IPTG; FI: fase insoluble; FS: fase soluble; UB: lo que no se une a la resina; B: eluto de lo que se unió a la resina utilizando glutatión reducido.

Un paso final en la purificación del producto del cDNA TrxN es la separación de éste de la proteína GST, por lo que para obtener a la posible tiorredoxina libre de la GST se realizó una proteólisis con trombina. Esta proteasa reconoce la secuencia -Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser- ubicada en el extremo carboxilo de la GST, separando a la cadena polipeptídica entre los residuos de arginina y glicina (figura 3), liberando así a la proteína fusionada, en este caso a la codificada por el cDNA TrxN. La reacción proteolítica primero se llevó a cabo adicionando trombina resuspendida en PBS 1X a la proteína de fusión ya eluida de la

glutación sepharosa 4B (figura 13, carril 4). Como resultado de la proteólisis se obtuvieron dos proteínas, una de 29 kDa y otra menor a los 20 kDa, la cual muy probablemente corresponde a la supuesta tiorredoxina (figura 13, carril 5). Para corroborar que efectivamente una de estas proteínas era la posible tiorredoxina, se volvió a realizar una cromatografía de afinidad con la misma resina pasando la fracción que contenía a estas proteínas libres. Se observó la unión de sólo una proteína de 29 kDa, correspondiente a la GST, como se puede ver en el carril 6 de la figura 13, lo cual indica que la proteína fusionada a la GST es diferente a ésta.



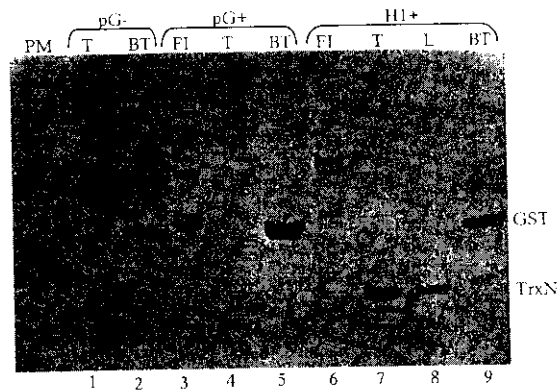
**Figura 13.** Proteólisis de la proteína de fusión. SDS-PAGE de diferentes extractos provenientes de la clona H1. Tinción con nitrato de plata. PM: marcador de peso molecular; FS: fase soluble; FI: fase insoluble; UB: lo que no se une a la resina; B1: eluato de lo que se unió a la resina; T: resultado del tratamiento con la proteasa trombina sobre el eluato (B1); B2: eluato de lo que se unió a la resina posterior al tratamiento con trombina (T). PF: proteína de fusión; GST: glutatión-S-transferasa; TrxN: proteína codificada en el cDNA TrxN.

De manera alternativa, un método eficiente de obtener a la posible tiorredoxina pura y libre de la GST fue realizando la proteólisis sobre la proteína de fusión unida a la glutatión sepharosa 4B. De esta forma, dicha tiorredoxina queda mayoritariamente en el sobrenadante (figura 14, carril 7), mientras que la GST permanece unida a la resina y sólo se libera de ésta al adicionar glutatión reducido (figura 14, carril 9). En el carril 8 de esta figura se muestra que es posible recuperar más proteína recombinante con un lavado con PBS 1X posterior al tratamiento con trombina y anterior al proceso de elusión.

Como era de esperarse, al adicionar la proteasa trombina a la proteína obtenida a partir del plásmido no recombinante unida a la glutatión sepharosa 4B, en el sobrenadante no se detecta ninguna proteína, tanto sin inducción como con inducción de la sobreexpresión por IPTG, tal y como se observa en los carriles 1 y 4 de la figura 14; mientras que el eluato es la GST (figura 14, carriles 2 y 5), la cual tiene el mismo peso molecular que la proteína del



carril 9 (29 kDa), lo que corrobora que ambos eluatos corresponden a la glutatión-S-transferasa.



**Figura 14.** Análisis por SDS-PAGE de los procesos de purificación y proteólisis de la proteína recombinante. Tinción con azul brillante de Coomassie. PM: marcador de peso molecular; pG-: control de inducción sobre el plásmido no recombinante (sin IPTG); pG+: inducción sobre el plásmido no recombinante con IPTG; H1+: inducción sobre el plásmido recombinante de la clona H1 con IPTG; FI: fase insoluble; T: resultado del tratamiento con la proteasa trombina; BT: eluato de lo que permaneció unido a la resina después del tratamiento con trombina; L: lavado de la resina con PBS 1X.

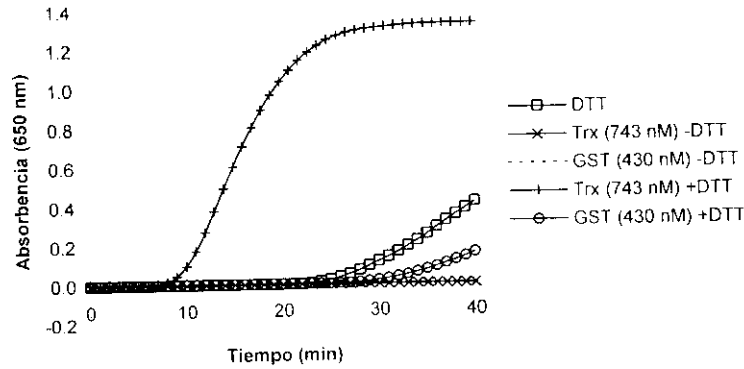
#### 6.6 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE TIORREDOXINAS

Para evaluar si el producto del cDNA TrxN corresponde a una tiorredoxina, se evaluó si la proteína recombinante de ~16.8 kDa, sobreexpresada y purificada anteriormente, tenía la capacidad de catalizar la reducción de puentes disulfuro por medio de un ensayo de actividad específica de tiorredoxinas.

El ensayo de actividad enzimática se realizó utilizando un método en el que se mide la turbidez que se genera por la precipitación de la cadena B de la insulina al reducirse los puentes disulfuro que unen a las cadenas A y B de dicha proteína. Esta reducción es catalizada por la tiorredoxina utilizando como donador de electrones al DTT (Holmgren, 1979).

Después de optimizar las condiciones de reacción en el ensayo de actividad enzimática, en la figura 15 se observa que la reacción sólo con DTT inició a los 24 minutos, mientras que con la posible tiorredoxina a una concentración final de 743 nM, ésta comienza a los 9 minutos aproximadamente y a los 24 minutos la velocidad de reacción es constante, lo que comprueba que la enzima producto del cDNA TrxN es efectivamente una

tiorredoxina, ya que está catalizando la reducción de los puentes disulfuro de la insulina. Como se puede ver en esta misma figura, la GST a una concentración final de 430 nM muestra un inicio de reacción aún más lento que únicamente con DTT (a los 30 minutos). Esta importante diferencia significativa de actividad no se debe a las distintas concentraciones utilizadas de GST y tiorredoxina recombinante, ya que ambas se encuentran en un mismo orden de magnitud, sino que demuestra que este ensayo es específico para medir la actividad de las tiorredoxinas.



**Figura 15.** Ensayo de actividad de tiorredoxina. Se utilizó una concentración final de TrxN de 743 nM. DTT: reacción únicamente con DTT; GST -DTT: reacción únicamente con GST; GST +DTT: reacción con GST y DTT; Trx -DTT: reacción únicamente con tiorredoxina; Trx +DTT: reacción con tiorredoxina y DTT. Entre paréntesis se indica la concentración final de la proteína utilizada en la mezcla de reacción.

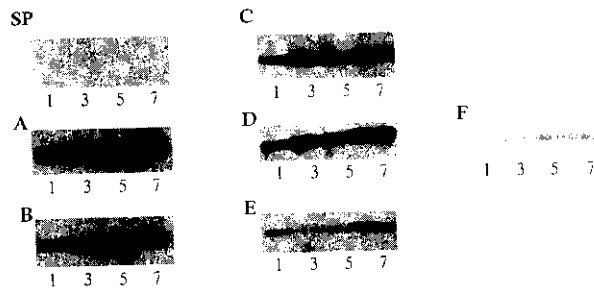
Los resultados hasta ahora presentados indican que la proteína codificada por el cDNA TrxN es una tiorredoxina y que podrá ser utilizada posteriormente como una herramienta para poder identificar sus proteínas blanco en el estilo de *N. alata*.

## 6.7 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA TRXN

Para cubrir el último objetivo de este trabajo, una vez confirmado que el cDNA TrxN codifica para una tiorredoxina, se procedió a la producción de anticuerpos policlonales en conejo.

Como las tiorredoxinas en general son proteínas conservadas tanto en procariontes como eucariontes, esto hace que su carácter inmunogénico sea bajo. Por lo tanto, para asegurar que el conejo inmunizado produjera anticuerpos contra la tiorredoxina recombinante, ésta fue acoplada a hemocianina.

Después de realizar una inmunización semanal por un periodo de cinco semanas, se midió el título de los anticuerpos (figura 16) con diluciones crecientes del suero sobre la tiorredoxina recombinante pura en diferentes cantidades (1, 3, 5 y 7  $\mu\text{g}$ ). Los resultados muestran un título claro de 1:10,000 (figura 16E); sin embargo, el título de 1:1,000 (figura 16A) resultó ser el más apropiado al ser aplicado sobre un extracto de proteína total de estilos de *N. alata* (figura 17A).



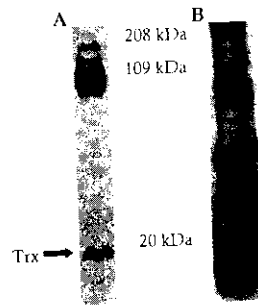
**Figura 16.** Titulación de los anticuerpos policlonales contra la tiorredoxina recombinante obtenidos a partir de suero de conejo. La inmunodetección se hizo contra 1, 3, 5 y 7  $\mu\text{g}$  (1, 3, 5, 7) de la proteína recombinante pura. SP 1:1,000, título de 1:1,000 del suero preinmune. A. Título 1:1,000 de la primera muestra inmunológica (tomada a la cuarta semana). B. Título 1:2,000 de la primera muestra inmunológica. C. Título 1:3,000 de la primera muestra inmunológica. D. 1:5,000 de la muestra inmunológica definitiva (tomada a la quinta semana). E. 1:10,000 de la muestra definitiva. F. SDS-PAGE de la tiorredoxina recombinante pura teñida con azul brillante de Coomassie.

#### 6.8 INMUNODETECCIÓN DE TIORREDOXINA EN ESTILOS DE *N. ALATA* UTILIZANDO LOS ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO CONTRA LA TRXN

Finalmente, como en nuestro grupo de investigación se estudia el sistema de AI en *N. alata*, los anticuerpos policlonales de conejo contra el producto del cDNA TrxN serán principalmente utilizados para inmunodetectar a la tiorredoxina en estilos de dicha especie. Por lo tanto, fue necesario realizar una inmunodetección utilizando los anticuerpos policlonales producidos en este trabajo para determinar su eficiencia en un extracto de proteínas totales de estilos de *N. alata* (figura 17).

Para este ensayo se utilizaron 6  $\mu\text{g}$  de proteínas totales estilares y después de una separación por SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana PVDF. La inmunodetección se realizó utilizando un título de los anticuerpos de 1:1,000 y se obtuvo que son capaces de reconocer a una proteína menor a los 20 kDa y otras de entre 100 y 200 kDa (figura 17A). La primera corresponde a la tiorredoxina de la planta; mientras que las otras corresponden a una

reacción cruzada de los anticuerpos. Por lo tanto, es necesario que se realice posteriormente una inmunopurificación para una utilización más fina de dichos anticuerpos.



**Figura 17.** Análisis por western-blot de los anticuerpos policlonales de conejo contra la TrxN sobre 6  $\mu$ g de proteínas totales estilares de *N. alata*. Las proteínas de dicho extracto fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE al 12.5%, transferidas a una membrana PVDF y revelado con los anticuerpos policlonales de conejo contra la tiorredoxina recombinante a un título de 1:1,000 (A). Tinción de las proteínas del mismo extracto (6  $\mu$ g) en el gel de poliacrilamida con nitrato de plata (B). A. Trx: tiorredoxina de la planta.

## DISCUSIÓN

### 7.1 ¿PARA QUÉ CODIFICA EL MARCO DE LECTURA ABIERTO CONTENIDO EN EL cDNA AFLP-25 83.6 (cDNA TrxN)?

Las tiorredoxinas son las enzimas más representativas de un grupo de proteínas que se encuentran ampliamente distribuidas y que poseen actividad de oxidoreductasa ditiol-disulfuro (Wollman *et al.*, 1988), desde procariontes hasta eucariontes, tienen del 27 al 69% de identidad a nivel de aminoácidos con la Trx de *E. coli* (Eklund *et al.*, 1991). En el caso de la estructura primaria de la tiorredoxina de *N. alata* (TrxN), inferida a partir del cDNA TrxN (figura 4), se encontró una baja identidad (20.1%) con la Trx de *E. coli*, lo cual es un poco más bajo de lo esperado. Asimismo, en la secuencia aminoacídica de la TrxN no se encontró ninguna señal de tránsito ni de excreción, lo que la ubica directamente en el grupo de las Trxs tipo *h* (Meyer *et al.*, 1999). Las Trxs citoplásmicas son un poco más largas que la de *E. coli* y, de acuerdo con los análisis de las estructuras primarias, se ha reportado que la Trx *h* vegetal está mucho más relacionada con la humana que con la de *E. coli* (Schürmann y Jacquot, 2000), entonces el producto para el que codifica el cDNA TrxN corresponde a una tiorredoxina citoplásmica (tipo *h*), ya que ésta cuenta con extensiones hacia los extremos amino y carboxilo terminales, lo que provoca que su secuencia sea más larga que la de la Trx de *E. coli* (figura 5). Además, se encontró que tiene un índice máximo de identidad del 28.8% con una tiorredoxina humana y uno del 55.6% con una de *Arabidopsis*, lo que significa que la TrxN es más parecida a la Trx vegetal que a la de humano y que se parece más a ésta que a la de *E. coli*, tal y como ocurre con las demás Trxs *h* vegetales (Schürmann y Jacquot, 2000).

En el alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos de la TrxN con otras tiorredoxinas tipo *h* de diferentes organismos (figura 5), se pudo también corroborar que esta proteína, en su estructura primaria, conserva tanto los residuos del sitio activo (-Cys-Gly-Pro-Cys-) como aquéllos considerados importantes para la interacción de la Trx con su proteína blanco y otros que generalmente se conservan entre las diferentes tiorredoxinas, dentro de los cuales algunos tienen gran importancia en cuanto a su conformación tridimensional (Eklund *et al.*, 1991).



Con respecto a la estructura terciaria de la proteína codificada en el cDNA TrxN se puede especular que ésta podría mantener la estructura común de las tiorredoxinas:  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\alpha 4$  (Holmgren, 1985). Es posible hacer esta aseveración porque se sabe que a pesar de que entre las tiorredoxinas existe un bajo nivel de identidad, sus estructuras tridimensionales son muy similares (Holmgren, 1985; Eklund *et al.*, 1991). Una evidencia teórica para poder apoyar esta idea es que el residuo Pro-40 de la Trx de *E. coli*, conservado en la posición 70 de la TrxN (figura 5), provoca un doblamiento en la segunda  $\alpha$ -hélice, el cual mantiene a los residuos del sitio activo en la posición correcta del extremo amino de dicha hélice; por otro lado, el residuo Pro-76 de la Trx de *E. coli* también se encuentra conservado en la secuencia de la TrxN en la posición 105 y es el que mantiene la estructura nativa de la molécula (Eklund *et al.*, 1991). Sin embargo, es necesario tener a la TrxN cristalizada para poder tener evidencia experimental que soporte esta hipótesis acerca de su estructura terciaria.

## 7.2 COMPROBACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL PRODUCTO CODIFICADO POR EL cDNA TRxN POR MEDIO DE UN ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ESPECÍFICO PARA LAS TIORREDOXINAS

Con los resultados obtenidos a partir de la comparación de la TrxN con otras tiorredoxinas se puede proponer que esta proteína es una tiorredoxina tipo *h*. Sin embargo, es necesario contar con evidencia experimental que apoye la identidad del producto codificado por el cDNA TrxN. Para contar con tal evidencia, se debe tener a la proteína codificada por este cDNA pura y así realizar un ensayo de actividad específico para el tipo de proteína al que podría corresponder dicho producto, en este caso se utilizó un ensayo de actividad específico para tiorredoxinas (Holmgren, 1979) por el dominio de Trx codificado en la proteína.

Con el fin de demostrar que los datos obtenidos a partir de la estructura primaria de la TrxN eran verdaderos, fue necesario reclonar el cDNA TrxN en un vector de expresión para sobreexpresar a la tiorredoxina recombinante. Teniendo a la TrxN pura (figuras 13 y 14) fue posible evaluar su actividad de oxidoreductasa ditiol-disulfuro por medio del ensayo de actividad propuesto por Holmgren (1979). El resultado que se obtuvo apoya completamente la evidencia teórica que se tenía, es decir, la TrxN es efectivamente una

tioredoxina, ya que mostró la capacidad de catalizar la reducción de los puentes disulfuro que unen a las cadenas A y B de la insulina (figura 15) utilizando como donador de electrones al DTT para regenerar el estado redox de la TrxN.

Un dato implícito de gran importancia que se obtuvo a partir de la identificación experimental del producto codificado por el cDNA TrxN (figura 15), fue que la proteína recombinante es una enzima biológicamente funcional, lo que significa que la TrxN podrá ser utilizada directamente sobre extractos de proteína total de distintos órganos de *N. alata* para identificar a sus proteínas blanco siguiendo la estrategia propuesta por Yano *et al.* (2001). En esta metodología, los extractos proteicos totales son incubados con los elementos del sistema Trx/NADPH-TrxR, para mantener a la tioredoxina reducida, y tratados posteriormente con monobromobimano (mBBBr), el cual es una sonda fluorescente que sirve para marcar los grupos sulfhidrilo. Las proteínas son aisladas por electroforesis en dos dimensiones (Yano *et al.*, 2001) y aquéllas identificadas como blanco de la TrxN podrán ser purificadas para realizar una microsecuenciación de su extremo amino terminal. Comparando los resultados obtenidos con la base de datos, se podrá conocer la identidad de los péptidos, cuando sea posible. De esta manera se podrá tener información fundamental para conocer el papel que desempeña la TrxN en *N. alata*.

### 7.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO CONTRA LA TRxN

Ya con las evidencias suficientes que apoyan la idea de que la TrxN es una tioredoxina, se pudo cubrir de manera coherente el último objetivo de este trabajo: producir anticuerpos policlonales de conejo contra el producto del cDNA TrxN. Como ya se sabe, las tioredoxinas son proteínas que se encuentran conservadas entre todos los taxa, por lo que el carácter inmunogénico de la TrxN seguramente es bajo. Sin embargo, fue posible producir anticuerpos acoplado a la proteína recombinante pura con hemocianina y así utilizarla como antígeno. El título que se obtuvo después de cinco inmunizaciones probando los anticuerpos contra la TrxN pura fue de 1:10,000 (figura 16).

Un punto importante a saber para entender la función de la TrxN dentro de algún sistema bioquímico es conocer sus patrones de expresión a nivel de mRNA y proteína. Sin embargo, el patrón de expresión a nivel de mRNA no siempre coincide con el de su



producto, por lo que fue necesario demostrar que los anticuerpos producidos en este trabajo reconocían a una tiorredoxina de la planta sobre un extracto de proteínas totales de estilo de *N. alata*. En una investigación relacionada a Trx en nuestro laboratorio ya se había demostrado que el mRNA de la TrxN se expresa en sépalos, pétalos, anteras y estilos y en menor cantidad en tallo y hoja. El resultado que se obtuvo fue que los anticuerpos a una dilución de 1:1,000 reconocen a una proteína menor de 20 kDa, además de presentar reacción cruzada con proteínas de alto peso molecular (90 - 150 kDa) (figura 17).

Cabe mencionar que es difícil afirmar que la proteína de bajo peso molecular reconocida por los anticuerpos contra la TrxN es verdaderamente una tiorredoxina. Un experimento que se propone para poder confirmar este dato es inmunoprecipitar a la supuesta Trx de un extracto de proteínas totales y medir la actividad residual de tiorredoxina en el sobrenadante. Si los anticuerpos policlonales contra la TrxN recombinante efectivamente reconocen a una tiorredoxina en *N. alata*, entonces la actividad se verá reducida por dicha inmunoprecipitación y se podrá asegurar que la proteína inmunodetectada es una tiorredoxina de la planta.

#### 7.4 PERSPECTIVAS

El hecho de que existan varias tiorredoxinas en un mismo compartimiento celular trae consigo el problema de su redundancia funcional o especificidad (Jacquot *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha descubierto que las tiorredoxinas están involucradas en diversos sistemas bioquímicos, lo cual es una prueba de su gran importancia y especificidad (Arnér y Holmgren, 2000). La diferencia de especificidad entre las tiorredoxinas puede deberse al potencial redox particular de cada proteína, a las características de sus secuencias aminoácidas que permitan interacciones con proteínas blanco en particular o a otras propiedades aún desconocidas de estas proteínas (Åslund y Beckwith, 1999).

La pregunta que surge después de los datos presentados en este trabajo es: ¿cuál es la función de la TrxN en *N. alata*, en específico dentro de las redes de interacción polen-pistilo? Es claro que existe un nivel de especificidad de las tiorredoxinas hacia sus

proteínas blanco y que sólo teniendo la información completa acerca de éstas se podrá entender el papel de la TrxN (Yano *et al.*, 2001).

Como en nuestro grupo de investigación se estudia el sistema de AI gametofítico en *N. alata*, resultó muy interesante haber encontrado a una tiorredoxina que posiblemente está involucrada en dicho sistema o en un contexto más general dentro de las complejas redes de interacción polen-pistilo. Al respecto, Cabrillac *et al.* (2001) descubrieron que en el sistema de AI esporofítico en *Brassica*, una tiorredoxina inhibe la autofosforilación de SRK, el cual es un receptor con actividad de cinasa que se encuentra en la membrana celular de las células estigmáticas y que se ha definido como el determinante femenino de la especificidad genética en las reacciones de AI en *Brassica* (Takasaki *et al.*, 2000). Esta inhibición termina cuando SRK entra en contacto con su ligando, el determinante genético masculino (SCR), y así puede fosforilarse para dar inicio a la cascada de señales. Se ha encontrado que la proteína ARC1 interactúa específicamente con SRK fosforilado (Gu *et al.*, 1998) y que esta última proteína tiene en su mitad amino terminal un dominio de unión para interactuar con el siguiente paso de la ruta de señales, el cual posiblemente es una proteína similar a las acuaporinas (MOD) (Ikeda *et al.*, 1997). Sin la inhibición de SRK causada por la tiorredoxina, este receptor se autofosforilaría espontáneamente y daría como resultado el rechazo de cualquier grano de polen, provocando esterilidad en la planta (Cabrillac *et al.*, 1991).

El hecho de que una tiorredoxina esté involucrada en el sistema de AI esporofítico en *Brassica*, no asegura que también haya una Trx involucrada en el sistema de AI gametofítico en *N. alata*. Sin embargo, junto con otras evidencias, es muy probable que la TrxN esté participando en alguna función específica dentro de las redes de interacción polen-pistilo en *Nicotiana*. Por lo tanto, para poder conocer el papel de la TrxN dentro de dichas redes es necesario contar con las herramientas que en este trabajo se proveen.

Los anticuerpos contra la TrxN pueden ser utilizados para inmunodetectar e inmunolocalizar a la tiorredoxina en la planta y así poder definir los patrones de expresión tanto espaciales como temporales a nivel de proteína. Asimismo, la proteína recombinante activa podrá ser utilizada para identificar a sus proteínas blanco (Yano *et al.*, 2001). Es claro que con la información que se puede obtener a partir de los datos mostrados en este trabajo se podrá definir la posición de la TrxN dentro de los genes modificadores del sistema de AI (Cruz-García y McClure, 2001) y así tener una idea más clara de la

importancia biológica de contar con este tipo de proteínas que ejercen una regulación redox a nivel celular. En este caso, sería de gran importancia definir la función de la tioredoxina en *N. alata* porque estaría directamente relacionada con un proceso básico en biología: la reproducción sexual en plantas.

## CONCLUSIONES

1. El cDNA TrxN codifica para una proteína citoplásmica con actividad de tiorredoxina (tiorredoxina tipo *h*).
2. Los anticuerpos policlonales contra la TrxN reconocen a una proteína menor de 20 kDa en extractos de proteína total de estilos de *N. alata*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abate, C., L. Patel, F. J. Rauscher III y T. Curran. 1990. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* **249(4973)**: 1157-1161.
- Akamatsu, Y., T. Ohno, K. Hirota, H. Kagoshima, J. Yodoi y K. Shigesada. 1997. Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **272(23)**: 14497-14500.
- Arnér, E. S. J. y A. Holmgren. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267(20)**: 6102-6109.
- Arcott, L. D., S. Gromer, R. H. Schirmer, K. Becker y C. H. Jr. Williams. 1997. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(8)**: 3621-3626.
- Åslund, F. y J. Beckwith. 1999. Guest Commentary. The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* **181(5)**: 1375-1379.
- Baier, M. y K. J. Dietz. 1996. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* **31(3)**: 553-564.
- Berntsen, H., P. E. Lonning, D. Ekse, B. Neteland, D. C. Jahannessen, R. Berge y A. Svardal. 1998. Influence of treatment with aminoglutethimide on plasma and red-blood-cell glutathione status in breast cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42(1)**: 46-52.
- Besse, I., J. H. Wong, K. Kobrehel y B. B. Buchanan. 1996. Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(8)**: 3169-3175.
- Björnstedt, M., J. Xue, W. Huang, B. Akesson y A. Holmgren. 1994. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **269(47)**: 29382-29384.
- Bower, M. S., D. D. Matias, E. Fernandes-Carvalho, M. Mazzurco, T. Gu, S. J. Rothstein y D. R. Goring. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *Brassica S* locus receptor kinase. *Plant Cell* **8(9)**: 1641-1650.
- Bréhélin, C., N. Mouaheb, L. Verdoucq, J. -M. Lancelin e Y. Meyer. 2000. Characterization of determinants for the specificity of *Arabidopsis* thioredoxins h in yeast complementation. *J. Biol. Chem.* **275(41)**: 31641-31647.
- Buchanan, B. B. 1980. Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 341-374.
- Cabrillac, D., J. M. Cock, C. Dumas y T. Gaude. 2001. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410(6825)**: 220-223.
- Capitani, G., Z. Markovic-Housley, G. DelVal, M. Morris, J. N. Jansonius y P. Schürmann. 2000. Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **302(1)**: 135-154.
- Chae, H. Z., S. J. Chung y S. G. Rhee. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269(44)**: 27670-27678.
- Chivers, P. T. y R. T. Raines. 1997. General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36(50)**: 15810-15816.

- ⓁClement-Metral, J. D., J.-O. Höög y A. Holmgren. 1986. Characterization of the thioredoxin system in the facultative phototroph *Rhodobacter sphaeroides* Y. *Eur. J. Biochem.* **161(1)**: 119-126.
- ⓁCruz-García, F. y B. A. McClure. 2001. Sexual incompatibility. Pp. 167-196. In Bhojwani, S. S. y W. Y. Soh (eds.). *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- ⓁDabrowski, S. y J. Kur. 1998. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant His-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein Expr. Purif.* **14**: 131-138.
- Ⓛde Nettancourt. 1977. *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag, N. Y., E. U. A.
- ⓁDeiss, L. P. y A. Kimchi. 1991. A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of a growth inhibitory signal. *Science* **252(5002)**: 117-120.
- ⓁEklund, H., C. Cambillau, B.-M. Sjöberg, A. Holmgren, H. Jörnvall, J.-O. Hoog y C. I. Branden. 1984. Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* **3(7)**: 1443-1449.
- ⓁEklund, H., F. K. Gleason y A. Holmgren. 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **11(1)**: 13-28.
- ⓁEmanuelsson, O., H. Nielsen y G. von Heijne. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* **8**: 978-984.
- ⓁGasdaska, J. R., M. Berggren y G. Powis. 1995. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.* **6(12)**: 1643-1650.
- ⓁGasdaska, J. R., D. L. Kirkpatrick, W. Montfort, M. Kuperus, S. R. Hill, M. Berggren y G. Powis. 1996. Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys 73→Ser mutation. *Biochem. Pharmacol.* **52(11)**: 1741-1747.
- ⓁGasdaska, P. Y., J. E. Oblong, I. A. Cotgreave y G. Powis. 1994. The predicted amino acid sequence of human thioredoxin is identical to that of the autocrine growth factor human adult T-cell derived factor (ADF): thioredoxin mRNA is elevated in some human tumors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1218(3)**: 292-296.
- ⓁGilmore, T. D., M. Koedood, K. A. Piffat y D. W. White. 1996. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* **13(7)**: 1367-1378.
- ⓁGu, T., M. Mazzurco, W. Sulaman, D. D. Matias y D. R. Goring. 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(1)**: 382-387.
- ⓁHayashi, S., K. Hajiro-Nakanishi, Y. Makino, H. Eguchi, J. Yodoi y H. Tanaka. 1997. Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res.* **25(20)**: 4035-4040.
- ⓁHogarth, L., M. English, L. Price, R. Wyllie, A. D. J. Pearson y A. G. Hall. 1996. The effect of treatment with high dose melphalan, cisplatin or carboplatin on levels of glutathione in plasma, erythrocytes, mononuclear cells and urine. *Cancer Chem. Pharmacol.* **37(5)**: 479-485.
- ⓁHolmgren, A. 1968. Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* **6(4)**: 475-484.
- ⓁHolmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 237-271.
- ⓁHolmgren, A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolopoamida. *J. Biol. Chem.* **254(19)**: 9627-9632.

- Ⓛ Holmgren, A., B. B. Buchanan, R. A. Wolosiuk. 1977. Photosynthetic regulatory protein from rabbit liver is identical with thioredoxin. *FEBS Lett.* **82(2)**: 351-354.
- Ⓛ Holmgren, A. y B. -O. Söderberg. 1970. Crystallization and preliminary crystallographic data for thioredoxin from *Escherichia coli* B. *J. Mol. Biol.* **54(2)**: 387-390.
- Ⓛ Holmgren, A., B. -O. Söderberg, H. Eklund y C. -I. Brändén. 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72(6)**: 2305-2309.
- Ⓛ Holmgren, A. y M. Björnstedt. 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* **252**: 199-208.
- Ⓛ Huan, Y. y F. E. Domann. 1998. Redox modulation of AP-2 DNA binding activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 307-312.
- Ⓛ Ikeda, S. J. B. Nasrallah, R. Dixit, S. Preiss y M. E. Nasrallah. 1997. An aquaporin-like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* **276(5318)**: 1564-1566.
- Ⓛ Ishiwatari, Y., T. Fujiwara, K. C. McFarland, K. Nemoto, H. Hayashi, M. Chino y W. J. Lucas. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205(1)**: 12-22.
- Ⓛ Jacquot, J. -P., J. M. Lancelin y Y. Meyer. 1997. Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* **136**: 543-570.
- Ⓛ Jordan, A. y P. Reichard. 1998. Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 71-98.
- Ⓛ Kallis, G. -B. y A. Holmgren. 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(1)**: 10261-10265.
- Ⓛ Kobrehel, K., J. H. Wong, A. Balogh, F. Kiss, B. C. Yee y B. B. Buchanan. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *f*. *Plant Physiol.* **99**: 919-924.
- Ⓛ Kurooka, H., K. Kato, S. Minoguchi, Y. Takahashi, J. Ikeda, *et al.* 1997. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene than encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* **39(3)**: 331-339.
- Ⓛ Laurent, T. C., E. C. Moore y P. Reichard. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides VI. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**: 3436-3444.
- Ⓛ Lemaire, S., E. Keryer, M. Stein, I. Schepens, E. Issakidis-Bourguet, C. Gérard-Hirne, M. Miginiac-Maslow y J. -P. Jacquot. 1999a. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **120(3)**: 773-778.
- Ⓛ Lemaire, S., M. Stein, E. Issakidis-Bourguet, E. Keryer, V. V. Benoit, B. Dineau, C. Gérard-Hirne, M. Miginiac-Maslow y J.-P. Jacquot. 1999b. The complex regulation of ferredoxin/thioredoxin-related genes by light and the circadian clock. *Planta* **209(2)**: 221-229.
- Ⓛ Lozano, R. M., J. H. Wong, B. C. Yee, A. Peters, K. Kobrehel y B. B. Buchanan. 1996. New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta* **200(1)**: 100-106.
- Ⓛ Luthman, M. y A. Holmgren. 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* **21(26)**: 6628-6633.
- Ⓛ McClure, B. A., F. Cruz-García, B. Beecher y W. Sulaman. 2000. Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. of Bot.* **85(Suppl. A)**: 113-123.
- Ⓛ McClure, B. A., J. E. Gray, M. A. Anderson y A. E. Clarke. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* **347**: 757-760.

- McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama y A. E. Clarke. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342(6252)**: 955-957.
- Meyer, M., R. Schreck y P. A. Baeuerle. 1993. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12(5)**: 2005-2015.
- Meyer, Y., L. Verdoucq y F. Vignols. 1999. Plant thioredoxins and glutaredoxins identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* **4(10)**: 388-394.
- Moore, B. E. y H. R. J. Bose. 1988. Expression of the *v-rel* oncogene in reticuloendotheliosis virus-transformed fibroblasts. *Virology* **162(2)**: 377-387.
- Mustacich, D. y G. Powis. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* **346(Pt 1)**: 1-8.
- Nakamura, H., H. Masutani, Y. Tagaya, A. Yamauchi, T. Inamoto, Y. Nanbu, S. Fujii, K. Ozawa y J. Yodoi. 1992. Expression and growth-promoting effect of adult T-cell leukemia-derived factor. A human thioredoxin homologue in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **69(8)**: 2091-2097.
- Nakamura, H., K. Nakamura y J. Yodoi. 1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 351-369.
- Powis, G. y W. R. Montfort. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 261-295.
- Reith, M. y J. Munholland. 1997. Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Report.* **13**: 333-335.
- Reynolds, A. E., J. M. Chesnick, J. Woolford y R. A. Cattolico. 1994. Chloroplast encoded thioredoxin genes in the red algae *Porphyra yezoensis* and *Griffithsia pacifica*: evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* **25(1)**: 13-21.
- Rubartelli, A., A. Bajetto, G. Allavena, E. Wollman y R. Sitia. 1992. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **267(34)**: 24161-24164.
- Rubartelli, A. y R. Sitia. 1991. Interleukin 1 $\beta$  and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. *Biochem. Soc. Trans.* **19(2)**: 255-259.
- Schenk, H., M. Klein, W. Erdbrügger, W. Dröge y K. Schulze-Osthoff. 1994. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(5)**: 1672-1676.
- Schürmann, P. y J. -P. Jacquot. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 371-400.
- Schürmann, P., R. A. Wolosiuk, V. D. Breazeale y B. B. Buchanan. Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in chloroplasts. 1976. *Nature* **263(5574)**: 257-258.
- Sjöberg, B. -M. y A. Holmgren. 1972. Studies on the structure of T4 thioredoxin. II. Amino acid sequence of the protein and comparison with thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **247(24)**: 8063-8068.
- Söderberg, B. -O., B. -M. Sjöberg, U. Sonnerstam y C. -I. Brändén. 1978. Three-dimensional structure of thioredoxin induced by bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75(12)**: 5827-5830.
- Spector, A., G. -Z. Yan, R. -R. C. Huang, M. J. McDermott, P. R. C. Gascoyne y V. Pigiet. 1988. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **263(10)**: 4984-4990.



- Takasaki, T., K. Hatakeyama, G. Suzuki, M. Watanabe, A. Isogal y K. Hinata. 2000. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. *Nature* **403(6772)**: 913-916.
- Verdoucq, L., J. -P. Jacquot, F. Vignols, Y. Chartier y Y. Meyer. 1999. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274(28)**: 19714-19722.
- Voet, D., J. G. Voet y C. W. Pratt. 1999. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., E. U. A.
- Wakasugi, N., Y. Tagaya, A. Wakasugi, M. Mitsui, M. Maeda, J. Yodoi y T. Tursz. 1990. Adult T-cell leukemia-derived factor/Thioredoxin produced by both human T-lymphotropic virus type I and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergized with interleukin-1 and interleukin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(21)**: 8282-8286.
- Williams, C. H. Jr., L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Lennon, M. L. Ludwig, P. -F. Wang, D. M. Veine, K. Becker y R. H. Schirmer. 2000. Thioredoxin reductase. Two models of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267(20)**: 6110-6117.
- Wollman, E. E., L. d'Auriol, L. Rimsky, A. Shaw, J. -P. Jacquot, P. Wingfield, P. Graber, F. Dessarps, P. Robin, F. Galibert, J. Bertoglio y D. Fradelizi. 1988. Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **263(30)**: 15506-15512.
- Wolosiuk, R. A., B. B. Buchanan. Thioredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. 1977. *Nature* **266(5602)**: 565-567.
- Xanthoudakis, S., G. G. Miao y T. Curran. 1994. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91(1)**: 23-27.
- Yano, H., J. H. Wong, Y. M. Lee, M.-J. Cho y B. B. Buchanan. 2001. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98(8)**: 4794-4799.

## APÉNDICE

### Acrilamida al 4% (fase concentradora)

- Acrilamida: 5.85 g
- Bis-acrilamida: 0.15 g
- EDTA 0.5 M: 600 µl
- Tris-Cl 0.5 M pH 6.8: 37.8 ml
- Aforar a 150 ml
- Guardar a 4°C

### Acrilamida (fase separadora)

	10 %	12.5 %
Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0.8 %	5 ml	6.25 ml
4X Tris-Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml
H <sub>2</sub> O desionizada	5 ml	3.75 ml

### Amortiguador del ánodo 5X (para SDS-PAGE)

- Tris-Cl pH 8.9: 1M

### Amortiguador del cátodo 5X (para SDS-PAGE)

- Tris: 0.5 M
- Tricina : 0.5 M
- Disolver con H<sub>2</sub>O desionizada
- Ajustar a pH 8.25
- Agregar SDS a una concentración final de 0.5%

### Amortiguador de elusión

- Tris-Cl pH 8: 50 mM
- Glutación reducido (GIBCO BRL): 15 mM
- Guardar en alícuotas de 1 ml a -20°C hasta su uso. No utilizar la solución después de haber sido descongelada cinco veces.

### Amortiguador de extracción de proteínas

- NaCl: 50 mM
- Acetato de sodio pH 5.0: 50 mM
- β-mercaptoetanol: 1%
- Por cada 10 ml de solución, agregar una tableta (0.05 g) de inhibidores de proteasas (Roche).

### Amortiguador de transferencia (para Western-blot)

- Tris: 3 g
- Glicina: 14.4 g
- SDS: 1 g
- Metanol: 200 ml
- Aforar a un litro con H<sub>2</sub>O desionizada.

### Células competentes

- Inocular una colonia de *E. coli* en 50 ml de LB contenidos en un matraz de 250 ml. Incubar con agitación constante (250 rpm) a 37°C toda la noche.
- Inocular 4 ml de cultivo en 400 ml en un matraz de 2 l.

- c) Dejar crecer a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una  $A_{590}$  de 0.375
- d) Vaciar el cultivo en 4 tubos de polipropileno de 250 ml estériles y dejarlos en hielo de 5 a 10 minutos.
- e) Centrifugar a 3,000 rpm, 7 minutos a 4°C.
- f) Resuspender gentilmente cada botón celular en 20 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  fría.
- g) Centrifugar a 3,000 rpm, 5 minutos a 4°C.
- h) Resuspender cada botón celular en 20 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  fría. Mantener resuspendidas las células en hielo por 30 minutos (el contenido de los tubos puede ser juntado en uno solo).
- i) Centrifugar a 3,000 rpm, 7 minutos a 4°C.
- j) Resuspender el botón celular con 5 ml de la solución de  $\text{CaCl}_2$  fría y dividir en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ .
- k) Sumergir los tubos en nitrógeno líquido y finalmente guardarlos a -80°C.

**GTE**

- a) Glucosa estéril: 50 mM
- b) Tris-Cl pH 8.0: 25 mM
- c) EDTA pH 8.0: 10 mM
- d) La glucosa se agrega al momento de utilizar la solución GTE

**Medio LB líquido**

- a) Triptona: 10 g
- b) Extracto de levadura: 5 g
- c) NaCl: 5 g
- d) Aforar a 1 L
- e) Esterilizar por autoclave

**Medio LB sólido**

- a) Antes de aforar, agregar 15 g de agar por cada litro de medio L.B.

**Medio 2xYTA**

- a) Triptona: 16 g
- b) Extracto de levadura: 10 g
- c) NaCl: 5 g
- d) Disolver con 900 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada
- e) Ajustar a pH 7.0 con NaOH
- f) Aforar a 1 L
- g) Esterilizar por autoclave
- h) Una vez frío, agregar ampicilina (de una solución *stock* 1 mg/ml) a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$

**PBS 10X**

- a) NaCl: 40.0314 g (1.37 M)
- b) KCl: 1.0065 g (27 mM)
- c)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 5.7635 g (43 mM)
- d)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0.9659 g (14 mM)
- e) Disolver con 300 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada
- f) Ajustar a pH 7.3 con NaOH
- g) Aforar a 500 ml
- h) Esterilizar por autoclave

**Solución de bloqueo**

- a) Leche descremada: 5% (w/v)
- b) Tween-20: 0.6%
- c) Los reactivos se disuelven con PBS 1X

**Solución de CaCl<sub>2</sub>**

- a) CaCl<sub>2</sub>: 60 mM.
- b) Glicerol: 15% (v/v)
- c) PIPES, pH 7.0: 10 mM
- d) Esterilizar por autoclave

**Solución teñidora y desteñidora**

- a) Metanol: 50%
- b) Acido acético: 10%
- c) Sólo a la solución teñidora se le agrega azul brillante de Coomassie G-250 a una concentración de 0.5 % (w/v).

**Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con azul brillante de Coomassie**

- a) Al finalizar la electroforesis, dejar el gel en solución teñidora de 30 a 50 minutos.
- b) Retirar la solución teñidora (se puede reutilizar posteriormente) y agregar solución desteñidora hasta que el fondo del gel sea lo suficientemente claro para que las bandas de las proteínas se distingan fácilmente.

**Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con nitrato de plata**

- a) Al finalizar la electroforesis, dejar el gel en metanol al 50% por 1.5 horas.
- b) Hacer tres lavados de 10 minutos cada uno con H<sub>2</sub>O desionizada.
- c) Dejar el gel en H<sub>2</sub>O desionizada toda la noche.
- d) Incubar por 1.5 horas en 100 ml de metanol al 50% con 100 µl de formaldehído al 37%.
- e) Quitar la solución y lavar rápidamente tres veces con H<sub>2</sub>O desionizada. Al cuarto lavado dejar el gel en H<sub>2</sub>O y preparar las soluciones A, B y C.
  - Solución A
    1. Nitrato de plata: 0.8 g
    2. H<sub>2</sub>O: 2 ml
  - Solución B
    1. NaOH 0.36%: 21 ml
    2. Hidróxido de amonio: 1.4 ml
  - Solución C
    1. Agregar por goteo la solución A a la B
    2. Si la solución queda turbia, agregar hidróxido de amonio hasta que quede totalmente transparente
    3. Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada.
- f) Desechar el agua, agregar la solución C e incubar con agitación por 15 minutos.
- g) Hacer tres lavados de 5 minutos cada uno con abundante agua desionizada.
- h) En lo que se realiza el último lavado, se prepara la solución D.
  - Solución D
    1. Citrato de sodio al 1%: 2.5 ml
    2. Formaldehído al 37%: 0.25 ml
    3. Aforar a 500 ml con agua desionizada.

- i) Desechar el agua y agregar la solución D. Mantener con agitación hasta que las bandas tengan una intensidad adecuada.
- j) Tirar la solución D y agregar solución desafiadora para detener el revelado.

**4X Tris-Cl/SDS pH 8.8**

- a) Tris: 91 g (1.5 M)
- b) Disolver en 300 ml de H<sub>2</sub>O desionizada
- c) Ajustar a pH 8.8 con HCl
- d) Aforar a 500 ml con H<sub>2</sub>O desionizada
- e) Filtrar (0.45 µm)
- f) Agregar 2 g SDS (0.4% w/v)
- g) Guardar a 4°C