



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Purificación de peroxirredoxinas a partir de órganos de animales

Alumno: Álvaro Ávila Pérez

Junio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Purificación de peroxirredoxinas a partir de órganos de animales

Alumno: Álvaro Ávila Pérez

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del alumno Álvaro Ávila Pérez. La firma es fluida y se extiende horizontalmente.

Junio, 2019

ÍNDICE

ÍNDICE	3
1. RESUMEN / ABSTRACT.....	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Especies reactivas de oxígeno	5
2.2. Peroxidasas	6
2.3. Peroxirredoxinas. Generalidades y tipos.....	7
2.4. Peroxirredoxinas tipo Prx6.....	9
2.5. Purificación de peroxirredoxinas.....	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Purificar Prdx6 de ratón.....	12
3.2. Analizar actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Reactivos.....	13
4.2. Homogeneización.....	13
4.3. Cromatografías	14
4.4. Diálisis, desalación y concentración de muestras. Determinación de la concentración de proteína	15
4.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	15
4.6. Detección inmunológica de Prdx6.....	16
4.7. Actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
5.1. Purificación de Prdx6.....	18
5.2. Actividad tiorredoxina peroxidasa.....	32
6. CONCLUSIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	34

1. RESUMEN / ABSTRACT

Este trabajo trata sobre la purificación de la Prdx6 de ratón que se ha hecho mediante técnicas cromatográficas convencionales con el fin de tratar de analizar sus características catalíticas. Este tipo de peroxirredoxina pertenece al tipo 1-Cys de la cual no se ha llegado a un absoluto consenso sobre el mecanismo catalítico. No obstante, se trata de probar si la peroxirredoxina purificada de ratón se ajusta al mecanismo catalítico de la peroxirredoxina de 1-Cys de levadura [8].

This work deals with the purification of Prdx6 from a mouse that has been done by chromatographic techniques in order to try to analyze its catalytic characteristics. This type of peroxiredoxin belongs to the type 1-Cys from which it has not reached an absolute domain of the catalytic mechanism. However, it is tried to test the peroxiredoxin purified from the mouse conforms to the catalytic mechanism of 1-Cys peroxiredoxin [8].

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Especies reactivas de oxígeno

Como especies reactivas, tenemos generalmente iones de oxígeno, peróxidos y radicales libres. Suelen ser pequeñas moléculas y altamente reactivas debido a la capa de valencia. Son producidas debido al metabolismo de oxígeno, y dependiendo de su estrés puede ser dañino para las células, lo que conlleva un estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se produce debido a un desequilibrio entre las especies reactivas y el sistema del organismo. Es un aumento en la reducción de la potencia celular, o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox como por ejemplo el glutatión [9]. Este desequilibrio puede provocar efectos tóxicos en nuestras proteínas e incluso ADN, debido a los peróxidos y radicales libres. Un estrés oxidativo fuerte provoca la muerte celular, incluso la necrosis. El daño hace que haya un agotamiento de ATP que detiene la muerte celular por apoptosis controlada, lo que hace que la célula muera esparciendo por el medio compuestos muy tóxicos [5].

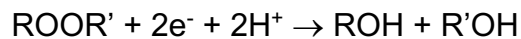
Hay varios tipos de especies reactivas:

- $O_2^{\cdot-}$: Se puede formar por una reacción de autooxidación. Es poco reactivo pero puede liberar cationes de hierro (Fe^{2+}) de ciertas proteínas.
- H_2O_2 : Se puede formar por dismutación o por reducción directa. Se puede difundir por membranas.
- $\cdot OH$: Se forma en la reacción de Fenton y por la descomposición de $OONO^{\cdot-}$. Es muy reactivo y puede dañar a todo tipo de componentes celulares.
- $OONO^{\cdot-}$: Se forma entre una reacción de $\cdot O_2^{\cdot-}$ y $NO^{\cdot}$. Puede someterse a homólisis y formar radicales hidroxilo y NO_2 .
- $ROOH$: Se forma por reacciones entre lípidos y nucleobases.
- $RO^{\cdot}$ y $ROO^{\cdot}$: Se produce o por adición de radicales o por eliminación de hidrógeno.
- $HOCl$: Es muy reactivo y oxida fácilmente todo lo que tenga relación con proteínas.

Como fuente principal de oxígeno reactivo tenemos a la pérdida de oxígeno activado que hay en las mitocondrias durante la respiración oxidativa. El H_2O_2 se puede producir por una gran parte de enzimas entre las que se incluyen las oxidasas y monooxidasas. Éstas especies tienen una gran importancia en la señalización celular y para que todo tenga un comportamiento adecuado debe de haber un equilibrio entre el consumo y la producción de oxígeno reactivo [1][9].

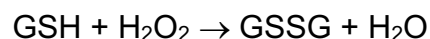
2.2. Peroxidasas

Son un tipo de enzimas que actúan como catalizadores en reacciones redox, en el que el oxidante es el grupo peróxido y un sustrato reductor que es oxidado por el peróxido.



Algunas peroxidasas de plantas tienen aplicaciones inmunoquímicas debido a su estabilidad y a su fácil conjugación con inmunoglobulinas.

En animales las peroxidasas suelen tener una acción defensiva en saliva o leucocitos. No todas las peroxidasas son defensivas, también las hay que sintetizan hormonas como por ejemplo la yoduro peroxidasa que se encarga de sintetizar las hormonas tiroideas. Otro ejemplo es la glutatión peroxidasa la cual tiene una función antioxidante. La glutatión peroxidasa cataliza una reacción de glutatión (GSH) a un disulfuro (GSSG) utilizando H_2O_2 .



Su función principal es proteger de la degradación que se produce por los hidroperóxidos.

La mayoría de los tipos de peroxidasas son hemoproteínas. La figura 1 muestra los diferentes tipos de enzimas peroxidasas caracterizados.

Funcionalmente se pueden distinguir dentro de este grupo las peroxirredoxinas que tienen 2-Cys y 1-Cys. En la de 2-Cys, tenemos la cisteína peroxidática y la cisteína resolvente y eso se reduce con las tioredoxinas.

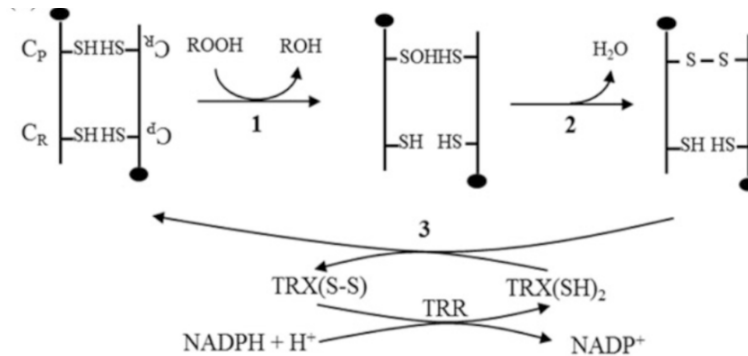


Fig.3. Ciclo catalítico para peroxirredoxinas 2-Cys típicas [7]

Las de 1-Cys solo tienen la cisteína peroxidática, por lo tanto para este tipo de peroxirredoxinas, el mecanismo catalítico tiene controversia. El consenso general dice que el glutatión es el que aporta la cisteína resolvente, pero el mecanismo regenerador general ya es debatido.

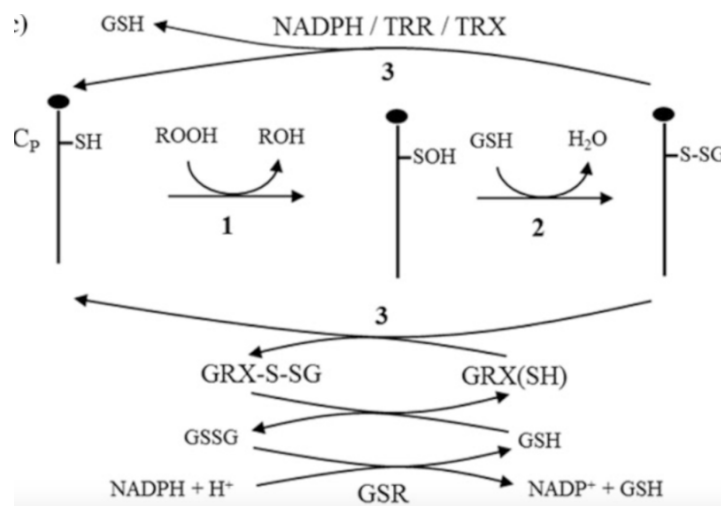


Fig.4. Ciclo catalítico para peroxirredoxinas 1-Cys [7]

Otra clasificación para las peroxirredoxinas se basa en secuencias conservadas y perfiles de estructura alrededor del centro activo. Se divide en 6 tipos: AhpC/Prx1, Prx5, Prx6, Bcp, AhpE y Tpx. De todas estas, solo se encuentran en mamíferos la Prdx1, Prdx5 y Prdx6 [7].

2.4. Peroxirredoxinas tipo Prx6

La estructura de las peroxirredoxinas tipo Prx6 es similar a las tipo Prx1, con dímero tipo B como estructura y con extensión C-terminal larga. Lo que diferencia a las Prx6 de las Prx1, es que ésta no tiene cisteína resolvente. La mayoría de Prx6 no tienen residuos de cisteína cerca de la cisteína peroxidática para que se produzca el enlace disulfuro, el cual se podría constituir sustrato para tioredoxina. Incluso algunas Prx6 no tienen más que la cisteína peroxidática.

La peroxirredoxina tipo Prx6 en humanos (Prdx6) no muestra actividad peroxidasa dependiente de tioredoxina in vitro. Estudios, proponen que la Prdx6 actúa como glutatión peroxidasa mediada por π GST (glutatión transferasa) donde la Prdx6 formaría un heterodímero el cual se disocia y otra molécula GSH actúa en el disulfuro mixto regenerando la peroxiredoxina reducida y produciendo GSSG. La Prdx6 de mamíferos tiene doble función, actividad peroxidasa y actividad fosfolipasa. La actividad fosfolipasa se lleva a cabo en un centro activo diferente y es óptima a pH ácido debido a su localización lisosomal [2,3].

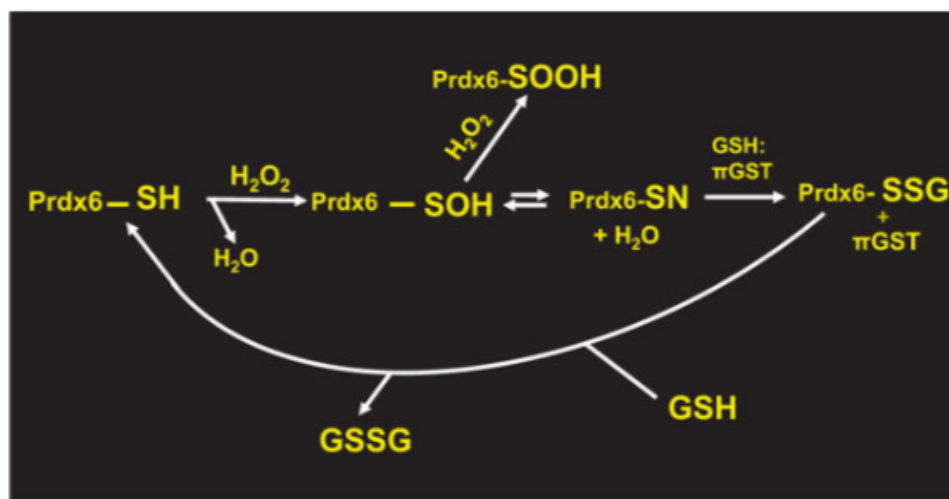


Fig.5. Mecanismo para la actividad peroxidasa de Prdx6 propuesto, con formación de una sulfenilamida como intermediario [3]

La Prx6 de levadura (Prx1p) muestra actividad peroxidasa dependiente de tioredoxina in vitro. Esta actividad tioredoxina puede ser explicada debido a que la cisteína peroxidática oxidada ($\text{C}_\text{P}\text{-SOH}$) de una subunidad puede reaccionar con la

reducida (C_P-SH) de otra subunidad, formando un puente disulfuro entre las dos cisteínas peroxidáticas. Además, el C_P-SOH oxidado de la Prdx6 de levadura puede reaccionar directamente con el glutatión reducido, formando un intermedio glutationilado en el centro activo que se resuelve con la tiorredoxina de la levadura (Trx3p) y se recupera el GSH, como se muestra en la figura 6 [8]. La caracterización de la Prx6 de levadura ha revelado una acción antioxidante nueva de la reducción de glutatión, el cual actúa como colaborador en el mecanismo catalítico de una peroxidasa de tiorredoxina [8][3].

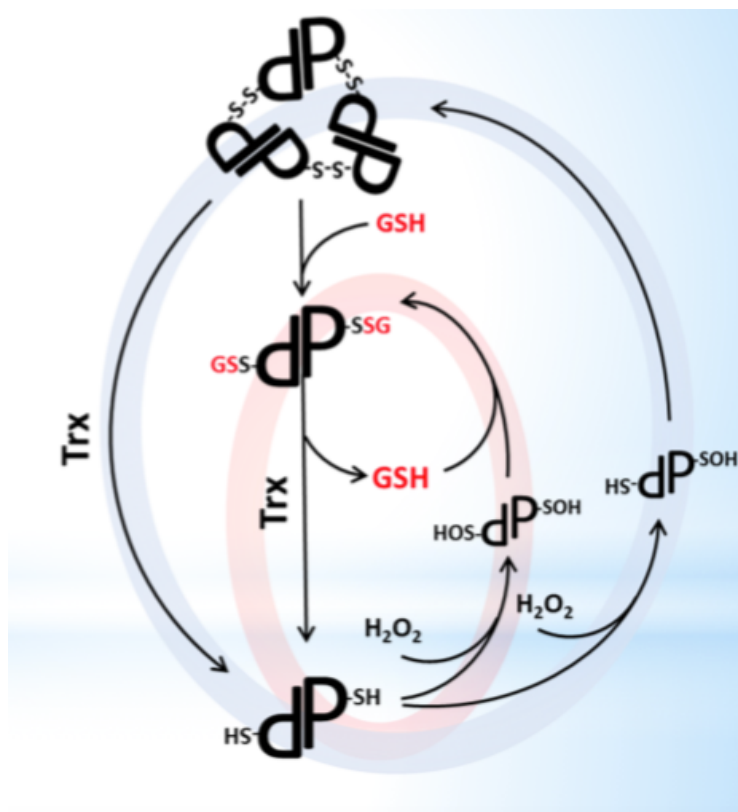


Fig.6. Mecanismo propuesto para 1-Cys de levadura [8]

2.5. Purificación de peroxirredoxinas

Se hace esta purificación mediante técnicas recombinantes. Mediante la tecnología de ADN Recombinante se sintetiza en un plásmido un gen sintético con la secuencia que codifica la proteína de interés. Ésta metida en una bacteria, la bacteria la produce y a partir de la misma se purifica. Sin embargo, en muchas ocasiones este proceso no es efectivo porque la bacteria no puede sintetizar por

varias razones (toxicidad, mal plegamiento de la proteína, etc) la proteína con sus propiedades catalíticas. Es por tanto que se debe de abordar la purificación a partir de material biológico nativo si queremos estudiar este tipo de proteínas. En otros estudios se ha realizado empleando cromatografías de afinidad, cromatografías de intercambio iónico, etc [6]. En nuestro estudio, vamos a tratar de purificar mediante técnicas cromatográficas convencionales y a partir de tejido de ratón la Prdx6 (Figura 7).

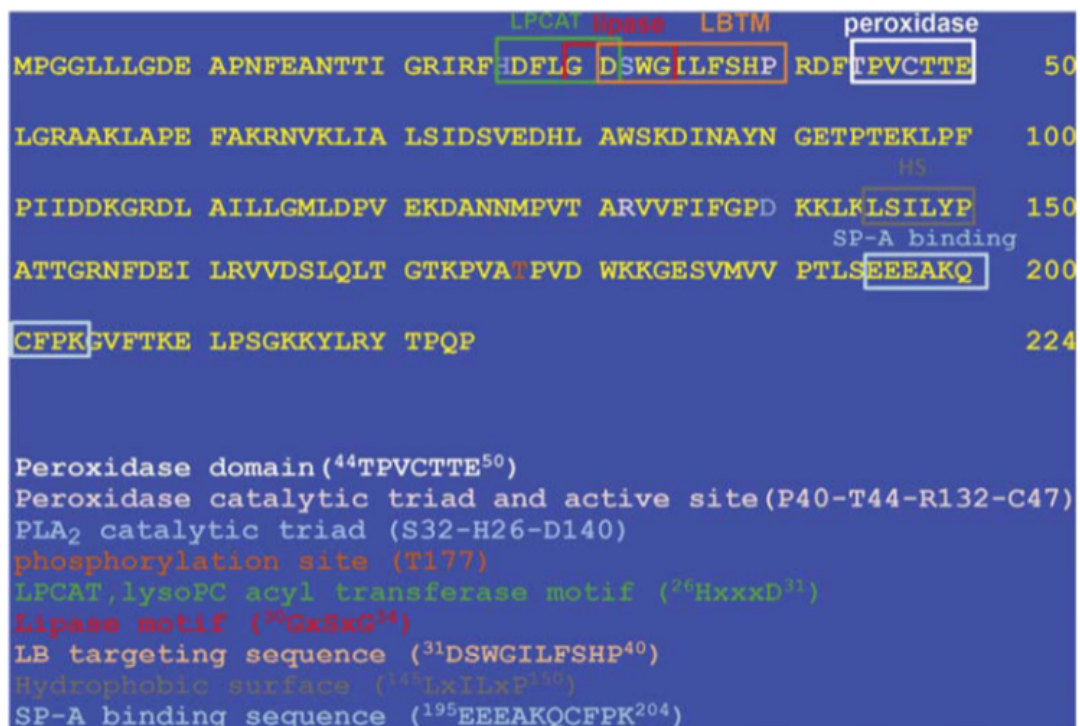


Fig.7. Secuencia Prdx6 de ratón [3]

3. OBJETIVOS

3.1. Purificar Prdx6 de ratón

Se quiere purificar la Prdx6 de ratón mediante técnicas cromatográficas convencionales ya que la Prdx6 no se ha conseguido purificar satisfactoriamente mediante técnicas recombinantes. Por lo tanto vamos a tratar de conseguir la Prdx6 de pulmón de ratón para poder hacer una caracterización de su actividad enzimática.

3.2. Analizar actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina

Este trabajo quiere demostrar que la actividad peroxidasa de la Prdx6, reflejada debido al consumo de NADPH, es dependiente de la tiorredoxina ya que a día de hoy está entredicho el mecanismo catalítico de esta peroxirredoxina.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Reactivos

Tris-HCl Buffer	Sigma
NaCl (99%)	Sigma
EDTA (Anhidro, 99%)	Sigma
(NH ₄) ₂ SO ₄ (99%)	Sigma
DTT	Bio-Rad
PMSF (98%)	Sigma
MES (99%)	Sigma
PBS Tween 20 (10%)	Bio-Rad
Persulfato amónico (98%)	Bio-Rad
TEMED	Bio-Rad

4.2. Homogeneización

Se pesó una cantidad de tejido (2 g) y se trituró en mortero con nitrógeno líquido. A esto se le añadió 20 mL de una disolución tampón que contenía TrisHCl 50 mM, pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y 1 mM PMSF. Después se homogeneizó con un disruptor Polytron y posteriormente se completó la rotura mediante sonicación a la máxima potencia permisible (Sonicador BANDELIN SONOPULS). Tras este paso, se centrifugó a una potencia de 15000xg durante 1 h y el extracto libre de células o sobrenadante constituyó el material de partida u homogenado con el que comenzamos la purificación.

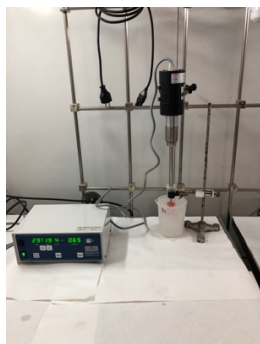


Fig.8. Homogeneización mediante sonicador

4.3. Cromatografías

Se realizaron las siguientes cromatografías:

→ Cromatografía de exclusión molecular

Se lleva a cabo en un FPLC (Bio-Rad) con una columna SephadexG75 (GE Healthcare) equilibrada con tampón que contiene TrisHCl 20 mM, pH 8, 0,1 M NaCl a un flujo de 0,25 mL/min

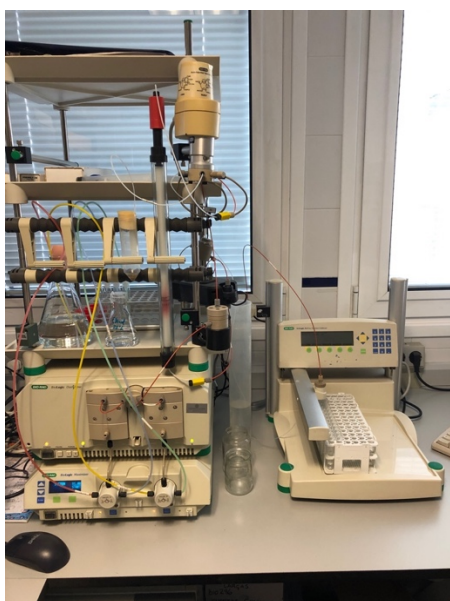


Fig.9. Columna Sephadex G-75 acoplada a FPLC

→ Cromatografías de intercambio iónico:

DEAE-Sefarosa cargada positivamente (Pharmacia, 1 x 10 cm), la cual se equilibró con un tampón TrisHCl 50 mM, pH 8, 1 mM EDTA. Posteriormente las proteínas se eluyeron con un tampón con 100 mM NaCl y después con 500 mM NaCl. El flujo empleado fue de 1 mL/min

CM-Sefarosa cargada negativamente (Pharmacia, 1 x 10 cm) que se equilibró con tampón MES 10 mM, pH 6,2, 1 mM EDTA. Tras esto, la muestra se eluyó primero con un tampón con 100 mM NaCl y después con otro tampón con 500 mM NaCl, como hicimos en la resina DEAE-Sefarosa. El flujo fue de 1 mL/min

→ Cromatografía hidrofóbica

Fenil-Sefarosa (Pharmacia, 1 x 5 cm) equilibrada con TrisHCl 20 mM, pH 8, 0,1 M NaCl y 1 M sulfato amónico, a un flujo de 1 mL/min. Después de realizar este paso, se pasó un tampón sin sulfato amónico.

4.4. Diálisis, desalación y concentración de muestras. Determinación de la concentración de proteína

Se realizaron diálisis en membranas Spectrapor 1 (MWCO 8000 Da) frente a tampón TrisHCl 20 mM, pH 8, 0,1 M NaCl y

→ frente a tampón MES 10 mM, pH 6,2, 1 mM EDTA. Tras ésta, apareció cierta turbidez en la muestra por lo que se decidió clarificarla mediante centrifugación

Para eliminar la alta concentración de sulfato amónico que pudieran tener algunas muestras, que interfiere con los análisis electroforéticos y de determinación de la concentración de proteínas, se utilizaron dispositivos Desalting Protein Columns, (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante.

Para reducir el volumen de una muestra, se utilizaron dispositivos concentradores Spin-X UF (Corning) sometidos a centrifugación de 2500xg.

La concentración de proteína de las muestras se realizó por el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Dye Reagen (BioRad) y utilizando BSA para establecer los patrones de concentración.

4.5. Electroforesis SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida han sido compuestos de la siguiente manera:

→ Gel separador con 12% acrilamida, 0,37 M Tris-HCl y 0,1% SDS , pH 8,8.

→ Gel concentrador con 5% acrilamida, 0,15 M Tris-HCl y 0,1% SDS , pH 6,8

Las proteínas de las muestras se sometieron a un proceso de desnaturalización, añadiendo a las muestras 2% p/v de SDS y 100 mM DTT y calentando a 100° C. La electroforesis se desarrolló un voltaje constante de 200 V.

4.6. Detección inmunológica de Prdx6

Para detectar la proteína Prdx6 sobre las membranas de nitrocelulosa se utilizaron dos métodos, dot-blot y wester-blot.

Dot-blot consiste en añadir unas gotas de 5 μ L sobre una superficie de nitrocelulosa, en la que una vez secada, se llevó a cabo la exposición a los anticuerpos. Primero, se sumerge la membrana durante 1 hora a una disolución de bloqueo, en tampón PBST (fosfato 10 mM, pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM KCl y 0,1 % v/v Tween-20) con 5% p/v leche en polvo, seguido de la exposición durante 1 h a disolución de anticuerpo IgPrx1p 1:5000 (inmunoglobulinas o anticuerpos anti Prx1p, purificada de sangre de conejos inmunizado con la proteína Prx1p) [10], en PBST 1% leche. Posteriormente, se realiza un lavado en PBST 1% leche (5 min x 3) y seguidamente se sumerge en otra disolución con anticuerpo secundario Ig-HRPX (BioRad) diluido 1:10000 en PBST 1% leche, 1h. Finalmente se realizan 3 lavados más.

Después sumerge la membrana en el reactivo ECL prime WB detection reagen Amersham (GE, Healthcare) y se realiza un revelado fotográfico.

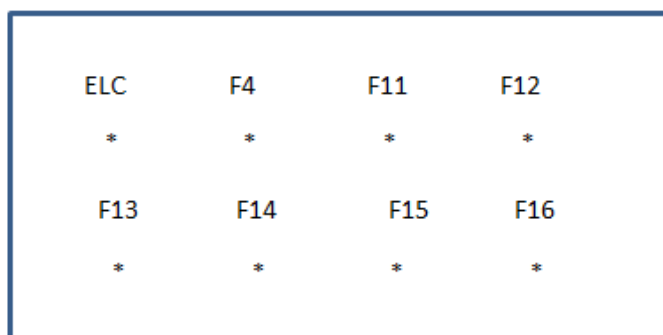


Fig.10. Ejemplo de dot-blot con gotas de 5 μ L; ELC (Extracto libre de células); F4 (Fracción 4); F11 (Fracción 11); F12 (Fracción 12); F13 (Fracción 13); F14 (Fracción 14); F15 (Fracción 15); F16 (Fracción 16)

Para realizar los western blot, previamente se realizó una electroforesis en SDS-PAGE seguido de una transferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) mediante un sistema Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) a un amperaje constante de 60 mA. Seguidamente se tiñeron las membranas con una disolución de colorante rojo Ponceau, para detectar las bandas de proteína,

comprobar la eficacia de la transferencia y marcar la posición de las proteínas marcadoras de peso molecular.

La detección mediante western-blot se hizo mediante el sistema Snap id. (Millipore)



Fig.11. Sistema Snap id. (Millipore)

que emplea una bomba se hace vacío para hacer pasar las disoluciones a través de la membrana. Es un sistema rápido para hacer los western-blot oportunos. Este proceso consta de un bloqueo (10 mL de PBST con 0,5% p/v de leche), luego se hace pasar 5 L de una disolución con el anticuerpo primario IgPrx1P 1:1000, en PBST, seguidamente se realizan 3 lavados de 10 mL cada uno en PBST, después se pasan 5 mL de una disolución con un anticuerpo secundario Ig-HRPX 1:5000 en PBST y por último se realizan 3 lavados en PBST de 10 mL cada uno. Finalmente se realiza un revelado fotografico previa exposición de la membrana al reactivo ECL prime WB detection reagen Amersham (GE, Healthcare)

4.7. Actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina

La actividad peroxidasa de la peroxirredoxina dependiente de tiorredoxina se determinó con un espectrofotómetro Ultrospec 4000 (Pharmacia) analizando el consumo de NADPH a 340 nm de un medio de reacción que contiene: 250 μ M NADPH, 0,5 mM GSH, 0,5 μ M Trx3p, 0,227 mg/mL proteína purificada (muestra fenil), 100 μ M t-BuOOH, en TrisHCl 20 mM, pH 8, 0,1 M NaCl.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Purificación de Prdx6

Primero comprobamos si podíamos detectar la Prdx6 en tejido de ratón debido a que esta enzima no tiene una actividad específica y exclusiva que la permita detectar. Está en tela de discusión que la Prdx6 tenga la actividad peroxidasa con la tiorredoxina. Por lo tanto la manera de detectarla o perseguirla a través de la purificación es mediante la detección inmunológica. Primero valoramos si el anticuerpo IgPrx1p, que reconoce a la peroxirredoxina Prx1p de levadura, es también capaz de unirse a la proteína Prdx6 de mamíferos, ya que ambas son muy homólogas

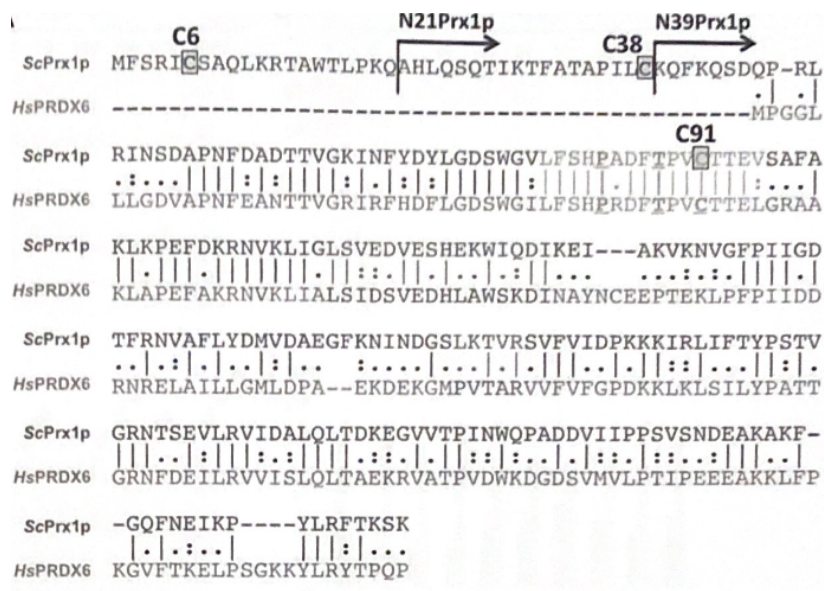


Fig.12. Comparación de la secuencia de levadura (Prdx1p) y Prdx6 en humanos [10]

En la figura 12, ambas secuencias son muy parecidas, por lo que por eso se usó el anticuerpo de Prdx1p para intentar detectar la Prdx6 en extractos libre de células de ratón. La utilización del anticuerpo usado en el western-blot reveló la presencia de una sola banda correspondiente a una proteína de peso molecular correspondiente a Prdx6 (Figura 13).

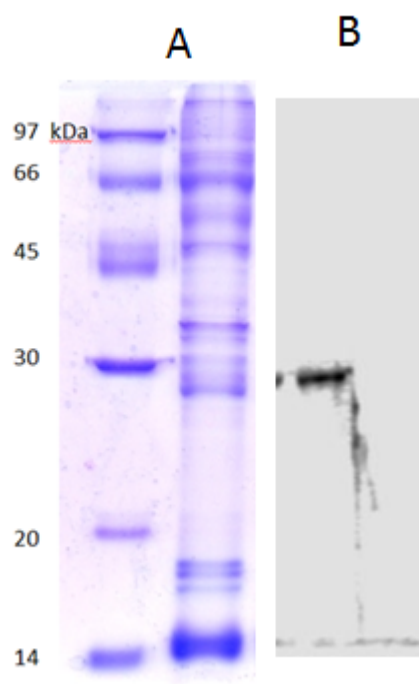


Fig.13. A) SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie de ELC de pulmón de ratón, junto a proteínas marcadoras de peso molecular (Amersham Low Molecular Calibration Kit for SDS-PAGE, GE Healthcare). B) Western-blot de la muestra ELC con IgPrx1p

Basándonos en estos resultados, abordamos un procedimiento de purificación, utilizando el método dot-blot para realizar la detección de Prdx6, que es en teoría un procedimiento mas rápido, ya que el western-blot implica realizar una electroforesis, una transferencia, etc.

En primer lugar, se realizó un homogenado de pulmón de ratón como se describe en Materiales y Métodos. El extracto libre de células se sometió a cromatografía hidrofóbica en fenil-sefariosa y se recolectaron fracciones a las que se determinó el contenido en proteína según su absorbancia a 280nm. El cromatograma se muestra en la figura 14.

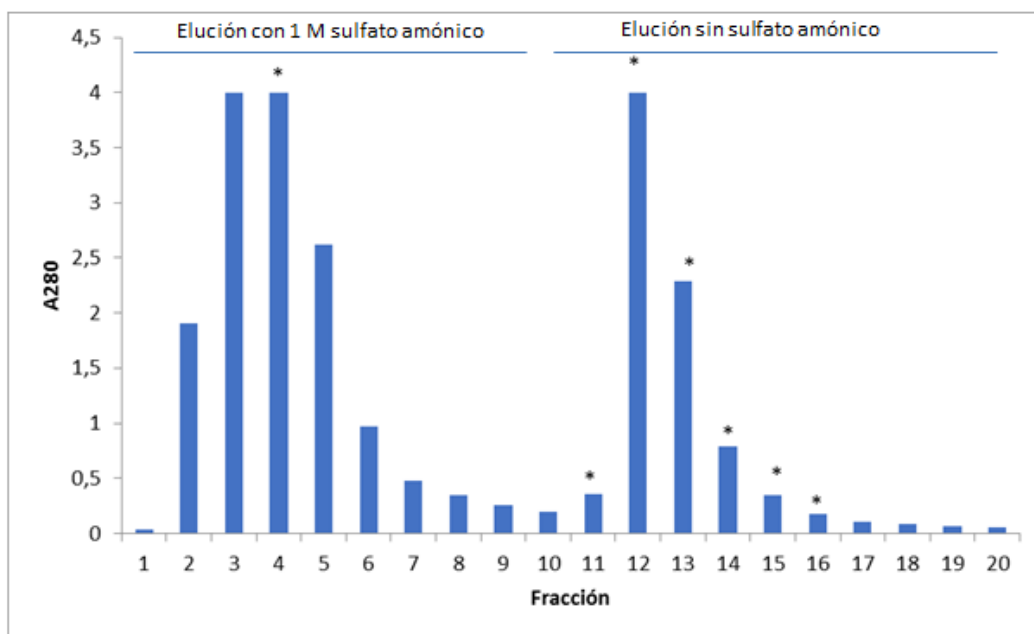


Fig.14. Cromatograma de la columna de fenil-sefaroza. Con asterisco están las fracciones (5 mL) seleccionadas para la detectar la Prdx6 por dot blot.

Seguidamente, se seleccionaron varias fracciones para detectar a Prdx6 por dot-blot.

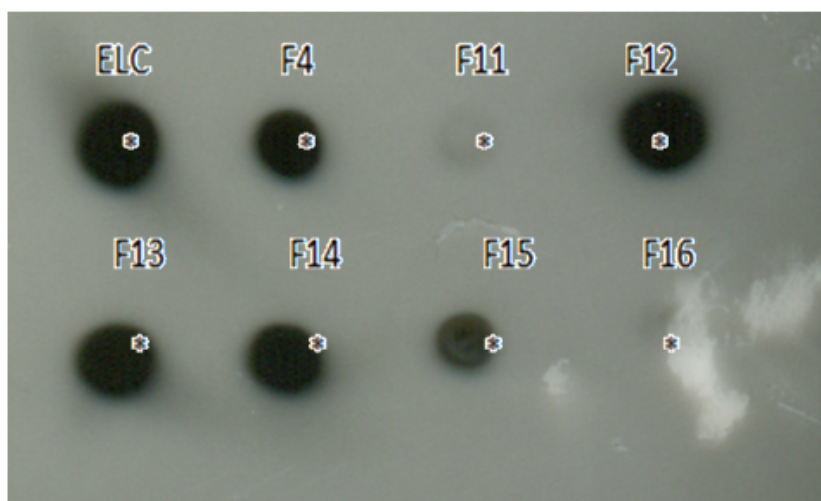


Fig.15. Revelado fotográfico del dot-blot sobre las muestras seleccionadas de la cromatografía hidrofóbica.

Debido a que daba resultado, seguimos con nuestra purificación, dializando las muestras representativas que son las fracciones 12,13 y 14 (muestra Fenil, 15 mL) y volviendo a hacer una cromatografía pero esta vez en columna de Carboximetil-

sefarosa con un gradiente de concentración después de que pasara la muestra, el cual se termino regenerando con un tampón 1 M de NaCl.

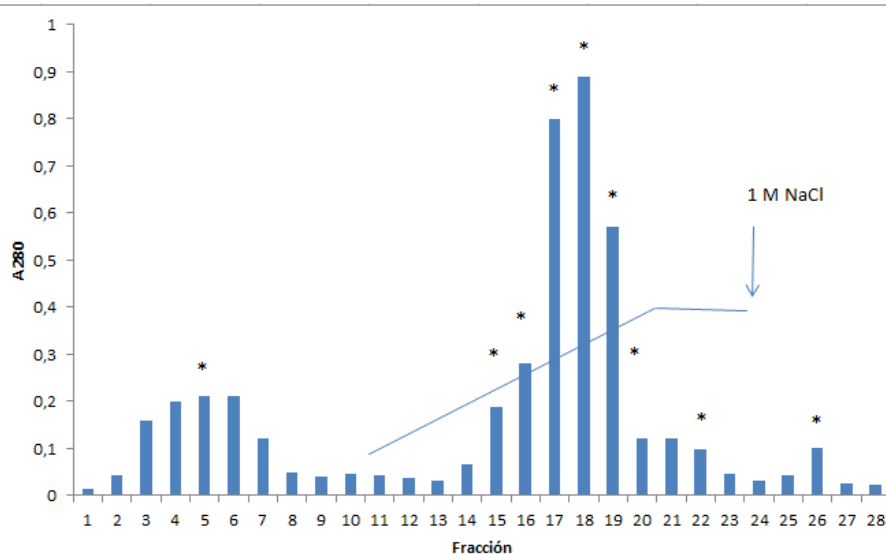


Fig.16. Cromatograma de la columna de Carboximetil-sefarosa. En asterisco las fracciones mas llamativas y fue realizada con un gradiente de concentración NaCl (10-200 mM) con una regeneración con tampón 1 M NaCl.

Sobre estas fracciones marcadas se volvió a hacer un dot-blot con su correspondiente revelado fotográfico para ver si realmente nos daban señal estas fracciones.

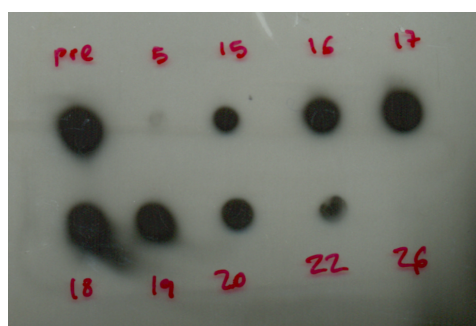


Fig.17. Revelado fotográfico del respectivo dot-blot de las fracciones de la columna de la figura 16

Hay 5 muestras que son las mas llamativas (F16-F20) que ocupan un total de 25 mL de muestra (Muestra CM, 25 mL), por lo tanto se trató de concentrar la muestra a 0,5 mL por centrifugación en dispositivos Spin-X UF concentrator (Corning) y se pasa la muestra a través del FPLC para realizar una cromatografía de exclusión molecular que es mas precisa que las anteriores. Se concentró para poder adaptar la muestra a

una cromatografía de exclusión molecular, que tiene como requisito una cantidad de volumen limitada.

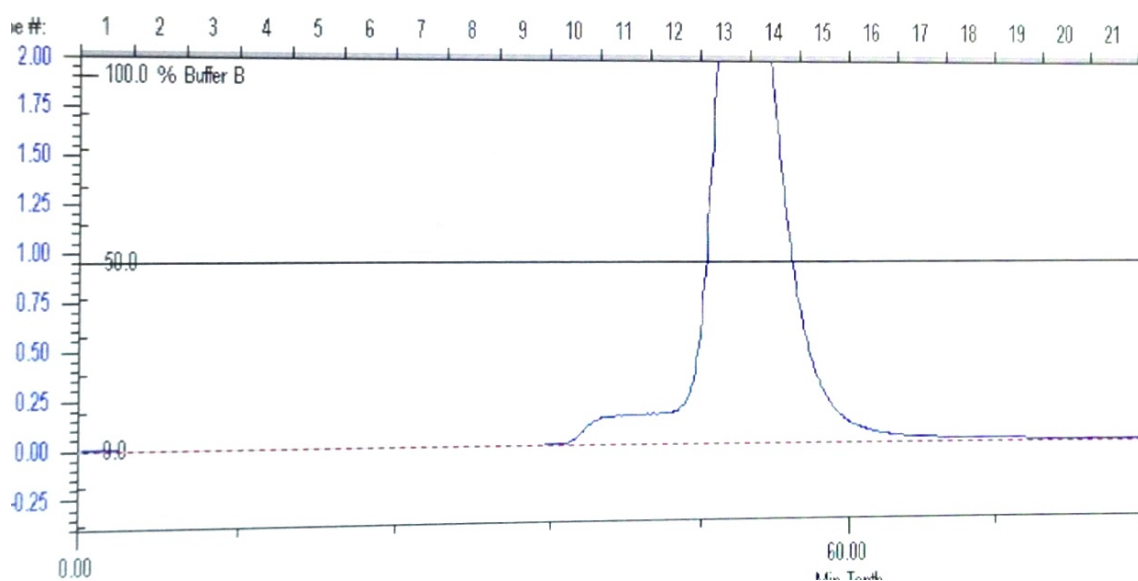


Fig.18. Cromatograma de la muestra concentrada en columna Sephadex G-75 acoplada a FPLC

En el área de nuestro pico, se empieza a dar señal entre las fracciones 10-12 y termina en torno a las fracciones 17-18, por lo tanto cogemos fracciones próximas tanto al inicio como al final del área y realizamos otro dot-blot

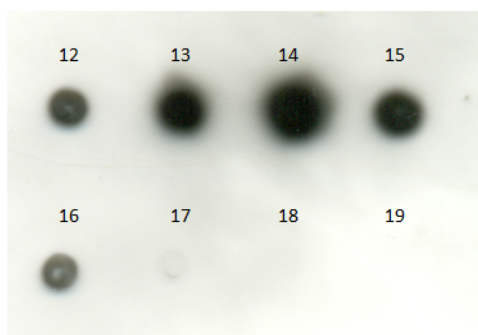


Fig.19. Dot-blot con sus respectivas fracciones de la muestra pasada por el FPLC

Se recolectan las fracciones 13,14 y 15 que son las mas señaladas y forman nuestra muestra Superdex (2 mL). Por lo tanto, con todas estas muestras que hemos obtenido en la purificación, mediante Bradford se determinó la concentración de proteína la cual fue:

ELC: 5,68 mg/mL (56,8 mg total) 100% de proteína

Fenil: 1,69 mg/mL (25,35 mg total) 45% de proteína

CM: 0,4 mg/mL (10 mg total) 18% de proteína

Superdex: 1,85 mg/mL (3,7 mg total) 6% de proteína con respecto al contenido inicial.

Con todo esto se realizó una electroforesis cargando 10 μ g de proteína por calle y nos dio este resultado.

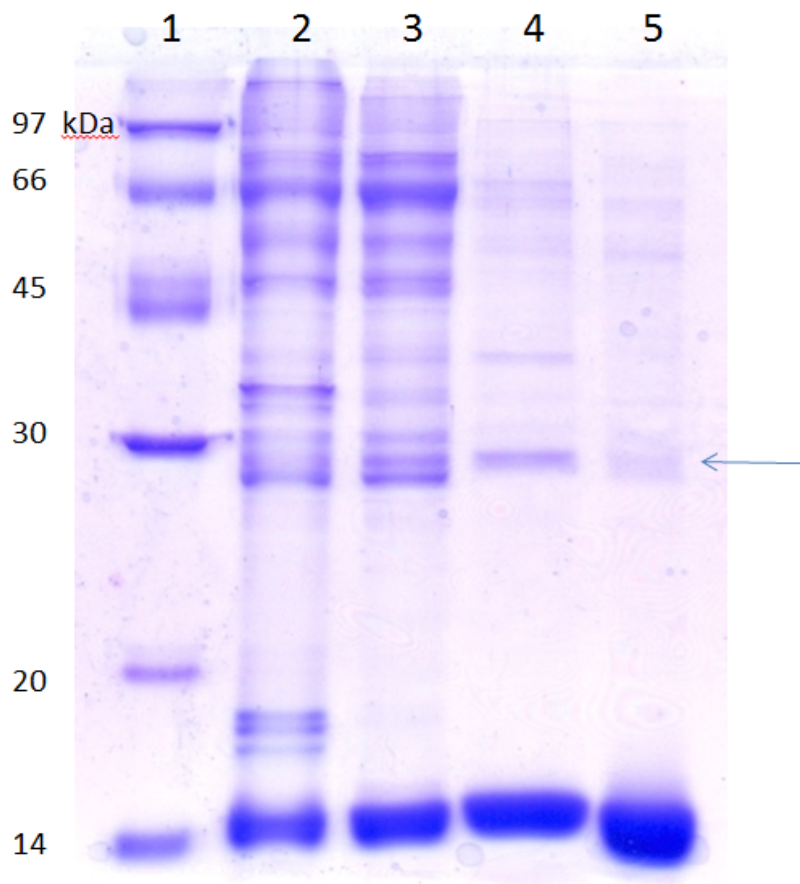


Fig.20. Resultado electroforesis; 1.Amersham Low Molecular Weigh Calibration Kit for SDS-PAGE (GE Healthcare); 2. ELC; 3. Fenil; 4. CM; 5. Superdex

En la figura 20, en la calle 1 tenemos nuestro marcador de peso molecular para la determinación de nuestra proteína y poder ver si se muestra o no. A 30 kDa se debería de dar nuestra proteína y como indica la flecha, se ve ligeramente una especie de señal por lo tanto vamos a realizar un western-blot para asegurarnos de que esto es

correcto. A 14 kDa en la calle 5, se puede ver una gran banda la cual correspondería a una hemoproteína (hemoglobina).

Se realizó mediante el sistema SNAP id. (Millipore) para su exposición a los anticuerpos. Todo esto con las mismas muestras con las que habíamos hecho la electroforesis. Y tras esto hacemos el correspondiente revelado fotográfico con este resultado.

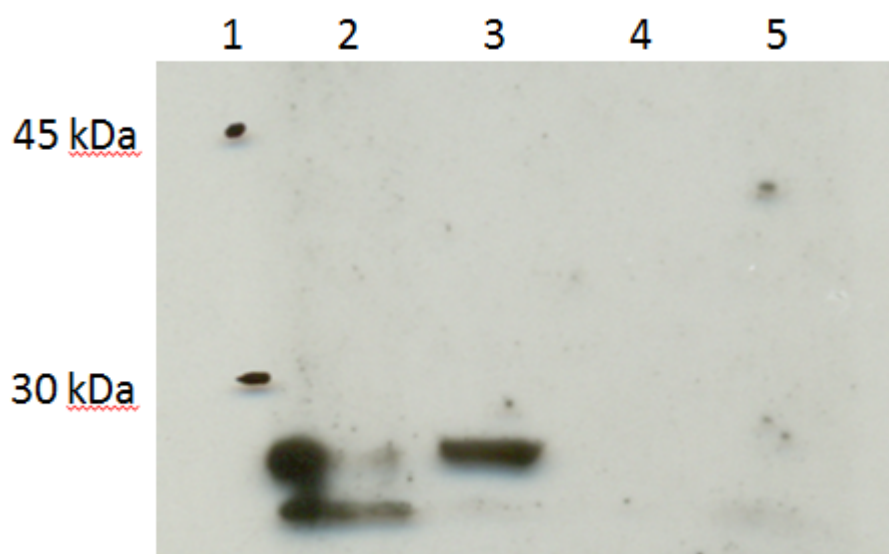


Fig.21. Revelado fotográfico del respectivo western-blot; 1. Marcador de peso molecular; 2. ELC; 3. Muestra Fenil; 4. Muestra CM; 5. Muestra Superdex

En el ELC y en la muestra Fenil se detecta la proteína Prdx6, pero sin embargo en las muestras posteriores no. Por ello vamos a tratar de realizar de nuevo el ensayo pero sin realizar el dot-blot ya que parece que nos da falsos positivos, porque como bien hemos visto en las imágenes anteriores daba señal, una vez que se ha hecho el western-blot nos demuestra que esto no es así, debido a que posiblemente los anticuerpos empleados reconocieron otras proteínas inespecíficas. La causa puede deberse a que, a diferencia de la técnica western-blot, en el dot-blot se analizaron proteínas no desnaturalizadas, por lo que la respuesta de los anticuerpos puede ser diferente a la que presentan con las proteínas desnaturalizadas.

Replanteamos nuestra estrategia haciendo las purificaciones y tomando las fracciones significativas y con ellas hacer el western-blot. Este proceso consiste como bien hemos dicho antes en hacer la electroforesis y la transferencia a membrana de

nitrocelulosa, pero como es un proceso lento que puede llevarnos horas, para agilizar este proceso lo hacemos mediante el método SNAP id. (Millipore)

Se somete al ELC (18 mL) a una cromatografía DEAE-Sefarosa en la cual recogemos fracciones de 5 mL y se mide su absorbancia a 280 nm.

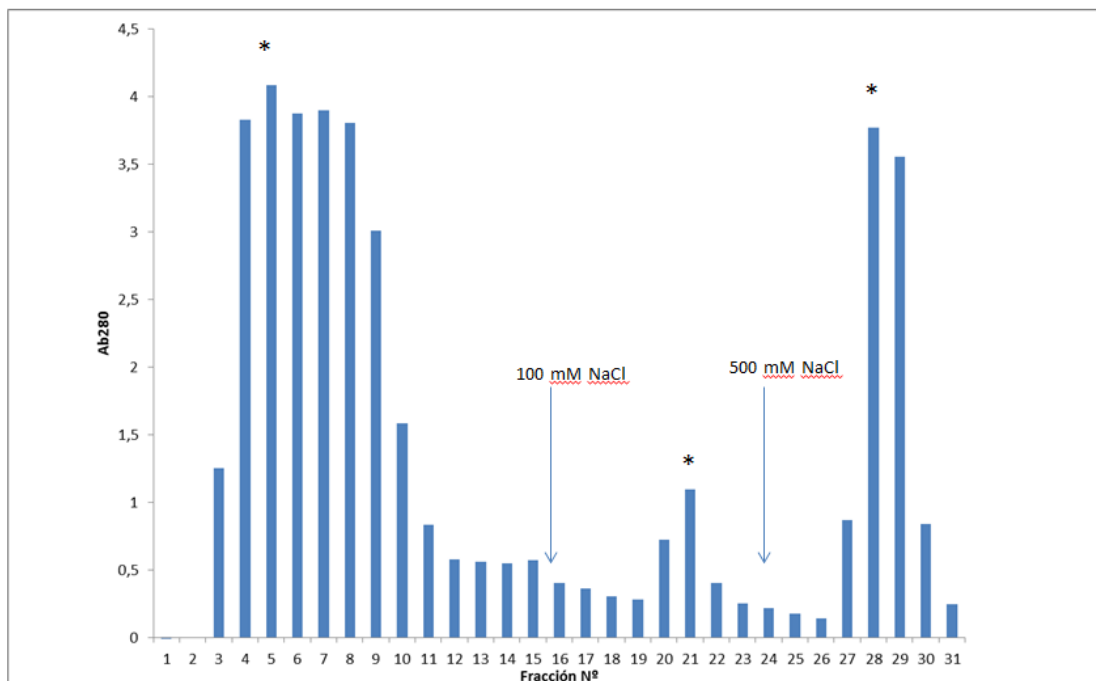


Fig.22. Cromatograma de la muestra ELC en columna DEAE-Sefarosa. Elución a 100 mM NaCl y a 500 mM NaCl. Con asterisco las fracciones mas representativas

Cogemos alícuotas de las muestras marcadas con asterisco y hacemos una electroforesis y se tiño la membrana con rojo Ponceau siendo este su resultado

1. 2. 3. 4.

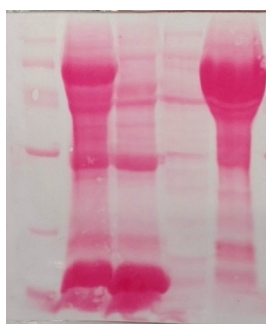


Fig.23. Membrana teñida; 1. ELC; 2. Flow through; 3. Elución 100 mM NaCl; 4. Elución 500 mM NaCl

Para intentar detectar la Prdx6 en las muestras se ejecutó un western-blot por el método que he explicado con anterioridad y se realiza su correspondiente revelado fotográfico con ECL prime WB detection reagen Amersham (GE, Healthcare)

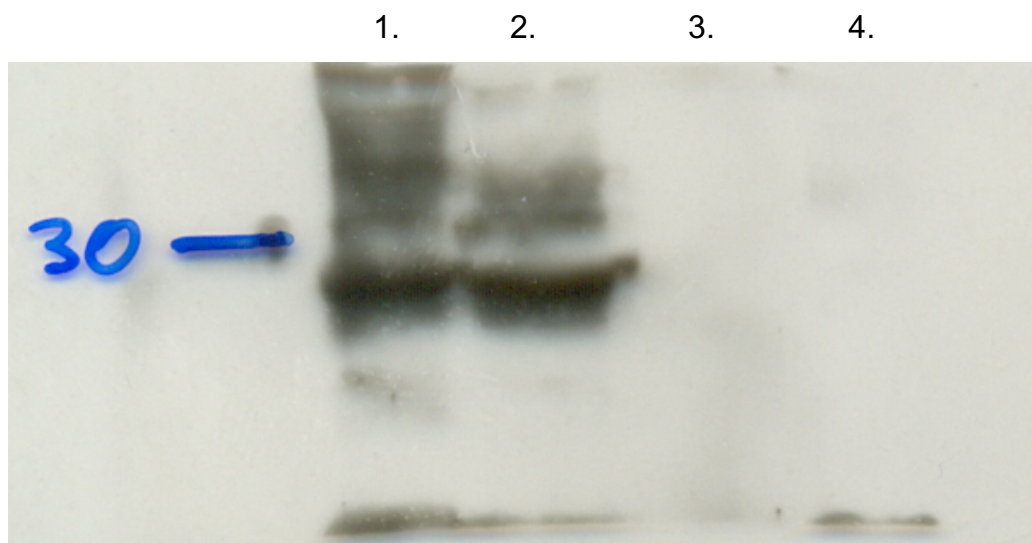


Fig.24. Revelado fotográfico del western-blot; 1. ELC; 2. Flow through; 3. Elución 100 mM NaCl; 4. Elución 500 mM NaCl

La proteína no se retiene en la columna y se eluye en el flow through. Debido a esto, se recogen las fracciones correspondientes al flow through (3-11), (Fig. 22). Estas fracciones constituyeron la muestra DEAE-FT

Una vez dializada la muestra se obtuvo una cantidad de 33 mL, y se somete a una nueva cromatografía esta vez por CM-sefarosa (Carboximetil-sefarosa). Esta columna después de la muestra, se eluye con 100 mM NaCl y después con 500 mM NaCl.

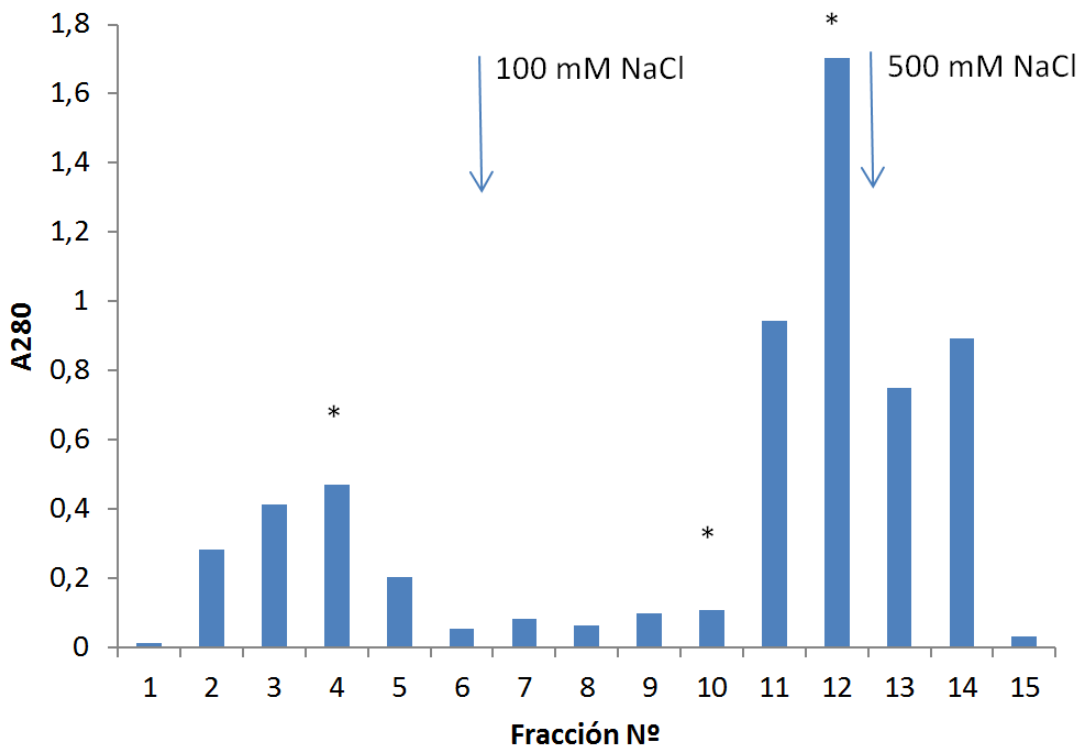


Fig.25. Cromatograma columna CM-sefarosa. Con asterisco las fracciones mas representativas, esta vez las fracciones son de 10 mL.

Con estas fracciones, tomamos unas alícuotas y realizamos de nuevo una SDS-PAGE 12% y se vuelve a teñir la membrana con rojo Ponceau

1. 2. 3. 4.

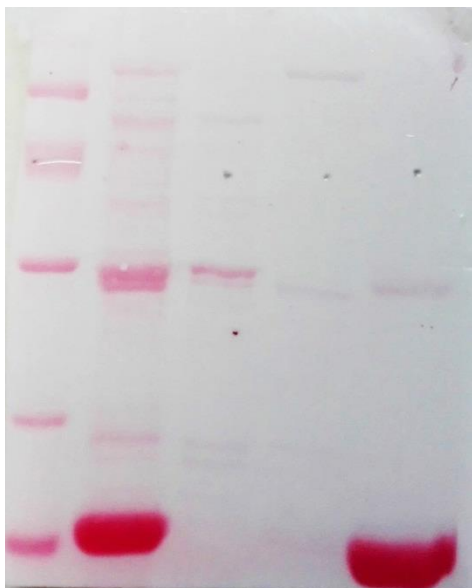


Fig.26. Membrana teñida; 1. DEAE-FIT; 2. Fracción 4; 3. Fracción 10; 4. Fracción 12

Se realizó un western-blot para detectar la Prdx6 en las muestras con este resultado

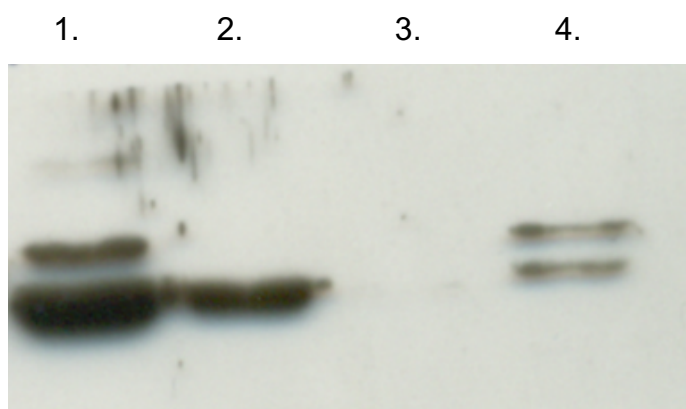


Fig.27. Revelado fotográfico del western-blot; 1. DEAE-FT; 2. Fracción 4; 3. Fracción 10; 4. Fracción 12

Se observó que la muestra eluye mayormente en el flow through (Figura 27, numeración 2). Se recogen las fracciones correspondientes al flow through de la columna CM-sefarosa que son las fracciones 2-5 y constituyen la muestra CM-FT (volumen de 33 mL).

A esta muestra se le añade sulfato amónico de concentración 1 M y se somete a una nueva cromatografía, en este caso en columna de fenil-sefarosa. La cual se le vuelve a pasar un tampón sin sulfato amónico, el cual se realiza después de la flecha que hay en la figura 28.

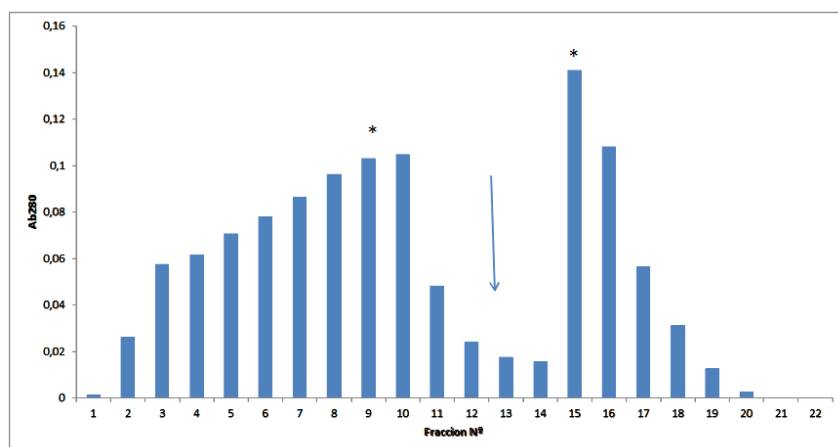


Fig.28. Cromatograma de la columna fenil-sefarosa. Con asterisco las fracciones mas llamativas, fracciones de 5 mL; Flecha, elución sin sulfato amónico.

Las alícuotas seleccionadas se trataron con dispositivos específicos (Desalting Protein Columns, Thermo Fisher) para eliminar el sulfato amónico que contienen, y se

realizó una electroforesis, su correspondiente transferencia a membrana de nitrocelulosa y su western-blot para detectar la Prdx6 con su correspondiente revelado fotográfico.

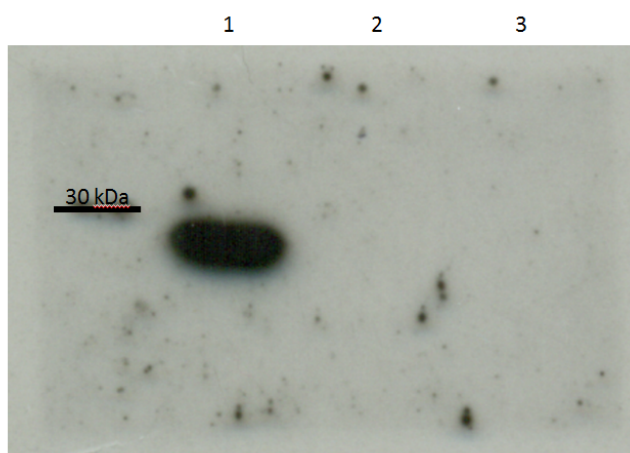


Fig.29. Revelado fotográfico del proceso western-blot; 1. CM-FT; 2. Fracción 9; 3. Fracción 15

Se vio que la Prdx6 solo ha sido detectada en la muestra preliminar a la cromatografía. Se realizó una SDS-PAGE de las muestras implicadas en la purificación y se tiñó la membrana con Coomassie

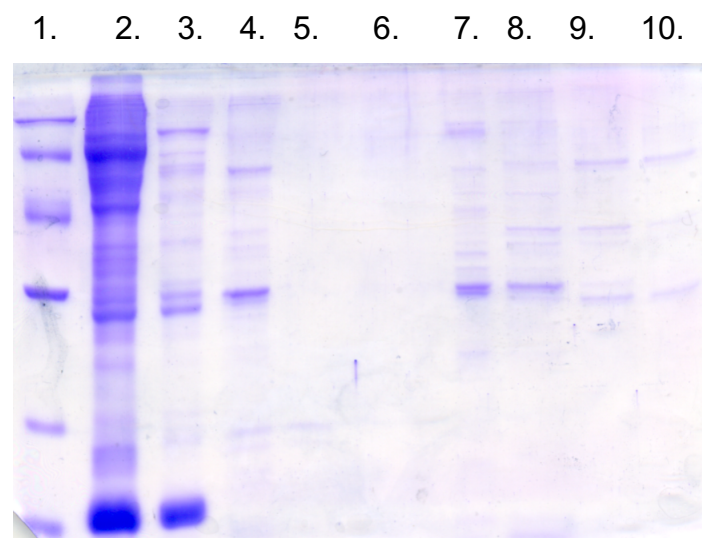


Fig.30. Electroforesis de las muestras implicadas en la purificación, 1. Marcadores de peso molecular; 2. ELC (20 μ g proteína); 3. DEAE-FT (5 μ g proteína); 4. CM-FT (2 μ g proteína); 5. Fenil-Fracción 9; 6. Fenil-Fracción 14; 7. Fenil-Fracción 15; 8. Fenil-Fracción 16; 9. Fenil-Fracción 17; 10. Fenil-Fracción 18.

Se observó que las fracciones 16,17 y 18 contenían unas bandas que podrían corresponder con la Prdx6, por lo que se volvió a realizar un western-blot con esas fracciones y con las condiciones del western-blot anterior.

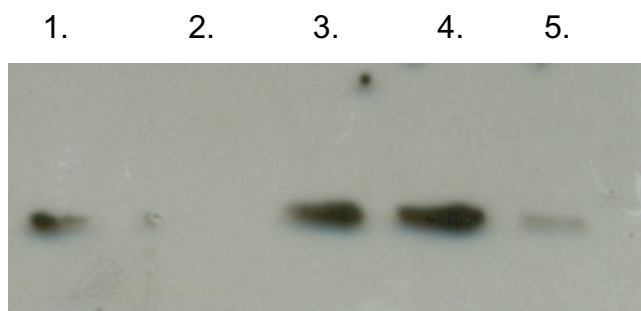


Fig.31. Revelado fotográfico de western-blot; 1. CM-FT; 2. Fracción 16; 3. Fracción 17; 4. Fracción 18; 5. Fracción 19.

La Prdx6 es fuertemente retenida en la cromatografía de fenil sefarosa, ya que eluye en las últimas fracciones del lavado sin sulfato amónico. Se reunieron las fracciones 17 y 18 que constituyeron la muestra Fenil (7 mL)

Mediante Bradford se determinó la concentración de proteínas de las muestras implicadas en la purificación.

ELC: $5,33 \text{ mg/mL} \times 18 \text{ mL} = 96 \text{ mg total (100 \%)}$

DEAE: $1,50 \text{ mg/mL} \times 33 \text{ mL} = 49,5 \text{ mg total (51 \%)}$

CM: $0,12 \text{ mg/mL} \times 33 \text{ mL} = 4 \text{ mg total (4 \%)}$

Fenil: $0,04 \text{ mg/mL} \times 7 \text{ mL} = 0,28 \text{ mg total (0.3 \% de proteína con respecto a la cantidad inicial)}$

La muestra Fenil se concentró en dispositivos Spin-X UF (Corning) hasta una concentración 0,3 mg/mL. De esta manera se realizó una SDS-PAGE, cargando aproximadamente 4,5 μg de proteína por calle. Se tiñó con Coomassie y luego se realizó un western-blot con su revelado.

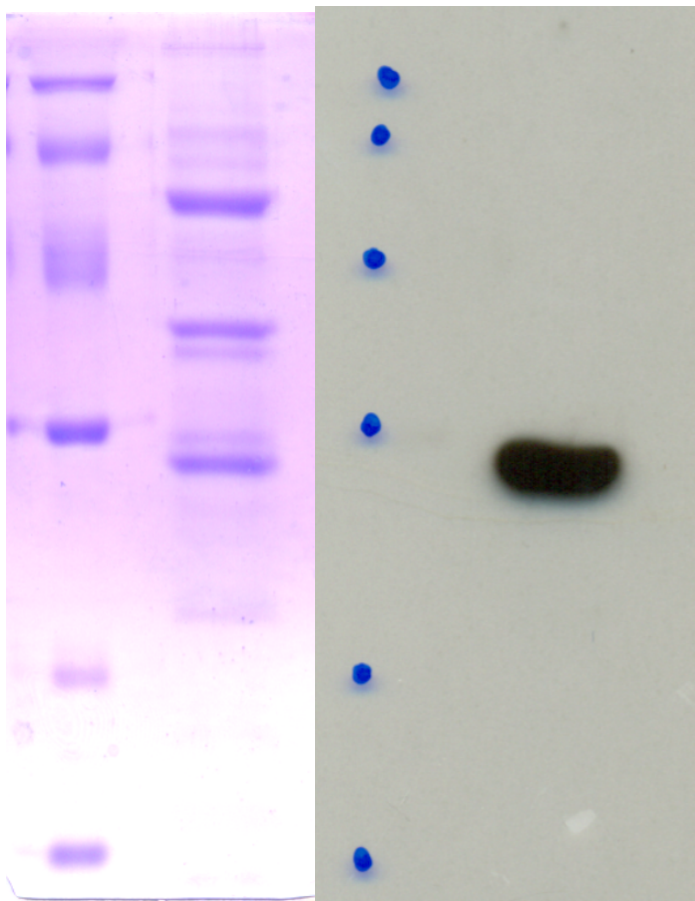


Fig.32. SDS-PAGE. Fig.33. Revelado fotográfico western-blot

La muestra fenil se marca con intensidad por lo tanto quiere decir que ahí tenemos la Prdx6. No es una purificación total de la proteína porque para ello habría que hacerse una cromatografía de exclusión molecular y otros pasos de purificación.

5.2. Actividad tiorredoxina peroxidasa

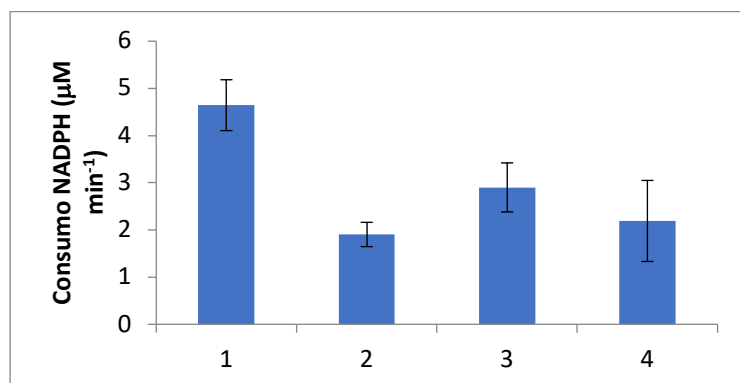


Fig.33. Actividad Tiorredoxina peroxidasa de la muestra purificada; 1. Ensayo completo; 2. Ensayo sin Trx3p; 3. Ensayo sin GSH; 4. Ensayo sin proteína purificada

Con este ensayo realizado, del cual ya he hablado de sus características en materiales y métodos, se demuestra este modelo, ya que si no es con tiorredoxina, el consumo de NADPH debido a la actividad peroxidasa no se refleja. La proteína de forma natural, como contiene glutatión, sigue este mecanismo. Sin embargo, in vitro, si no se pone glutatión en el sistema la proteína da una cierta actividad también con la tiorredoxina, porque en vez de formar un disulfuro mixto con el glutatión, se forman disulfuros entre las peroxirredoxinas, que en definitiva también lo reduce el sistema tiorredoxina.

En otros trabajos se llevó a cabo la purificación a partir de pulmón de vaca, donde se realizaron cromatografías de exclusión molecular, una detección inmunológica como también hemos hecho nosotros y obtuvieron una proteína semipura que dio señal con una electroforesis. Después de esto se confirmó la presencia de π GST con un western-blot y finalmente con una columna GST obtuvieron una proteína homogénea [6], como bien podría ser nuestro caso si se sigue purificando como bien he dicho en el final del apartado 5.1.

6. CONCLUSIONES

Debido a la gran similitud que tenían las secuencias de la Prdx1 de levadura y la Prdx6 en humanos, se ha podido realizar este trabajo ya que, como se descubrió en otros estudios [8], la Prdx1 de levadura tiene actividad peroxidasa, y esto ha sido vital para poder llevar a cabo la purificación de nuestra proteína. Al añadir glutatión y haber consumo de NADPH, está actuando el sistema tiorredoxina y por lo tanto se está completando el ciclo que se propone en la figura 6.

Conclusiones:

1. En primer lugar hemos sacado en claro con este trabajo experimental que el sistema dot-blot para la purificación de proteínas no es fiable ya que en algunos casos puede dar resultados falsos y que el usuario crea que va por buen camino cuando luego puede ser que no.
2. En segundo lugar, hemos comprobado que el sistema western-blot por SNAP id. (Millipore) nos sirve de la misma manera que nos puede servir hacer el experimento por el western-blot tradicional pero este último nos llevaría mucho mas tiempo por lo que el sistema empleado en este trabajo es fiable y rápido.
3. Se saca en claro que la Prdx6 de pulmón de ratón muestra actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina mediada con glutatión, ajustándose al modelo de actividad de la peroxirredoxina 1-Cys de la levadura (Prx1p).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Detienne G., De Haes W., Mergan L., Edwards S.L., Temmerman L., Van Bael S. (2018). "Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging". *Ageing Research Review* Vol. 44, pp.1568-1637.
2. Fisher B., (2011). "Peroxiredoxin 6: A Bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ Activities". *Antioxid. Redox Signal.* vol. 15, , pp. 831-844
3. Fisher. A.B., (2017). "Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling". *Arch. Biochem. Biophys* Vol. 617 , pp. 68-83.
4. Koua D., Cerutti L., Falquet L., Sigrist C.J.A., Theiler G., Hulo N., Dunand C., (2009). "Peroxibase: a data base with new tools for peroxidase family classification". *Nucleic Acids Research*, Volume 37, Issue suppl_1, pp. 261-266
5. Lelli Jr. J.L., Becks L.L., Dabrowska M.I., Hinshaw D.B., (1998). "ATP converts necrosis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells". *Free Radic Biol Med* Vol.25, Issue 6, pp. 694-702
6. Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; Vol.101 pp.3780-3785.
7. Pedrajas J.R., Bárcena J.A. (2018) Peroxiredoxins: Types, Characteristics and Functions in Higher Plants. In: Gupta D., Palma J., Corpas F. (eds) *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*. Springer, Cham pp. 95-121
8. Pedrajas J.R., McDonagh B., Hernández-Torres F., Miranda-Vizueté A., González-Ojeda R., Martínez-Galisteo E., Padilla A., Bárcena J.A. (2015).

“Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle”. *Antioxidants & Redox Signaling*; Vol.24, No.3. pp. 115-128

9. Schafer F.Q., Buettner G.R., (2001). “Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple”. *Free Radic Biol Med*; Vol.30, Issue 11, pp. 1191-1212