



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Purificación de peroxirredoxinas de levaduras

Alumno: María Tendero Lucerón

Febrero, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN QUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO

PURIFICACIÓN DE PEROXIRREDOXINAS DE LEVADURAS

Alumno: María Tendero Lucerón

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "María Tendero Lucerón", con una línea horizontal que atraviesa la firma.

Jaén, 9-Febrero-2018

ÍNDICE:

• 1.RESUMEN	4
○ 1.1. ABSTRACT.....	4
• 2. INTRODUCCIÓN	5
○ 2.1. LOS PERÓXIDOS Y SU REPERCUSIÓN BIOLÓGICA.....	5
○ 2.2. ENZIMAS PEROXIDASAS.....	6
○ 2.3. PEROXIRREDOXINAS.....	7
○ 2.4. LAS PEROXIRREDOXINAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	9
○ 2.5. PURIFICACIÓN DE PEROXIRREDOXINAS	11
• 3.OBJETIVOS	13
• 4.MATERIALES Y MÉTODOS	13
○ 4.1 .REACTIVOS.....	13
○ 4.2. CULTIVOS CELULARES.....	14
○ 4.3. LISADO DE CÉLULAS Y HOMOGENEIZACIÓN.....	14
○ 4.4. CROMATOGRAFÍAS.....	14
○ 4.5. DIALISIS Y CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA.....	
○ 4.6.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEINA.....	15
○ 4.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD TIORREDOXINA PEROXIDASA.....	16
○ 4.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLICRILAMIDA (SDS- PAGE).....	16
• 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
• 6. CONCLUSIÓN	25
• 7. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

Las peroxirredoxinas (Prxs) constituyen una familia de enzimas peroxidasa que adquieren el poder reductor del NADPH a través del sistema tiorredoxina. Estas enzimas se localizan distribuidas entre los organismos procariotas y eucariotas, y están presentes en altas concentraciones.

Las Prxs intervienen el mismo primer paso, en su mecanismo catalítico, en el cual la cisteína del centro activo se oxida a ácido sulfénico por sustratos peróxidos tales como peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, y una gran variedad de hidroperóxidos orgánicos

El presente trabajo aborda mecanismos de purificación mediante diferentes cromatografías de peroxirredoxinas a partir de extractos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, empleando para su detección su actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina

Palabras clave: Peroxirredoxinas (Prxs), *Saccharomyces cerevisiae*, ensayo enzimático, enzimas peroxidasa

1.1. ABSTRACT

Peroxiredoxins (Prxs) constitute a family of peroxidases enzymes that acquire the reducing power from NADPH through the thioredoxin system.

These enzymes are localized distributed among prokaryotic and eukaryotic organisms, and are present in high concentrations.

The Prxs are involved in the same first step in their catalytic mechanism, in which the active site cysteine is oxidized to sulfenic acid by peroxide substrates such as hydrogen peroxide, peroxynitrite, and a large variety of organic hydroperoxides.

The work approaches the purification of peroxiredoxins from extracts of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by means of different chromatographies, using for its detection the thioredoxin-dependent peroxidase activity

Key words: Peroxirredoxins (Prxs), *Saccharomyces cerevisiae*, enzyme assay, peroxidases enzymes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Los peróxidos y su repercusión biológica

Los peróxidos son compuestos que contienen un grupo químico peróxido (-O-O-) y ejercen acciones relevantes sobre los seres vivos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una especie de oxígeno reactivo con un poder oxidante relativamente bajo, pero la reducción a través de la reacción Fenton genera el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), que es un oxidante fuerte y muy reactivo sobre la mayoría de las biomoléculas, como lípidos, proteínas y ADN (Sies, 1986). El H_2O_2 se produce principalmente en las células como producto de la dismutación del anión superóxido (O_2^-), catalizado por las superóxido dismutasas, el cual se produce metabólicamente en procesos tales como la respiración celular, la fotosíntesis, las NADPH oxidasas y otras oxidasas (Cadenas et al., 1977; Heber U, 2002; Foreman et al., 2003; Geiszt & Leto, 2004). El H_2O_2 también puede ser generado por factores abióticos como xenobióticos, metales o radiaciones de alta energía como ciclos redox. Altas concentraciones de H_2O_2 son potencialmente perjudiciales para las células, sin embargo, a niveles bajos, el hidrógeno de peróxido actúa como un mensajero intramolecular en señalización celular (Veal et al., 2007). La oxidación mediada por radicales de sobre ácidos grasos insaturados conocida como peroxidación lipídica conduce a la propagación de hidroperóxidos de alquilo y otros productos de degradación, que pueden unirse a una gran variedad de macromoléculas y alterar sus funciones. (Pedrajas et al., 1998) El peroxinitrito (ONOOH) es otro tipo de peróxido reactivo que se genera en las células por la reacción espontánea del óxido nítrico con el anión superóxido y ejerce la nitración de la tirosina en las proteínas, causando disfunciones (Radi R., 2004). Las células se defienden contra el daño ejercido por los peróxidos con enzimas antioxidantes, por ejemplo, las peroxidasas, y otras biomoléculas no enzimáticas, tales como el tocoferol, carotenoides o el ácido ascórbico.

2.2. Enzimas peroxidasas

Las peroxidasas son unas enzimas que constituyen una gran familia de proteínas, que catalizan la reducción de moléculas peróxido según siguiente reacción genérica:



Para muchas de estas enzimas el sustrato óptimo es el peróxido de hidrógeno, pero existen peroxidasas con más afinidad hacia hidroperóxidos orgánicos.

Entre las peroxidasas se pueden distinguir aquellas que tienen grupo hemo y las que no. Peroxidasas relevantemente caracterizada son las glutatión peroxidasas, un grupo de enzimas que se encuentran prácticamente en todos los seres vivos y cumplen un papel fundamental en la protección de los organismos frente a los daños oxidativos. Reducen principalmente H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos utilizando el tripéptido glutatión (GSH) como sustrato donador de electrones. Otra peroxidasa relevante es la catalasa, una hemoenzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógenos en agua y oxígeno, y que en las células se encuentra específicamente asociada a peroxisomas. La principal función es la de proteger a la célula contra los daños oxidativos derivados del H_2O_2 que se produce en varias reacciones oxidativas llevadas a cabo en los peroxisomas. Otra peroxidasa destacable es la ascobato peroxidasa, enzima propia de plantas, con un grupo hemo y utiliza el ascorbato como donador de electrones (Noctor & Foyer, 1998).

Las enzimas peroxidasas pueden ofrecer ciertas aplicaciones de interés económico comercial. Por ejemplo, pueden ser empleadas en biosensores, instrumentos medidores de parámetros biológicos o químicos con aplicabilidad en medicina, controles de calidad de alimentos, monitorización ambiental y en investigación. También son utilizadas en kits analíticos y de diagnóstico. Así por ejemplo la peroxidasa de rábano picante (HRP) se emplea conjugada a anticuerpos que detectan moléculas indicadoras de enfermedad, como cáncer. También, las peroxidasas pueden aplicarse en el tratamiento de tintes industriales, biorremediación de compuestos fenólicos en aguas residuales, en la industria papelera y en la fabricación de tintes capilares (Pandey et al., 2017)

Además de las enzimas citadas anteriormente, otra familia de peroxidasa que han sido las más recientemente descubiertas y caracterizadas son las peroxiredoxinas, que son el objeto de estudio de este trabajo.

2.3. Peroxiredoxinas

Las peroxirredoxinas (PRX) (E.C. 1.11.1.15) son proteínas homodiméricas simples con actividad peroxidasa sobre una variedad de sustratos peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y el peroxinitrito (NOOH). Las PRXs existen en prácticamente en todos los seres vivos y en las células suelen contener varias isoformas específicamente distribuidas en orgánulos, como citosol, mitocondrias, peroxisomas, núcleo, cloroplastos e incluso en el espacio extracelular.

El mecanismo catalítico de las peroxirredoxinas se esquematiza en la **Figura 1**. Las peroxirredoxinas contienen una cisteína en el centro activo, la cisteína peroxidática (Cp), que reacciona con el sustrato de peróxido oxidándose a ácido sulfínico de cisteína (C-SOH), con una constante de segundo orden de entre 10^{-5} a $10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una afinidad de magnitud micromolar (Winterbourn & Peskin , 2016). Para regenerar el centro activo reducido, el grupo sulfénico reacciona con un grupo tiol de otra cisteína, la cisteína resolvente (Cr), generalmente proporcionada por la misma proteína, formándose un enlace disulfuro. Para restaurar el estado inicial, el disulfuro se reduce finalmente por un sistema enzimático, generalmente un sistema tiorredoxina, compuesto por tiorredoxina reductasa (TRR) y tiorredoxina (Chae et al., 1994). En algunos casos el tripéptido glutatión (GSH) es el que proporciona la cisteína resolvente a la peroxiredoxina y entonces el disulfido mezclado puede ser reducido por un sistema de glutaredoxina, compuesto por glutaredoxina, GSH y glutamina reductasa (GSR) (Rouhier et al., 2002; Pedrajas et al., 2010; Pedrajas et al., 2016). En todo caso, el NADPH es la fuente resultante para todas las peroxirredoxinas.

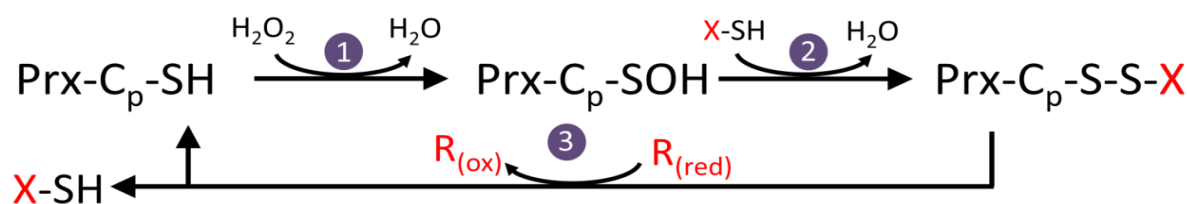


Figura 1: Esquema del mecanismo catalítico genérico de las peroxirredoxinas, en el que se distinguen tres fases: 1) peroxidación, 2) resolución y 3) reciclaje.

Las Prxs han sido clasificadas en función de diferentes criterios. Unos criterios se basan en el mecanismo de reacción y a la cantidad de residuos de Cys involucrados directamente en la catálisis. De este modo, se ha establecido un criterio bastante generalizado de diferenciar a las peroxirredoxinas en cuatro familias: típicas 2-Cys-PRXs, atípicas 2-Cys-PRXs, 1-Cys-PRXs y PrxQ (Dietz 2001). Todos estos tipos de peroxirredoxinas están representados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como describiremos a continuación.

Otros criterios de clasificación se basan en la homología y aspectos estructurales lo que pone en evidencia la existencia de seis subfamilias de peroxirredoxinas (Karplus, 2015). En la base de datos PREX (PeroxiRedoxin classification indEX; <http://csb.wfu.edu/prex/>) se proporciona información clasificatoria de las Prxs de manera no ambigua según información estructural y de secuencia del sitio activo (Soito et al., 2011).

2.4. Las peroxirredoxinas de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene cuatro tipos de peroxirredoxinas:

- **Tsa1p y Tsa2p:** TSA es la abreviatura de *Thiol Specific Antioxidant*, nombre con el que se conoció en un principio a esta proteína purificada de levaduras por poseer una aparente capacidad de eliminar especies reactivas de azufre (Kim et al., 1987). Poco después se demostró que esta proteína verdaderamente lo que hace es reducir peróxidos con los

electrones transmitidos del NADPH a través del sistema tiorredoxina, siendo ésta la primera proteína en la que se caracterizó una actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina (Chae et al., 1994). TSA es una peroxirredoxina del tipo 2-Cys-PRX típica, caracterizada por formar un dímero con subunidades anti paralelas (dímero tipo-B) y con la cisteína resolvente localizada próxima al extremo C-terminal. Cuando se oxida por peróxido, la cisteína peroxidática de una subunidad forman un enlace disulfuro con la cisteína resolvente de la otra subunidad, que es finalmente reducido por TRX. Existen dos genes TSA en *Saccharomyces cerevisiae* (TSA1 y TSA2), que expresan las correspondientes proteínas, muy homologas entre sí y que se localizan en el citosol.

- **Ahp1p:** Esta peroxirredoxina es del tipo 2-Cys-PRX atípica, caracterizada por formar homodímeros pero con los monómeros dispuestos con una orientación diferente los de TSA (dímero tipo-A). También, la posición de la cisteína resolvente es diferente a las de las 2-Cys-PRX típicas. Ahp1p tiene tres cisteínas en su secuencia (C31, C62 y C120), siendo la 62 la peroxidática. Los primeros estudios otorgaron a C120 el papel de Cr, pero estudios posteriores revelaron que esa función corresponde a la C32 (Jeong et al., 1999; Lian et al., 2012). Cuando reacciona con los peróxidos Ahp1p establece también enlaces disulfuro intermoleculares que son reducidos por TRX. Ahp1p se localiza específicamente en peroxisomas.
- **Prx1p:** Esta es una peroxirredoxina tipo 1-Cys-PRX, lo que implica que forma un dímero tipo-B, como TSA, pero no tiene cisteínas que actúen como resolventes. Cuando se oxida con un sustrato peróxido, la Cp de Prx1p forma un disulfuro mixto con el GSH que es reducido tanto por TRX como GRX (Pedrajas et al., 2016). Esta proteína se localiza en la matriz de las mitocondrias.
- **Dot5p:** Peroxirredoxina tipo PrxQ. Es una proteína monomérica y sus cisteínas Cp y Cr están separadas por cuatro residuos de aminoácido. Cuando se oxida con un peróxido forma un enlace disulfuro Cp-Cr intramolecular, que se reduce con TRX. Dot5p se localiza en el núcleo y,

además de una función antioxidante, se le atribuye un papel activador de la expresión génica en la región telomérica de los cromosomas (Cha et al., 2003; Izawa et al., 2004).

2.5. Purificación de peroxirredoxinas.

La primeras evidencias de la existencia de las peroxirredoxinas se basó en la protección antioxidante que ofrecían estas proteínas a la enzima glutamina sintetasa, que es sensible al peróxido de hidrógeno, y utilizando esta propiedad ciertas peroxirredoxinas fueron en un principio purificadas de la levadura *S. cerevisiae* mediante una combinación cromatografías de intercambio iónico, de fase reversa y de exclusión molecular (Kim et al., 1988; Chae et al., 1994). Posteriormente, la tecnología del ADN recombinante permitió la purificación de una gran variedad de peroxirredoxinas de diferentes organismos mediante un solo paso de cromatografía de afinidad.

Una proteína recombinante es aquella que procede de la expresión de un gen diseñado por ingeniería genética uniendo secuencias de ADN de diferente origen. De este modo, un fragmento de ADN de una especie (p. e. humana) puede ser insertado en el ADN de otra especie (p. e. bacteria) de modo que resulte un gen de diseño que, al ser introducido en células bacterianas, las el producto derivado del ADN huésped. Generalmente, ADN que codifica a una proteína de interés se inserta en un vector genómico apropiado, generalmente un plásmido, que aporta los elementos génicos adecuados para dirigir la expresión de la proteína de interés en células de cultivo. El fragmento de ADN de interés es insertado al vector adyacente a una secuencia que codifica un determinado péptido (Tag), de modo que, cuando se expresa el ADN recombinante, se crea una proteína de fusión, constituida por la unión del péptido Tag con la proteína de interés. El péptido Tag ofrece la capacidad de unir específicamente a la proteína recombinante a un determinado ligando de una cromatografía de afinidad, un tipo de cromatografía muy selectivo que permite la purificación a homogeneidad de una proteína a partir de un extracto proteico celular.

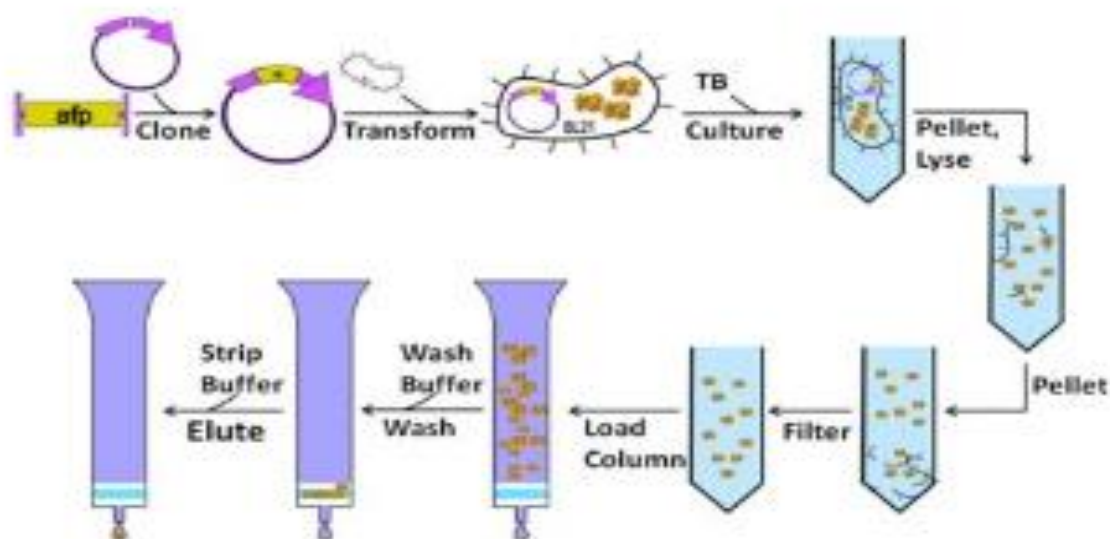


Figura 2: Representación esquemática de la obtención de una proteína recombinante mediante ingeniería genética.

En la mayoría de los casos en los que se han purificado peroxirredoxinas para su estudio y caracterización se ha procedido a la fabricación de genes recombinantes y a su expresión en células bacterianas. No obstante, la expresión de una proteína de origen eucariótico en células bacterianas puede dar como resultado una proteína con relevantes diferencias estructurales y funcionales a la proteína nativa, ya que las bacterias carecen de muchos mecanismos de modificación pos-traducciona que requieren muchas de las proteínas eucarióticas.

En este trabajo se ha tratado de purificar peroxirredoxinas nativas a partir de extractos celulares de *S. cerevisiae* utilizando procedimientos de purificación inespecíficos. Para la detección de las peroxirredoxinas en muestras complejas se ha puesto a punto un ensayo enzimático específico de actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado (TFG) trata de la purificación de peroxirredoxinas a partir de un extracto de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando para su detección su actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina.

En este estudio se definirá una proteína con unas características análogas a otras, teniendo en cuenta el material del laboratorio autorizado.

En dicho procedimiento estudiaremos las condiciones más adecuadas y eficaces para la obtención de la máxima cantidad de proteína y pureza, a partir de un método directo

Los objetivos específicos propuestos para esta investigación serán principalmente la cromatografía líquida de intercambio iónico en DEAE sefarosa, posteriormente continuaremos con una cromatografía de intercambio iónico en columna UNO-Q, seguida de una cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6, y finalmente se examinará mediante una electroforesis en SDS para mayor comprobación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Reactivos.

Tert-Butilhidroperóxido (t-BuOOH), persulfato amónico (PSAM), albumina de suero bovino (BSA), cocktail de inhibidores de proteasas, Trizma, etilendiamino-tetra-acético (EDTA), Triton X-100, fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF) y NADPH fueron suministrados por Sigma. Tetrametiletilendiamida (TEMED), ditioneitol (DTT) y disolución acrilamida-bisacrilamida (30% p/v, 19:1) fueron de Bio Rad. Zimolisa 20T fue suministrada por US Biologicals.

4.2. Cultivos celulares.

El medio de cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue YPD BROTH (Pronadisa). Los cultivos se incubaron a 30° C en agitación orbital durante 24 horas. Las células fueron recolectadas por centrifugación (2.000xg, 30min, 4° C) y se conservaron a -20°C.

4.3. Lisado de células y homogeneización.

5 gramos de células *Saccharomyces cerevisiae* se disolvieron en 25 mL de tampón de homogenización compuesto de Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,1mM DTT, 0,1% p/v Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM de PMSF al que se añadió 25 µL de un cocktail de inhibidores de proteasas y 25 mg de Zimoliasa 20T. Las células se lisaron por sonicación con un sonicador (Bandelin Sonopuls HD 2070) durante 1 hora, manteniendo la disolución en un baño de hielo. Seguidamente se centrifugó a 10.000xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante constituyó el extracto libre de células (ELC).

4.4. Cromatografías.

Las cromatografías empleadas fueron:

- Cromatografía de intercambio iónico en DEAE sefarosa (GE Healthcare) en columna de 4 x 2 cm, equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,8. Tras aplicación de la muestra y lavado con tampón de equilibrio, se aplicó un gradiente lineal de 0 a 0,5 M de NaCl en tampón de equilibrio, en un volumen total de 100 mL. Finalmente, la columna fue regenerada con 1 M NaCl. El flujo de la cromatografía fue de 1 ml/min, regulado con una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3)
- Cromatografía de intercambio iónico en columna UNO Q-1 (BioRad) acoplada a un equipo FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) Bio Logic DuoFlow (BioRad), equilibrada con tampón Tris-HCl 50mM, pH 8. Tras la aplicación de la muestra y el

lavado correspondiente con tampón de equilibrio, se aplicó un gradiente lineal de 0 a 0,5 M de NaCl en tampón de equilibrio, en un volumen total de 20ml. Posteriormente, la columna fue regenerada con 1 M NaCl. El flujo de la cromatografía fue de 1ml/min.

- Cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia), acoplada a un equipo FPLC Bio Logic DuoFlow (BioRad) y equilibrada con tampón Tris-HCl 50mM, pH 8. El flujo de la cromatografía fue de 0,2 ml/min.

4.5. Diálisis y concentración de muestras.

Para eliminar moléculas de bajo peso molecular de una muestra y cambiar las características iónicas (pH y salinidad) del disolvente, la muestra fue sometida a diálisis consistente en el cierre de la muestra en bolsa de membrana Spectra/Por MWCO 8000 (Spectrum Labs. Com.) en inmersión de la bolsa en una disolución tampón de las características deseadas de un volumen al menos 20 veces mayor que la muestra. Se mantiene la muestra sumergida de este modo durante al menos seis horas a 4° C para conseguir el equilibrio osmótico entre el espacio interno y externo de la bolsa.

Para concentrar las muestras se utilizaron unos dispositivos de ultrafiltración por centrifugación acorde con las instrucciones del fabricante (Ultracel YH-10 Centricon, Millipore).

4.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para la electroforesis de proteínas se fabricaron geles de poliacrilamida con dos partes diferenciadas: el gel separador que contiene un 12% p/v de acrilamida, 4,6 % p/v Tris-HCl, 0,1 % p/v dodecilsulfato sódico, pH 8,8, y el gel concentrador con 5% p/v de acrilamida, 1.5% p/v Tris-HCl, 0,1% p/v dodecilsulfato sódico, pH 6,8. La polimerización de la acrilamida se indujo añadiendo 10 µL de PSAM al 10% p/v y 3µL de TEMED por mililitro de disolución.

Las muestras sometidas a electroforesis se desnaturalizaron mezclándolas en proporción 3:1 con tampón de carga (200mM Tris-HCl, pH 6,8; 6% p/v SDS; 4% v/v β-mercaptoetanol; 60% v/v glicerol; 0,3% p/v azul de bromofenol) y exponiéndolas a 100° C durante 5 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris-glicina-SDS (0,69 % p/v Tris, 2,88 % p/v glicina, 0,1 % p/v SDS) en un equipo MiniProtean (BioRad) bajo un voltaje constante de 200V regulado por una fuente de alimentación PowerPac Basic (BioRad).

Tras la electroforesis los geles fueron teñidos con una disolución de azul Coomassie (0,1 % p/v Coomassie Blue R-250 en ácido acético al 10% v/v y 40 % v/v metanol, respectivamente).

4.7. Ensayo de actividad tiorredoxina peroxidasa.

El ensayo enzimático de actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina consistió en una disolución de 100 µL que contiene 250 µM NADPH, 0,5 µM Trr2p (Tiorredoxina reductasa 2 de *S. cerevisiae*), 5 µM Trx3p (Tiorredoxina 3 de *S. cerevisiae*), 20µL de muestra y 100µL t-BuOOH en tampón HEPES 50mM, pH 7. Las proteínas recombinantes Trr2p y Trx3p fueron purificadas como se describe en Pedrajas et al. (1999). Se analiza por espectrofotometría el detrimento de absorbancia a 340nm debida a la oxidación de NADPH. Se define una unidad enzimática (U) como la enzima necesaria para consumir 1µmol de NADPH por minuto considerando un coeficiente de extinción para el NADPH de 6220 M⁻¹cm¹.

$$U/mL = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1} = (\Delta A_{340}/\text{min}) \times V \times \epsilon^{-1} \times d^{-1} \times v^{-1} \times 10^6$$

V: volumen de reacción (L)

ε: coeficiente de extinción molar

d: paso de luz de la cubeta de espectrofotometría (1cm)

v: volumen de la muestra (ml)

4.8. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración proteica de las diferentes muestras ensayadas en el estudio se determinó siguiendo el método colorimétrico de Bradford, utilizando el reactivo Protein Assay Dye Concentrate Solution (BioRad) y una disolución estándar de BSA (1 mg/ml) para establecer un patrón de referencia proteína-absorbancia.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Nuestro estudio trata la purificación de peroxiredoxinas a partir de un extracto de células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleando para su detección su actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina. Las células fueron cultivadas en un medio nutritivo completo en condiciones suaves, como se describe en Materiales y Métodos. Para la lisis celular se tuvo en cuenta que el medio de homogeneización tuviera una serie de compuestos que contribuyeran a preservar la integridad proteica y actividad enzimática de las peroxirredoxinas. Se incluyeron un cocktail comercial de compuestos, PMSF y EDTA como compuestos inhibidores de proteasas. La Zymoliasa 20T contribuye a la degradación de la pared celular de las levaduras y el Tritón-X100 a disolver las membranas celulares. El DTT fue incluido en el medio de homogeneización porque contribuye a preservar la actividad peroxidasa de las peroxirredoxinas. La rotura celular se completó mediante sonicación, que produce micro burbujas en la disolución por cavitación ultrasónica que provocan la rotura celular. El homogenado se somete a centrifugación para descartar partículas insolubles y el sobrenadante se sometió a diálisis frente a tampón Tris-HCl 25mM, pH 7,8, para eliminar compuestos de bajo peso molecular. La muestra resultante, con una concentración de proteínas de 8 mg/ml, aproximadamente, constituyó el extracto libre de células (ELC), material de partida de la purificación.

Previo a la purificación, se realizaron una serie de ensayos empleando como muestra a ELC, para validar el método de propuesto de determinación de actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina en muestras complejas de proteínas. Se consideró necesario dializar la muestra para eliminar pequeñas moléculas y metabolitos que pudieran interferir con el ensayo enzimático. Por

ejemplo, el glutatión es un tripéptido que interviene en la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa. De contener la muestra glutatión, la actividad peroxidasa debida a las glutatión peroxidasa podría enmascarar la actividad peroxidasa de las peroxirredoxinas. Por otro lado, se eligió el tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) como sustrato, ya que este peróxido no puede ser consumido por la enzima catalasa que contenga la muestra.

Los resultados de las pruebas de actividad tiorredoxina peroxidasa (TPX) se muestran en la **Figura 3**. El ensayo completo, con ELC, Trr2p y Trx3p, muestra un consumo muy destacado de NADPH ligado a la presencia del peróxido en el ensayo. El consumo es prácticamente inexistente en ausencia de ELC, luego la actividad peroxidasa es debida a proteínas del extracto. Tampoco hay actividad si se suprime la tiorredoxina reductasa del ensayo, por lo que la actividad es dependiente de sistema tiorredoxina completo. No obstante, se aprecia algo de actividad cuando se suprime la tiorredoxina del ensayo. Este efecto puede ser debido a que la muestra ELC contiene cierta cantidad de tiorredoxina, propias de la levadura, que permita cierta actividad tiorredoxina peroxidasa. El añadido de Trx3p que aporta el ensayo potencia la actividad peroxidasa de las peroxirredoxinas de la muestra. Por tanto, el método de ensayo enzimático diseñado parece ser efectivo para detectar la actividad peroxidasa de las peroxirredoxinas contenidas en una muestra compleja.

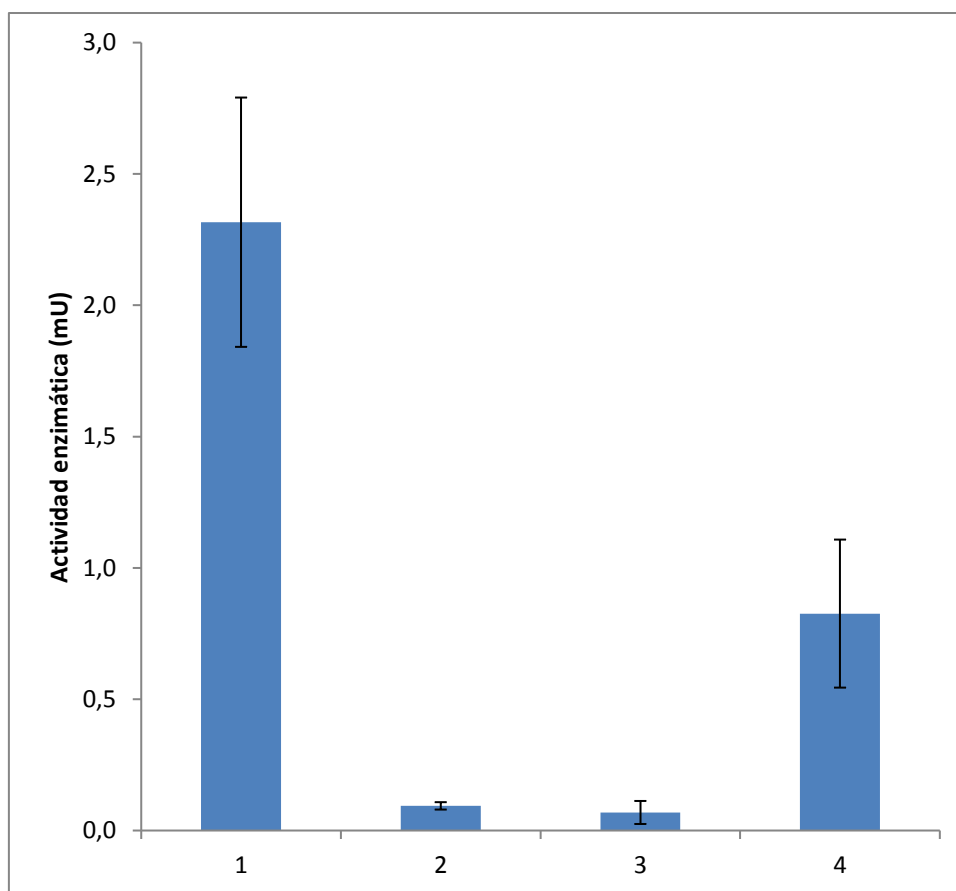


Figura 3: Actividad tiorredoxina peroxidasa en ELC de *S. cerevisiae*. Se analiza el consumo de NADPH en una mezcla de ensayo descrita en Materiales y Métodos. 1) Ensayo completo, 2) ensayo sin ELC, 3) ensayo sin Trr2p y 4) ensayo sin Trx3p. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres determinaciones diferentes.

El primer paso de purificación consistió en una cromatografía líquida de intercambio iónico en DEAE sefarosa. Como se ha referido anteriormente, la muestra ELC fue dializada frente un tampón ligeramente alcalino (pH 7,8) con el fin no solo de eliminar pequeños metabolitos sino también para tratar que las peroxiredoxinas de la muestra adquieran carga neta negativa y así poder ser adsorbidas a la DEAE cromatografía, de carga positiva. Tras aplicación de la muestra ELC a la columna se lavó con tampón de equilibrio y seguidamente se aplicó un gradiente lineal de cloruro sódico para eluir las proteínas adsorbidas a la columna. Finalmente, se aplicó un tampón con alta concentración de cloruro sódico para eliminar toda proteína adsorbida y regenerar la matriz cromatografía.

Se recolectaron fracciones de 5 ml que se analizaron por su contenido en proteínas y por su contenido específico en peroxirredoxinas en base a su actividad tiorredoxina peroxidasa. El cromatograma resultante se muestra en la **Figura 4**.

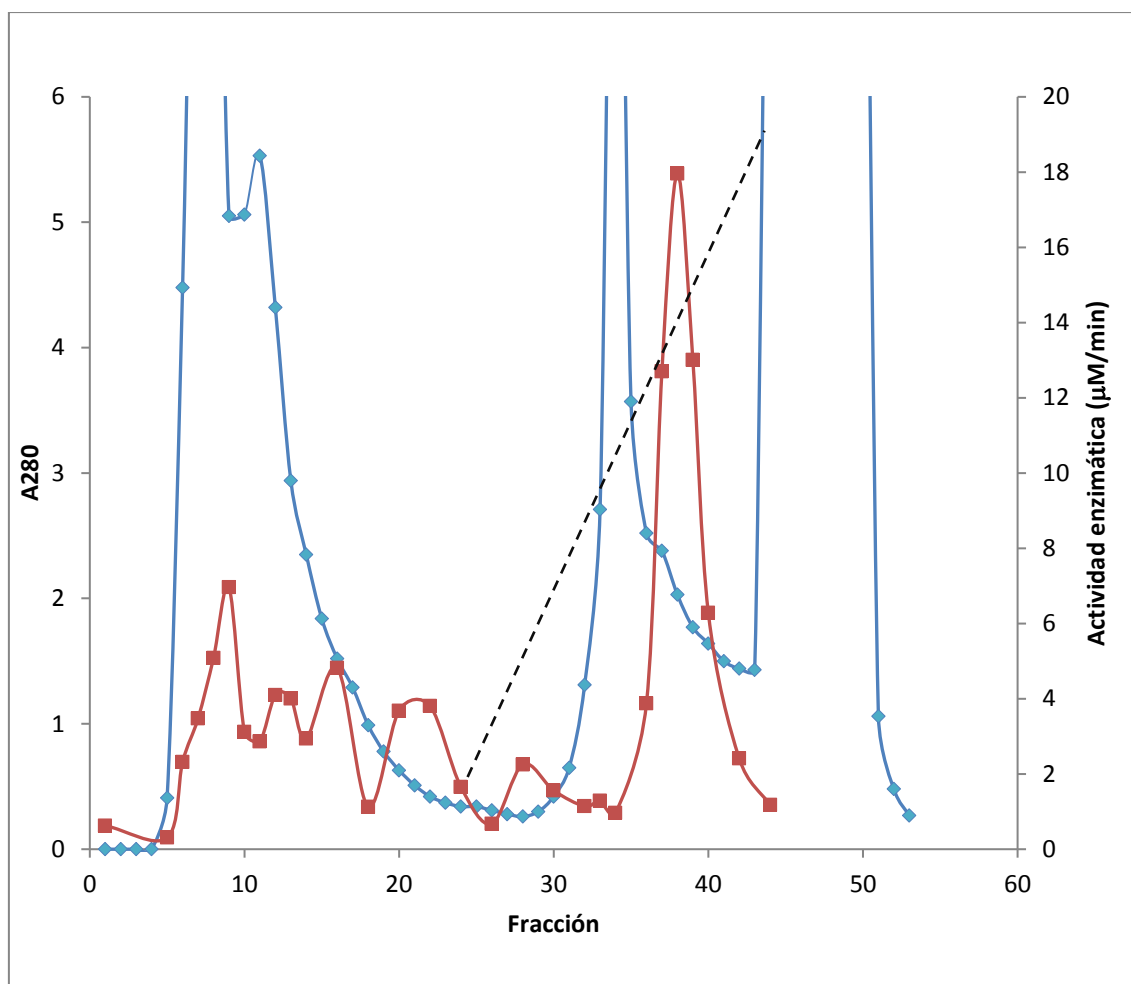


Figura 4: Cromatograma de la cromatografía de la muestra ELC en DEAE sefarosa. La línea azul muestra el perfil de elución de proteína en base a la A280. La línea naranja muestra la actividad tiorredoxina peroxidasa. La línea punteada representa la fase de aplicación del gradiente de NaCl. Las fracciones contienen un volumen de 5 ml.

En la cromatografía en DEAE sefarosa, parte de la actividad tiorredoxina peroxidasa no se retuvo en la matriz cromatográfica y se eluyó en una serie de picos poco definidos durante la fase de carga y lavado. No obstante, parte de la actividad quedó retenida en la columna y fue eluída en un pico cromatográfico

bien definido hacia la mitad de la fase de gradiente. En la fase de regeneración tras el gradiente no se detectó actividad tiorredoxina peroxidasa. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de actividad eluido en el gradiente, conformando la muestra denominada DEAE, cuya concentración de proteína y actividad TPX se muestran en la **Tabla 1**.

A continuación se realizó otra cromatografía de intercambio iónico en columna UNO-Q equilibrada en Tris-HCl 50 mM, pH 8, acoplada a un equipo FPLC. Si bien la columna UNO-Q presenta unas propiedades cromatográficas similares a la DEAE, se optó por hacer la prueba porque a priori aporta mayor resolución cromatográfica. La muestra DEAE fue primero dializada frente a Tris-HCl 50 mM, pH 8, y se aplicó a la columna UNO-Q. Tras lavado de la columna con tampón de equilibrio, se aplicó un gradiente de ClNa y, finalmente, se regeneró la columna con alta concentración de ClNa. La **Figura 5** muestra el cromatograma de la purificación, solamente en la fase del gradiente ya que fue la única fase de la cromatografía en la que eluyó proteína y actividad TPX.

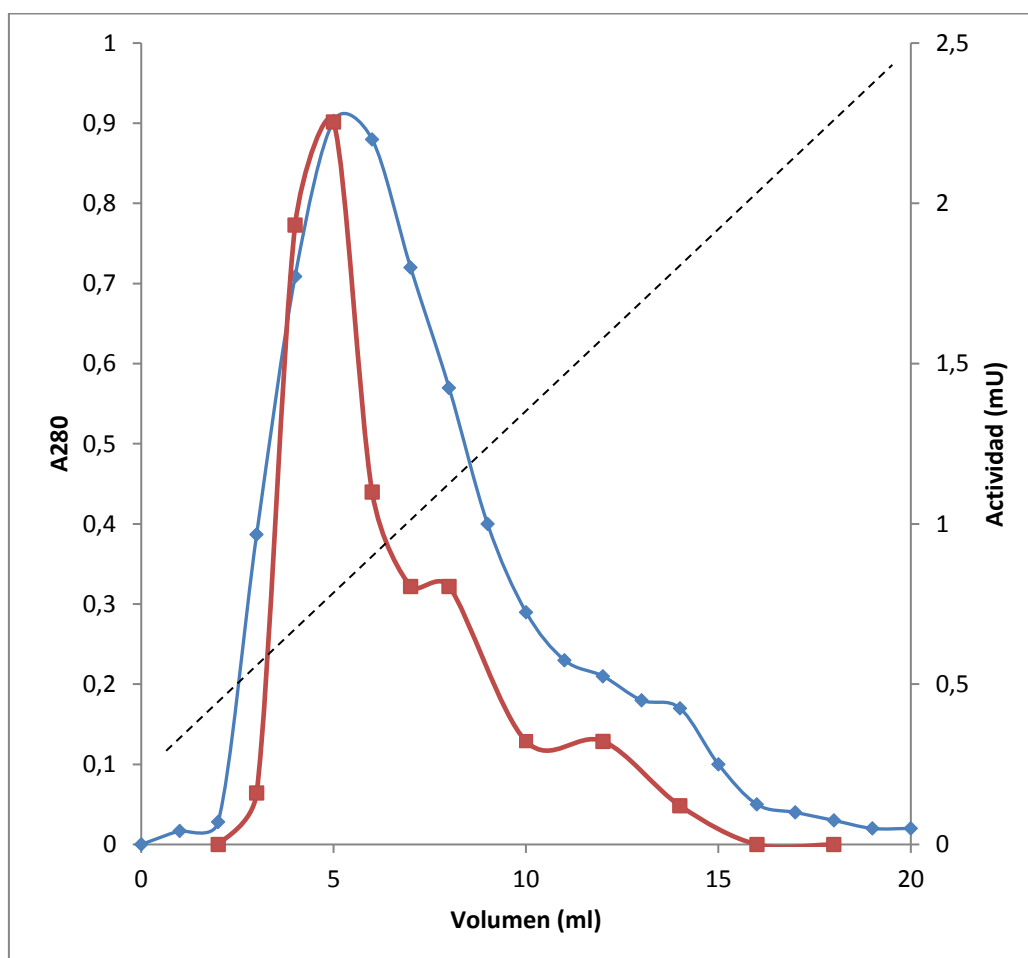


Figura 5: Cromatograma de la cromatografía de la muestra DEAE en UNO-Q. La línea azul muestra el perfil de elución de proteína en base a la A280. La línea naranja muestra la actividad tiorredoxina peroxidasa. La línea punteada representa la fase de aplicación del gradiente de NaCl.

La cromatografía en UNO-Q no resultó lo suficientemente resolutive que se esperaba pues la actividad TPX eluyó en un pico asimétrico con una extendida “cola de novia”. Se recolectaron las fracciones que presentaron mayor actividad TPX (volumen de elución 4-9 ml) conformando la muestra UNO-Q, cuya concentración de proteína y actividad TPX se expresan en la **Tabla 1**.

Seguidamente se realizó una purificación en función del tamaño de las proteínas mediante una cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6 (Pharmacia), diseñada para su uso en sistema FPLC y que tiene un rango de exclusión de proteínas de tamaño entre 5×10^3 a 5×10^6 Daltons. En las cromatografías de exclusión molecular, la retención ejercida se debe al tamaño de los poros de la matriz. Las moléculas más pequeñas permanecen más retenidas porque penetran dentro de los poros, mientras que las moléculas grandes no quedan retenidas y salen antes. La limitación de este tipo de cromatografía estriba fundamentalmente en el volumen de muestra aplicada, que no debería exceder el 1% del tamaño de la columna, con el fin de obtener una óptima resolución. Por este motivo se concentró la muestra UNO-Q mediante dispositivos de ultrafiltración por centrifugación. Una vez reducido el volumen de la muestra, se aplicó a la columna y seguidamente se aplicó un flujo de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, de 0,2 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml a las que se analizó el contenido en proteína y la actividad TPX. El cromatograma resultante se muestra en la **Figura 6**.

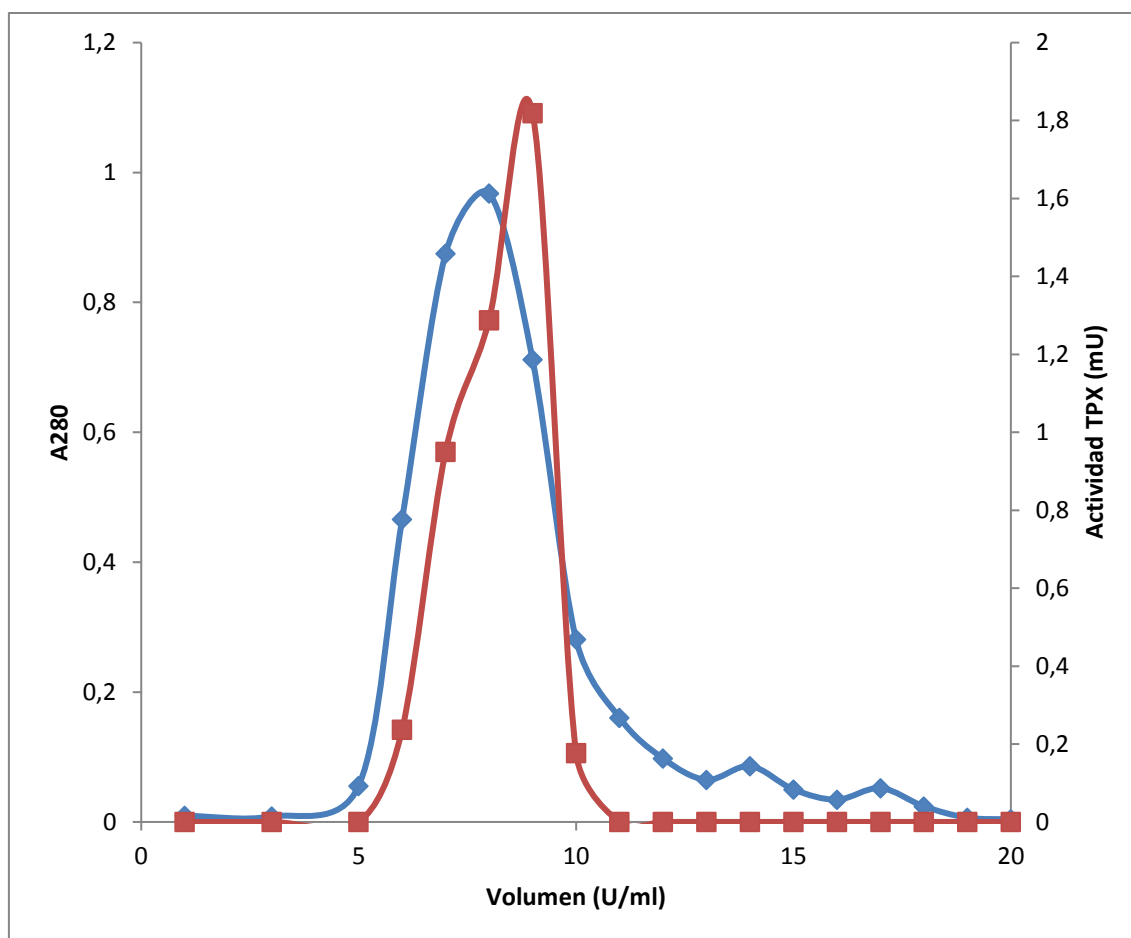


Figura 6: Cromatograma de la cromatografía de la muestra UNO-Q en Superose 6. La línea azul muestra el perfil de elución de proteína en base a la A280. La línea naranja muestra la actividad tiorredoxina peroxidasa.

El cromatograma muestra un pico de actividad TPX relativamente simétrico ligeramente desplazado a un gran pico de proteína, por lo que no se percibe una buena separación de las peroxirredoxinas del resto de las proteínas contaminantes de la muestra. Se recolectaron las fracciones correspondientes al máximo de actividad, que conformó la muestra Superose, cuya composición en concentración de proteína y actividad se muestran en la **Tabla 1**. La cantidad total de actividad TPX de la muestra resultante fue tan escasa que se desestimó seguir con nuevos pasos de purificación. El balance global de la purificación se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Balance de purificación de la actividad tiorredoxina peroxidasa de levadura.

	Volumen (ml)	[Prot.] (mg/ml)	Actividad enzimática (mU/ml)	Actividad Total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	R (%)	E
ELC	30	8,01	83,5	2505	10,4	100	1
DEAE	11	1,3	70	770	53,8	31	5,2
UNO-Q	5	1,4	114	570	81,4	23	7,8
Superose	2	1.4	114	228	81,4	9	7,9

R: Rendimiento, porcentaje de actividad total de la muestra resultante de la purificación con respecto a la muestra original. E: Enriquecimiento, número de veces que es más pura en actividad TPX con respecto a la muestra original y se calcula como el cociente entre la actividad específica de la muestra resultante y el de la muestra original.

Los pasos de purificación realizados con las cromatografías de intercambio iónico supuso un avance en el proceso de purificación en tanto se logró incrementar el grado de purificación, si bien supuso una pérdida de más del 70% de la actividad total. La pérdida de la actividad puede ser atribuida a la diversidad de isoenzimas peroxirredoxinas que tiene la levadura, como se indica en la introducción. Por eso, la actividad enzimática TPX difícilmente se puede aglutinar en un solo pico cromatográfico de actividad. De hecho en la primera cromatografía de intercambio iónico (DEAE) se advierte una dispersión de la actividad TPX durante el proceso de lavado. La cromatografía de exclusión molecular no resultó satisfactoria para el proceso de purificación pues no supuso

prácticamente ningún grado de enriquecimiento con respecto a la muestra precedente, mientras que supuso una pérdida de actividad total de enzima, llegándose prácticamente a la extenuación de la actividad. Esto parece indicar que las peroxirredoxinas no resisten un prolongado proceso de purificación y se inactivan con el tiempo.

Se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para analizar el contenido en proteínas de las muestras implicadas en la purificación. El resultado de la electroforesis se muestra en la **Figura 7**.

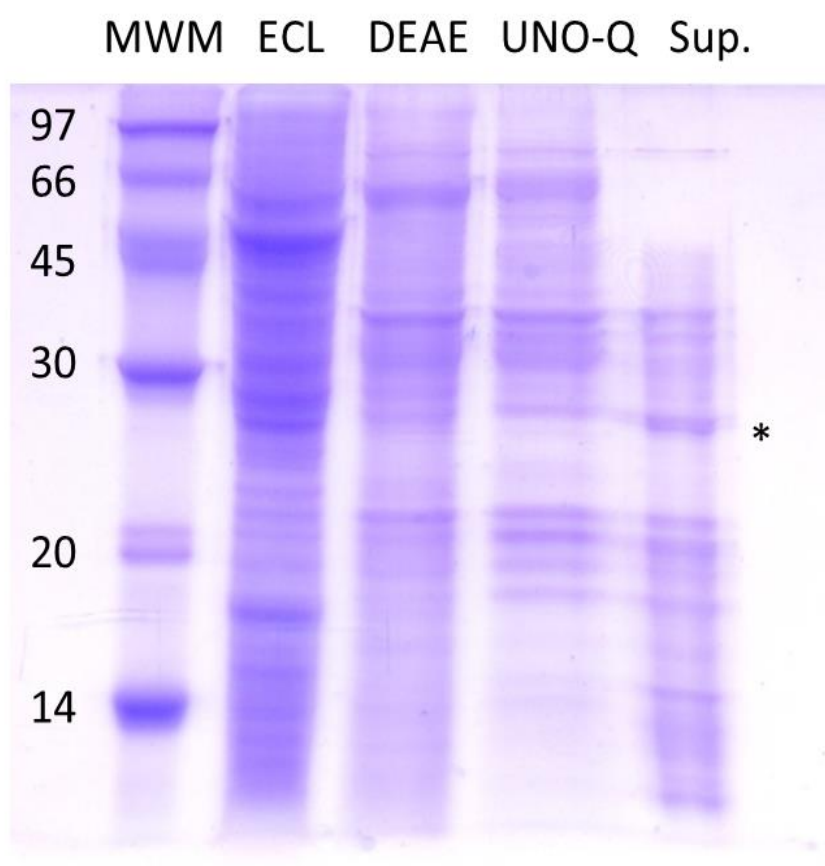


Figura 7: SDS-PAGE de las muestras implicadas en la purificación. MWM: Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (kDa) se indica al lado de cada banda (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare)

En la electroforesis se apreciaba una disminución en el número de bandas de proteína en las sucesivas muestras purificadas. En la muestra final (Superosa) se observa la desaparición de proteínas de alto peso molecular, acorde con la función de este tipo de cromatografía de separar a las proteínas en función de su tamaño. Sin embargo, se observa un reguero de bandas de bajo peso molecular que no se observan en la muestra precedente (UNO-Q), lo que parece indicar que las proteínas de esta muestra se están degradando, lo que corrobora la acusada pérdida de actividad TPX resultante de este paso de purificación. Por otro lado, se puede observar una destacada banda de proteína (*) de tamaño en torno a 27 kDa que pudiera corresponder con la peroxirredoxina mitocondrial de levadura (Pedrajas et al., 2016).

6. CONCLUSIÓN.

Anteriormente a la purificación se realizaron una serie de ensayos enzimáticos empleando como muestra el ELC, para la determinación de actividad peroxidasa dependiente de tiorredoxina en muestras complejas de proteínas. El método diseñado era efectivo para poder detectar dicha actividad peroxidasa.

Es posible que sea la cromatografía la que establezca la validez del proceso total de purificación, en nuestro caso las cromatografías de intercambio iónico supuso un avance en el proceso de purificación con el que se logró incrementar el grado de purificación.

El otro método de purificación, la cromatografía de exclusión molecular no resultó tan satisfactorio para el proceso de purificación, no admitió prácticamente ningún grado de enriquecimiento con respecto a la muestra precedente.

Hay estudios semejantes a los que nosotros hemos elaborado, como en la revista *Analytical Biochemistry*. La purificación de proteína que denominamos Ahp1, mediante los métodos cromatográficos de intercambio iónico llevadas a cabo, fueron un gran progreso para poder detectar dicha proteína. Donde la actividad de la peroxidasa ensayada era dependiente del H_2O_2 y NADPH en

presencia de Trx y TR en ambas cromatografías de intercambio iónico y se eluyen con un amplio pico

Otro estudio de la revista *The journal of Biological Chemistry* purifica la proteína denominada Tsa 1p que emplean también similares métodos que en nuestro trabajo. Pero el ensayo es diferente, este ensayo de la glutamina sintetasa (GS) consiste en que la GS se fragmenta con el H_2O_2 y la inactiva, por lo que vemos que es un método indirecto, nosotros lo que hemos aplicado es un método directo donde las enzimas apropiadas de la Prx le transmiten los electrones y lo que medimos es el consumo directo de NADPH, debido a la actividad tiorredoxina peroxidasa.

Con los datos obtenidos, posiblemente en nuestra muestra exista la presencia de pequeñas cantidades de isoenzimas neutras que contiene la levadura. La purificación no ha salido conforme lo esperado, ya que nosotros hemos empezado el punto de partida con una cantidad relativamente pequeña, pero en nuestro caso al emplear un método directo, las células que empleamos se van gastando poco a poco al intentar hacer más ensayos de purificación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 180:248-257.
2. Cha MK, Choi YS, Hong SK, Kim WC, No KT, Kim IH (2003). Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 278:24636-24643.
3. Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem.* 269:27670-27678.
4. Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422:442-446.
5. Geiszt M, Leto TL (2004) The Nox family of NAD (P) H oxidases: Host defense and beyond. *J Biol Chem.* 279:51718.
6. Heber U (2002) Irrungen, wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth.* 73:223-231.
7. Izawa S, Kuroki N, Inoue Y (2004). Nuclear thioredoxin peroxidase Dot5 in *Saccharomyces cerevisiae*: roles in oxidative stress response

and disruption of telomeric silencing. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64:120-4.

8. Jeong JS, Kwon SJ, Kang SW, Rhee SG, Kim K (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (Type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*.38:776-783.
9. Karplus PA (2015) A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radic Biol Med*. 80:183-190
10. Lian FM, Yu J, Xiao- Xiao M, Yu XJ, Chen Y, Zhou CZ (2012) Structural snapshots of yeast alkyl hydroperoxide reductase Ahp 1 peroxiredoxin reveal a novel two-cysteine mechanism of electron transfer to eliminate reactive oxygen species. *J Biol Physiol*. 104:1333-1339
11. Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*.49:249-279
12. Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN (2017). A comprehensive review of function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem*. 6:308. doi: 10.4172/2161-1009.10000308.
13. Pedrajas JR, Gvilanes F, López-Barea J, Peinado J (1998) Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem Biol Interact*. 116:1-17.

14. Pedrajas JR, McDonagh B, Hernández-Torres F, Miranda-Vizuet A, González-Ojeda R, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Bárcena JA (2016) Glutathione is the resolving thiol for thioredoxin peroxidase activity of 1-Cys peroxiredoxin without being consumed during the catalytic cycle. *Antioxid Redox Signal*. 24:115-128.
15. Pedrajas JR, Padilla CA, McDonagh B, Bárcena JA (2010) Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-CYS peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antioxid Redox Signal*. 13:249-258.
16. Radi R (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101: 4003-4008.
17. Rouhrt N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002a) Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett*. 511:145-149.
18. Sies H (1986) Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew Chemie Int Ed English*. 25:1058-1071.
19. Soito L, Williamson C, Knutson ST, Fetrow JS, Poole LB, Nelson KJ (2011) PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* 39:D332-D337.
20. Veal EA, Day AM, Morgan BA (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell*. 26:1-14.

21. Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49:249-279
22. Dietz KJ (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 93-107.