



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SOBREEXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
TIORREDOXINA TIPO *m* DE MANGO (*Mangifera indica*)**

Por:

Leonardo Yame Fox Uribe

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO. SONORA

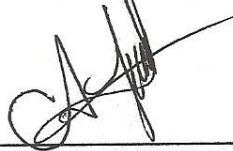
JULIO DEL 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Leonardo Yame Fox Uribe, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



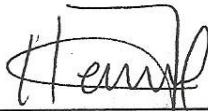
DRA. MARÍA AUXILIADORA ISLAS OSUNA
Director de Tesis



DRA. CARMEN ARMINDA CONTRERAS VERGARA
Asesor



M.C. KARINA DALILA GARCIA OROZCO
Asesor

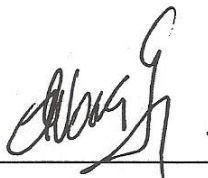


M.C. EMMANUEL AISPURO HERNÁNDEZ
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el posgrado de Maestría en Ciencias, sin la cual no hubiera sido posible llevar a cabo el proyecto de investigación.

También agradezco a la institución del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), así como a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal por abrirme las puertas y permitirme emprender el apasionante viaje de la ciencia y la investigación, con el compromiso de la búsqueda de la verdad ante todo.

Le doy las gracias al proyecto de investigación avalado por CONACyT #CB2012-01-178296, el cual fue otorgado a la Dra. María A. Islas Osuna, permitiendo así realizar y finalizar el posgrado de Maestría en Ciencias.

Quiero externar mi más sincero aprecio y agradecimiento a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna; así como a todo su equipo de trabajo en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas – Dra. Carmen Contreras, M.C. Mitzuko Dautt, cDr. Magda Pacheco, Q.B.C. Ignacio Valenzuela, Biol. Lucía Angulo – por todo su apoyo, paciencia, y comprensión durante estos dos años de posgrado; los cuales han sido arduos, intensos y emocionantes, constituyendo un reto personal e intelectual. He de expresar mi gratitud al M.C. Emmanuel Aispuro por toda su ayuda, consejos y sugerencias durante la presente investigación. Así como a la M. C. Karina García por su guía, recomendaciones y contrastes, esenciales para llevar a cabo la investigación científica. Un especial agradecimiento al Dr. Rogerio Sotelo por su invaluable consejo científico y personal.

DEDICATORIA

A YAHWEH Mi Dios

En Jesucristo

A Mis Padres Leonardo Fox Meléndrez y Evelín Uribe Araujo.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
a. Tiorredoxina.....	3
i. Función.....	3
ii. Clasificación (Superfamilia Tiorredoxina).....	4
iii. Estructura.....	5
iv. Mecanismo de regeneración de TRX por TrxR.....	6
v. Distribución en los Seres Vivos.....	7
b. Tiorredoxinas de cloroplasto.....	10
i. Tiorredoxinas <i>f</i> y <i>m</i>	10
ii. Sistema Ferredoxina/Tiorredoxina Reductasa (FTR).....	11
III. HIPÓTESIS.....	15
IV. OBJETIVOS.....	15
a. Objetivo General.....	15
b. Objetivos Específicos.....	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
a. Subclonación de MiTRX <i>m</i> en Vector de Sobreexpresión.....	16
b. Sobreexpresión de la Proteína (MiTRX <i>m</i>).....	17
c. Obtención de Cuerpos de Inclusión.....	19
d. Purificación de la Proteína Recombinante.....	20
e. Ensayo de Reducción de Disulfuros de la Insulina	21
f. Ensayo de Termoestabilidad.....	22
g. Modelación de la Estructura 3D de MiTRX <i>m</i>	22
h. Análisis Estadístico (Medias de Actividad Específica).....	22

CONTENIDO (continuación)

VI.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	23
	a. Sobreexpresión de la MiTRX m Recombinante.....	23
	b. Replegamiento de MiTRX m	25
	c. Separación y Purificación de MiTRX m	26
	d. Ensayo de Actividad de Reducción de la Insulina.....	28
	e. Termoestabilidad de MiTRX m	29
	f. Modelo Estructural de MiTRX m	31
VII.	CONCLUSIONES.....	35
VIII.	REFERENCIAS.....	37

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

❖ Figura. 1.- Estructura típica de una tiorredoxina.....	5
❖ Figura. 2.- Mecanismo de acción de las tiorredoxinas.....	5
❖ Figura. 3.- Localización de tiorredoxinas en la célula vegetal	7
❖ Figura. 4.- Mecanismo de acción del sistema Fdx/Trx-FTR dependiente de luz.....	12
❖ Figura. 5.- Secuencia nucleotídica codificante para la proteína deducida MiTRX <i>m</i>	16
❖ Figura. 6.- Secuencia nucleotídica de MiTRX <i>m</i> optimizada para <i>E. coli</i>	17
❖ Figura. 7.- Sobreexpresión de MiTRX <i>m</i> en un sistema heterólogo	19
❖ Figura. 8.- Ensayo de Actividad de MiTRX <i>m</i> sobre la insulina.....	21
❖ Figura. 9.- Análisis Electroforético SDS-PAGE 15% – MiTRX <i>m</i>	24
❖ Figura. 10.- Análisis Electroforético SDS-PAGE 15% – Control negativo de la sobreexpresión de MiTRX <i>m</i>	24
❖ Figura. 11.- Análisis SDS-PAGE y Ensayo de Actividad Reductora de la MiTRX <i>m</i> replegada en un Extracto Crudo	26
❖ Figura. 12.- Cromatograma de separación y purificación de MiTRX <i>m</i> por cromatografía IMAC	27
❖ Figura. 13.- MiTRX <i>m</i> purificada y separada por cromatografía IMAC – Tinción Plata	27
❖ Figura. 14.- Termoestabilidad de MiTRX <i>m</i>	29
❖ Figura. 15.- Termoestabilidad – Tratamiento Hidrotérmico de MiTRX <i>m</i>	30
❖ Figura. 16.- Modelo de la estructura 3D de MiTRX <i>m</i>	31
❖ Figura. 17.- Modelo estructural de SsTRXA1 vs MiTRX <i>m</i>	33
❖ Tabla. 1.- Actividad Específica de MiTRX <i>m</i> vs diversas TRX	28

RESUMEN

La tiorredoxina (TRX) es una proteína de 12 kDa perteneciente al sistema REDOX, que entre otras funciones participa en la regulación de proteínas del mecanismo fotosintético del cloroplasto, como NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH). En el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas de CIAD, se clonó el cDNA que codifica para una tiorredoxina tipo *m* (MiTRX*m*) de cloroplasto de mango. Por lo que el objetivo del presente estudio consistió en caracterizar bioquímicamente a dicha proteína, ya que el conocer sus características contribuirá a entender su repercusión e implicaciones en el mecanismo fisiológico del fruto. Debido a que es más factible obtener la proteína por medio de sobreexpresión en un sistema heterólogo, que purificarla del organelo, se utilizó la estrategia de obtenerla en su forma recombinante. Se diseñó un gen sintético en un vector de expresión procarionte con la secuencia codificante para MiTRX*m*, la cual se optimizó para su expresión en *E. coli*. El plásmido fue transformado en bacterias *E. coli* BL21 y la proteína de interés se obtuvo en cuerpos de inclusión. La proteína fue solubilizada con urea, replegada mediante diálisis para posteriormente purificada por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC). Se evaluó su actividad reductora de disulfuros y su termoestabilidad. La proteína es funcional y estable al calor, dado que fue capaz de reducir a la insulina en un ensayo *in vitro*, incluso después de ser incubada hasta los 85°C. Además, al incubar ésta proteína a 46.1°C durante 100 min mantuvo su actividad reductora. La estabilidad térmica de la MiTRX*m* se puede explicar por su estructura compacta y globular como se muestra en el modelo de estructura tridimensional.

Palabras clave: *Mangifera indica*, tiorredoxina, sistema REDOX, termoestabilidad, modelación molecular, sobreexpresión

ABSTRACT

Thioredoxin is a small 12 kDa protein that belongs to the REDOX system and participates in reduction of many proteins from the chloroplast photosynthetic mechanism, among other functions. A cDNA that codes for a thioredoxin type *m* from mango fruit was overexpressed in a heterologous system in order to obtain a recombinant protein, since it is difficult to obtain mg of this protein directly from its original source. The coding sequence for the chloroplast TRX*m* was optimized for its expression on an *E. coli* strain and it was obtained as a synthetic gene on a prokaryote expression vector. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21 strain and the protein of interest was obtained as inclusion bodies and solubilized with urea. The protein was refolded by dialysis and purified by an Immobilized Ion Affinity Chromatography (IMAC). The purified thioredoxin reduced insulin in an *in vitro* assay. Among some of the biochemical properties of TRX*m* from chloroplast of mango, the protein is thermally stable because it was able to reduce insulin at 85°C and when incubated at 46.1°C during 100 min it retained its activity. The TRX*m* thermal stability can be explained by its compact tridimensional structure, as revealed by the model obtained.

Key-words: *Mangifera indica*, thioredoxin, REDOX system, thermostability, molecular modeling, overexpression

I - INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotosintéticos que llevan a cabo múltiples y diversas funciones fisiológicas durante su desarrollo. Para ello es necesario que las células vegetales y sus organelos realicen una gran cantidad de procesos y reacciones bioquímicas, las cuales se encuentran reguladas a distintos niveles. El sistema REDOX de la célula es esencial para el correcto funcionamiento de los cloroplastos, donde se encuentran reguladas (activación/represión) distintas proteínas y vías metabólicas relacionadas a fotosíntesis y asimilación de CO₂ (Cui-Jun y Guo, 2012; Chi, 2013). Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas de aproximadamente 12 kDa esenciales en el mantenimiento del estado REDOX de la célula (Holmgren, 1985; Meyer *et al.*, 2009). Estas contienen el dominio CXXC, donde las cisteínas son clave para su capacidad de reducir a otras proteínas (Holmgren, 1985). De esta manera la tiorredoxina participa en la regulación de la homeostasis celular, al actuar sobre los puentes disulfuro de las proteínas (Holmgren, 1985; Buchanan, 1991; Pillay *et al.*, 2011). Sin embargo, esta proteína requiere de la tiorredoxina reductasa para ser reducida nuevamente (Schürmann y Buchanan, 2008; Tovar-Méndez *et al.*, 2011).

Las tiorredoxinas de distintos organismos como arqueas, bacterias, plantas y animales, comparten una estructura terciaria y sitio activo conservado, lo cual les permite agruparse en una gran superfamilia (Ahsan *et al.*, 2009; Balsera *et al.*, 2010). Estas proteínas oxidorreductoras llegan a desempeñar diversas funciones dependiendo de su localización celular (Oliviera *et al.*, 2010; Buchanan *et al.*, 2012). En las células vegetales se clasifican según el organelo al que pertenezcan (Viera y Rey, 2006), dentro del cloroplasto existen dos tipos principalmente, *f* y *m* (Lemaire *et al.*, 2007; Vener *et al.*, 2008) las cuales se

encargan del mantenimiento de un estado reducido al interior del organelo (Dai *et al.*, 2000; Michelet *et al.*, 2005). Por lo que conocer las características de la tiorredoxina cloroplástica permitirá determinar de una manera más precisa su función como uno de los componentes celulares que participan en los procesos redox de las planta.

II - ANTECEDENTES

a. Tiorredoxina

En todos los organismos vivos existe una amplia gama de funciones biológicas y reacciones químicas (Arnér y Holmgren, 2000), con una regulación específica muy fina que permite el desempeño correcto de las células y del individuo (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). El estado REDOX de la célula es esencial para su desarrollo, división, proliferación y diferenciación, si el estado REDOX se altera, repercute negativamente en todos los procesos biológicos de la célula (Holmgren, 1979; Wong *et al.*, 2004). La TRX realiza una función muy importante dentro del sistema REDOX, el cual incluye a otras proteínas como ferredoxinas, glutarredoxinas y glutatión-S-transferasa (Pfalz *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2013) que también influyen en la homeostasis celular (Fenández *et al.*, 2012).

i. Función

La función principal de las TRX es ser sulforreductoras, es decir convertir los enlaces disulfuros en cisteínas reducidas (Meyer *et al.*, 2009). Al reducir las proteínas blanco, el enlace tiol cambia de un estado reducido a un estado oxidado, por lo que la tiorredoxina pierde su capacidad como agente reductor (Mustacich y Powis, 2000). Es debido a lo anterior que se necesita de una enzima capaz de restituir el estado reducido de la proteína y llevar a cabo nuevamente su función reductora (Laloi *et al.*, 2001). Esta acción la realiza la enzima Tiorredoxina Reductasa (TrxR), la cual presenta un sitio activo redox

disulfuro/ditiol capaz de romper los puentes disulfuro de la tiorredoxina (Arnér y Holmgren, 2000).

ii. Clasificación (Superfamilia Tiorredoxina)

Esta superfamilia agrupa a distintas proteínas oxidorreductoras, las cuales pueden llegar a presentar ciertas diferencias secuenciales y estructurales (Holmgren *et al.*, 1975; Jacquot *et al.*, 1997; Tang y Altman, 2011). Lo que caracteriza a dicha superfamilia es la secuencia de residuos conservada CXXC (donde X es cualquier aminoácido), la cual se conoce como 'dominio' tiorredoxina (Holmgren, 1985). Otra característica consiste en el plegamiento estructural que contiene al dominio conservado llamado "plegamiento tipo tiorredoxina" formado por láminas beta al centro rodeado por hélices alfa (Stehr *et al.*, 2001).

Se ha descrito que el tipo y características de las tiorredoxinas varía según el organelo celular donde se encuentren, así como el organismo al que pertenezcan (Holmgren, 1985; Dietz, 2008). Aunque en algunas de estas proteínas pueden existir variaciones tanto en secuencia aminoacídica como estructura secundaria; la función REDOX y la estructura terciaria se conservan (Buchanan, 1991; Eklund *et al.*, 1991; Buchanan *et al.*, 2012). Sin embargo, los sustratos sobre los cuales puede actuar cada proteína son diversos (Casagrande *et al.*, 2002).

En las células eucariotas existen distintos tipos de estas proteínas, por lo que las que se encuentran en organismos vegetales no se presentan en animales (Pfannschmidt, 2010; Buchanan, *et al.*, 2012). Dicha variación se extiende a los organelos, donde cada compartimiento celular tiene tiorredoxinas específicas (Aguado-Llera *et al.*, 2011). Es por ello que en los cloroplastos se encuentran tiorredoxinas particulares (Hüner *et al.*, 2012), como las del tipo *f* y *m* (Viera y Rey, 2006; Lemaire *et al.*, 2007).

iii. Estructura

La capacidad de regulación de la TRX se debe a que su sitio activo conservado está formado por residuos de Trp, Cys, (Gly-Ala), Pro y Cys (Holmgren *et al.*, 1985; Arvizu *et al.*, 2012). En este dominio se localiza el enlace ditiol (Holmgren, 1979), el cual es un grupo muy reactivo (Buchanan, 1991), por lo que la proteína es capaz de donar fácilmente electrones a una proteína oxidada (Aguado-Llera *et al.*, 2011).

Estudios de cristalografía de rayos-X han permitido dilucidar la estructura de tiorredoxinas en *Escherichia coli* (Katti *et al.*, 1990) y espinaca (*Spinacia oleracea*) (Capitani *et al.*, 2000), así como los llevados a cabo en tiorredoxinas del camarón blanco (*Litopenaus vannamei*) (Aispuro-Hernández *et al.*, 2008; Campos-Acevedo *et al.*, 2013). Estos estudios facilitaron el análisis de las propiedades biofísicas y termoestables de éstas proteínas, así como la descripción de su conformación estructural; la cual se encuentra estrechamente relacionada a la termoestabilidad de la proteína. Una estructura típica de tiorredoxina se compone de una secuencia aminoacídica que incluye los extremos carboxilo y amino terminal, junto con hélices α al exterior y láminas β al interior (Fig. 1).

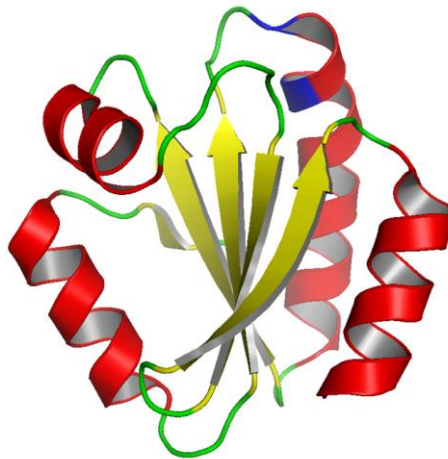


Fig. 1.- Estructura típica de una tiorredoxina.

Se observan 4 hélices alfa (rojo) y 5 láminas beta (amarillo). El sitio activo con las cisteínas en forma reducida se muestra en azul. Tomado de: Campos-Acevedo *et al.*, 2013 (PDB: 4AJ6).

iv. Mecanismo de regeneración de TRX por TrxR

El complejo enzimático encargado de devolver las tiorredoxinas de un estado oxidado a un estado reducido es la Tiorredoxina-reductasa (TrxR) (Mustacich y Powis, 2000; Pillay *et al.*, 2011). Esta enzima realiza la catálisis de la reacción en su sitio activo conocido como dominio TRX (Dai *et al.*, 1996), activándose por medio de la unión con Ferredoxina (proteína esencial para el transporte de electrones) en tiorredoxinas cloroplásticas (Fig. 2) (Arvizu *et al.*, 2012).

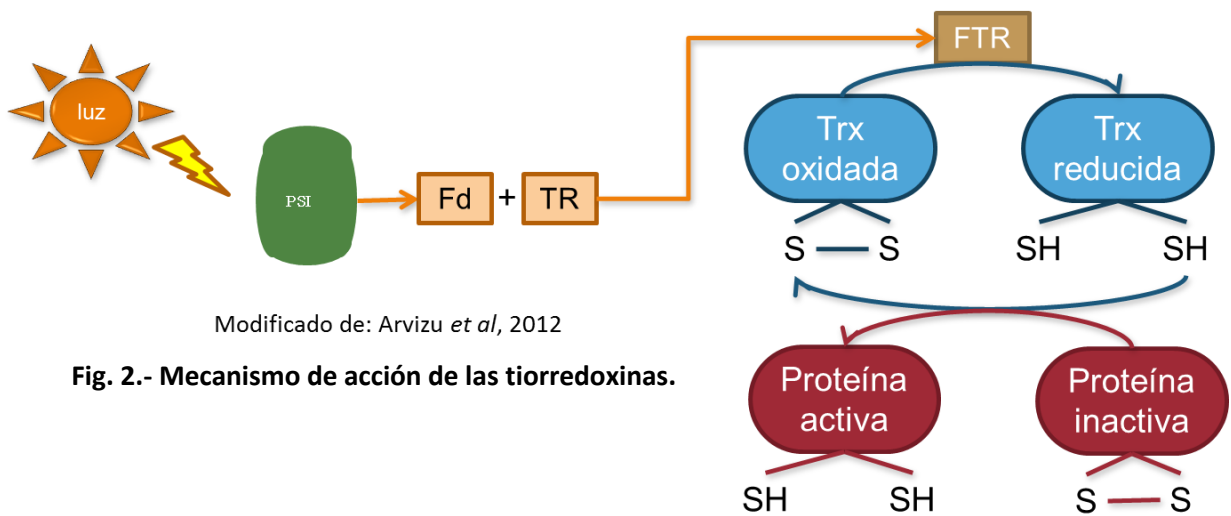


Fig. 2.- Mecanismo de acción de las tiorredoxinas.

Las enzimas tipo TrxR se clasifican en dos grandes grupos según el peso molecular de las subunidades que las conforman: de alto peso molecular (HMW TrxRs) y bajo peso molecular (LMW TrxRs) (Akif *et al.*, 2005). Dichas enzimas son capaces de reducir diversos sustratos (Mustacich y Powis, 2000) tales como: ácido lipoico (Arnér *et al.*, 1996), lípidos hidroperóxidos (Holmgren y Björnstedt, 1995) y péptidos citotóxicos (Andersson *et al.*, 1996). Sin embargo, no se han dilucidado todos los mecanismos fisiológicos en los que intervienen (Mustacich y Powis, 2000). Estas características le confieren a las TrxRs la versatilidad de presentarse en distintos tipos de organelos, células y organismos (Kuriyan *et al.*, 1991).

v. Distribución en los Seres Vivos

El descubrimiento de la presencia de las tiorredoxinas en las células ha permitido desarrollar un 'mapa' celular que indica su localización (Viera y Rey, 2006). El conocer en qué organelo específico se encuentran ha proporcionado el conocimiento base para la comprensión de la función primordial de cada tiorredoxina, ya no solo por su tipo sino también por su localización celular (Arnér y Holmgren, 2000).

Aunque en todos los seres vivos se encuentran tiorredoxinas, no están distribuidas de igual manera o uniformemente. Es por ello que la presencia de tiorredoxinas en un organismo puede llegar a variar tanto por el tipo de célula en la que se encuentren como por su localización al interior de la misma (Jacquot *et al.*, 1997). Es debido a lo anterior que la función secundaria que pudiesen tener algunas tiorredoxinas, dependerá en gran medida de su localización celular (Eklund *et al.*, 1991). De esta forma las tiorredoxinas vegetales se han clasificado con base en el organelo celular donde se presenten (Fig. 3)

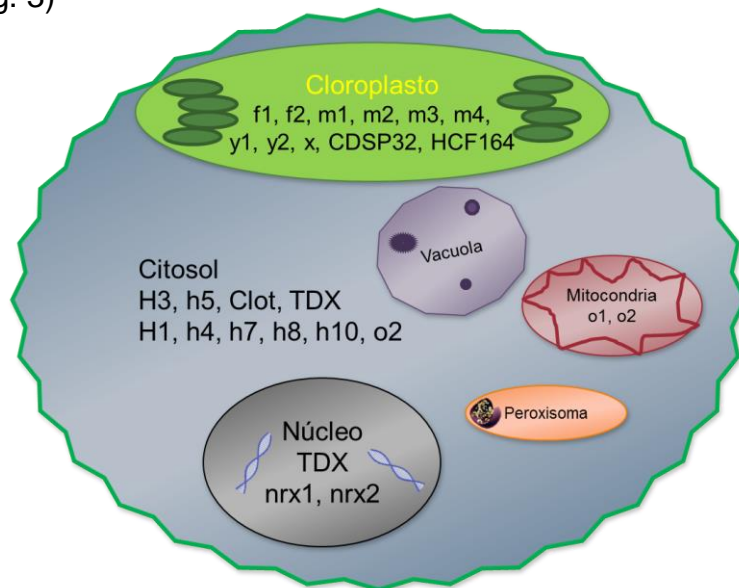


Fig. 3.- Localización de tiorredoxinas en la célula vegetal.

Modificado de: Viera y Rey 2006.

1. Microorganismos

Las tioredoxinas no solo desempeñan un control del estado REDOX en la célula (Dai *et al.*, 2000; Michelet *et al.*, 2005), sino que también son eficientes para realizar otras funciones secundarias de diversa índole (Buchanan *et al.*, 2002; Viera y Rey, 2006). Una función adicional de las tioredoxinas es la asistencia en el plegamiento de las proteínas en estructuras macromoleculares (chaperonas). Dicha función se describió en un inicio en células de bacterias de *E. coli* (Kern *et al.*, 2003). Sin embargo, esta función no se restringe solamente a los microorganismos, ya que en estudios recientes se ha descrito que un mecanismo similar sucede en células vegetales, como lo demostraron Hund *et al.* (2008) en plantas de arroz y Sanz-Barrio *et al.* (2011) en plantas de tabaco.

2. Mamíferos

Otra de las funciones descritas por Sakamoto *et al.* (2008), es la importación de proteínas citosólicas a un organelo, como sucede en las mitocondrias de células animales (Schürmann y Jacquot, 2000). También se ha estudiado que dicho mecanismo se presenta en las mitocondrias de las células vegetales (Balsera *et al.*, 2010). Esto ha permitido que se desarrollen “mecanismos modelo” posibles para otros organelos como el núcleo y el cloroplasto (Stengel *et al.*, 2010).

En los avances del estudio de las tioredoxinas, se han encontrado diversas acciones en células humanas como: la activación de rutas metabólicas durante desarrollo fetal y en la respuesta inmunológica favorable de un individuo ante una infección (Gromer *et al.*, 2004). El alcance e impacto de estas funciones aún no se han delimitado del todo, por lo que las investigaciones actuales continúan trabajando en estos temas.

3. Vegetales

Hace algunos años se 'pensaba' que las TRX sólo podían desempeñar una función REDOX; sin embargo, se ha propuesto que también participan en la señalización celular (Dai *et al.*, 2000). Al fungir como moléculas de señalización, permiten que la célula y sus organelos sean capaces de realizar una respuesta apropiada ante los factores externos, ya sean éstos bióticos o abióticos (Balsera *et al.*, 2010). Ambas características le confieren a la célula vegetal la capacidad de responder favorablemente ante un factor de estrés oxidativo (Hand y Hardewig, 1996), como la radiación UV, presencia de radicales libres, falta de agua y/o humedad, entre otros (Viera y Rey, 2006; Reott *et al.*, 2009).

La gran mayoría de las TRX cumplen una función reguladora del estado REDOX en las proteínas; algunas, destacan por su impacto fisiológico, por ejemplo las del cloroplasto (Buchanan *et al.*, 2012). Este organelo es esencial para el desarrollo y subsistencia de la célula vegetal (Meyer *et al.*, 2012), por lo que es necesario mantener el equilibrio del estado REDOX al interior del mismo (Buchanan *et al.*, 2012). Las principales TRX's de este organelo se clasifican en dos tipos: *f* y *m*. Su activación depende del tipo de estrés al que esté sometida la célula (Ungerstedt *et al.*, 2004) así como los distintos mecanismos reguladores de la transcripción (Barajas-López *et al.*, 2010). Las del tipo tipo *f* son las primeras en activarse a causa de un estrés oxidativo, mientras que las *m* se activan posteriormente, ya sea por estrés oxidativo u otros factores ambientales como calor o sequías. Ambas TRX se activan como un mecanismo de defensa de la planta (Reott *et al.*, 2009; Barajas-López *et al.*, 2010). Cuando las tiorredoxinas cloroplásticas llevan a cabo su función y quedan en un estado oxidado (Holmgren *et al.*, 1986), son reducidas por el sistema Ferredoxina/Tiorredoxina o Fdx/Trx (Holmgren, 1976). Esta reducción mediada por las ferredoxinas (Holmgren, 1977) les permite a las tiorredoxinas ser restituidas a su estado activo.

b - Tiorredoxinas de Cloroplasto

Durante la evolución de los seres vivos, los factores de estrés externos han ejercido una presión evolutiva sobre las células y sus procesos bioquímicos (Buchanan, 1980). Una de las adaptaciones de los vegetales, y en general de organismos fotosintéticos (presentan cloroplastos), es el desarrollo de sistemas de regulación bioquímica complejos y eficientes, como el sistema dependiente de luz “Ferredoxina/tiorredoxina (Fdx/Trx)” (Holmgren *et al.*, 1977). Dicho sistema de regulación específico de cloroplastos, fue definido y estructurado mediante el análisis sistemático de la relación entre las Ferredoxinas y la activación de enzimas dependientes de luz. Lo anterior permitió el descubrimiento de la presencia del sistema Fdx/Trx en cloroplastos y su mecanismo de acción en la regulación de reacciones del sistema REDOX (Buchanan *et al.*, 2002).

i. Tiorredoxinas *f* y *m*

Dentro del grupo de las TRX del cloroplasto se encuentran las tiorredoxinas *m* y *f*, las cuales en *Arabidopsis* (planta modelo) se subdividen en: tiorredoxina *m1*, *m2*, *m3* y *f1*, *f2* (Dangoor *et al.*, 2009; Dietz, 2011). Éstas pueden llegar a presentarse en distintas concentraciones dependiendo de las condiciones externas e internas de la célula, así como el tejido donde se encuentren (Yong-Chun *et al.*, 2009; Gil-Bea *et al.*, 2012).

La tiorredoxina tipo *m* tiene un origen divergente de la *f*. La primera se ha descrito como una proteína semejante a la de bacterias, ya que tanto su estructura y secuencia de aminoácidos es más similar a la TRX de *E. coli*. Por otra parte la tipo *f* se asemeja más a las presentes en células eucariotas. Otra diferencia es que la TRX tipo *m* está codificada en el genoma del núcleo, mientras la *f* en el cloroplasto (Buchanan *et al.*, 2012). El principal campo de

acción de ambas tiorredoxinas es la regulación de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson. Es por esto que tanto la TRX *m* como *f* junto al complejo FTR, forman un mecanismo esencial para el correcto desempeño metabólico del cloroplasto (Buchanan *et al.*, 2012).

ii. Sistema Ferredoxina/Tiorredoxina Reductasa (FTR)

El sistema Fdx/Trx se autorregula por medio de dos etapas esenciales. En un inicio los electrones provenientes de la fotosíntesis, reducen a las ferredoxinas (Fdx fotorreducida). Posteriormente las Fdx reducidas son capaces de interactuar en el complejo enzimático FTR. Una vez activado, el complejo FTR tiene la capacidad de reducir las tiorredoxinas oxidadas (Schürmann y Buchanan, 2008). A este mecanismo de acción se le conoce como la conversión de una señal electrón activado por luz a una señal tiol (Bräutigam *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, una vez que las diversas tiorredoxinas han sido reducidas, interactúan con otras proteínas objetivo (Fig. 4) – enzimas de distintas rutas metabólicas – ya sea incrementando o disminuyendo su actividad (Eslampanah y Shahpiri, 2012). Debido a que el sistema FTR dependiente de luz se encuentra restringido a los cloroplastos, únicamente se presenta cuando existe fotosíntesis oxigénica. La fotosíntesis oxigénica incluye al agua como donadora de un electrón activo (activación del sistema) y liberación de oxígeno como producto final (Pillay *et al.*, 2011).

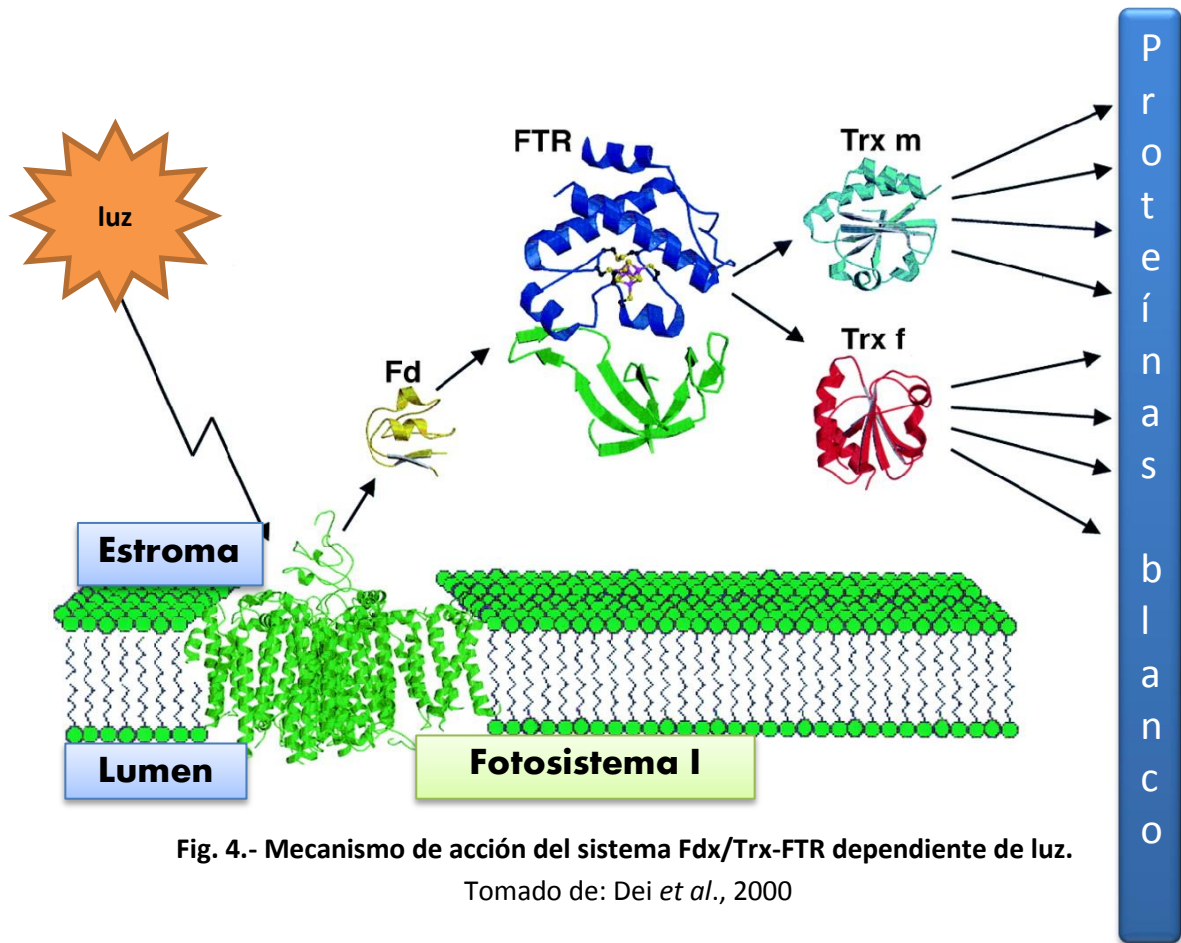


Fig. 4.- Mecanismo de acción del sistema Fdx/Trx-FTR dependiente de luz.

Tomado de: Dei *et al.*, 2000

En las plantas y en los frutos climatéricos como el mango (*Mangifera indica* L.), los mecanismos de señalización del sistema REDOX han ganado gran interés en la investigación científica (Lillig *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013). Lo anterior se debe a que el sistema Fdx/Trx y FTR no solamente se encuentra activo durante la regulación de enzimas fotosintéticas y absorción de CO₂ sino que también influyen en la regulación del flujo de carbono en la célula. El sistema REDOX también participa en la regulación de otros procesos durante el desarrollo del organismo vegetal como germinación, transcripción, traducción, apoptosis y detoxificación (Shcürmann y Jacquot, 2000; Schürmann y Buchanan, 2008).

El sistema Fdx/Trx al ser dependiente de luz les permite a las plantas absorber la energía proveniente del sol. La energía absorbida por la radiación solar es utilizada para llevar a cabo las reacciones de asimilación de carbono y nitrógeno, así como la producción de aminoácidos (Hüner *et al.*, 2012). Dicha energía también se guarda como reservas en forma de azúcares y lípidos, lo que le permitirá a la planta adaptarse a las distintas condiciones ambientales que se presenten (Moyer *et al.*, 2007). Dentro de la célula vegetal la luz solar también desempeña otras funciones en el metabolismo catalizando reacciones bioquímicas y como señalización en la activación o desactivación de enzimas (Singh *et al.*, 2013).

Un claro ejemplo del control que ejerce el sistema Fdx/Trx sobre diversas proteínas por medio de luz solar, es descrito en la investigación llevada a cabo por Leegood y Walker (1980). En dicha investigación se estudiaron los mecanismos de regulación de la enzima Fructosa-1,6-bisfosfatasa por las tiorredoxinas del cloroplasto. De igual forma se ha estudiado cómo otras enzimas son reguladas por el complejo FTR, como Sedoheptulosa 1,7-bisfosfatasa y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, las cuales también son activadas por luz (Schürmann y Buchanan, 2008).

Debido a que el sistema REDOX se encuentra estrictamente regulado, los factores de estrés en la planta como la sequía, el exceso de agua o las altas temperaturas afectan a todas las reacciones óxido-reducción en células vegetales. El sistema REDOX se ve afectado negativamente por la presencia de altas temperaturas, por ejemplo, el tratamiento hidrotérmico aplicado a frutos de mango. Dicho tratamiento cuarentenario es ampliamente utilizado a nivel comercial, ya que el mango es un fruto climatérico con calidad de exportación internacional, susceptible a infecciones como la causada por la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Couey, 1989). Por lo tanto es

necesario someterlo a un tratamiento cuarentenario con el fin de cumplir los requisitos fitosanitarios en los países de importación (Lurie, 1998).

El tratamiento hidrotérmico aplicado a los frutos de mango consiste en sumergirlos en agua caliente a 46.1° C durante un período que va desde una 1 hora hasta 1.5 horas, dependiendo del peso y forma del fruto (Couey, 1989). Dicho tratamiento permite la eliminación efectiva de las larvas de la mosca de la fruta (Yahia, 2006; Jha *et al.*, 2009). Sin embargo, presenta la desventaja de someter a las células a un estrés oxidativo por calor; lo que propicia una serie de reacciones químicas y fisiológicas adversas que pueden resultar en un daño excesivo, al cambiar las características organolépticas (olor, color y sabor) del fruto (Klein y Lurie, 1992).

El estrés oxidativo consiste en el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son producto de las reacciones naturales en la célula vegetal; debido al aumento en la velocidad de las reacciones enzimáticas que dan origen a dichas ROS (Fujita *et al.*, 2006). Las ROS se convierten en tóxicas cuando la célula pierde la capacidad de eliminar su exceso mediante el sistema REDOX, lo que puede llegar a ocasionar una alteración mayor en la homeostasis celular (Apel y Hirt, 2004). Este descontrol propicia una oxidación prematura de la célula, limitando su funcionamiento y viabilidad (Rochaix, 2001). Por lo que cuando el fruto se expone a altas temperaturas por períodos de tiempo muy largos es posible que se deteriore y acelere la senescencia deteriore (Jha *et al.*, 2009). Es por ello que las tiorredoxinas de mango juegan un papel muy importante en el mantenimiento del equilibrio del estado REDOX, contrarrestando los efectos adversos del tratamiento hidrotérmico.

III – HIPÓTESIS

La tiorredoxina cloroplástica de mango (*Mangifera indica* L.) MiTRX m presenta actividad reductora *in vitro* y es estable a altas temperaturas.

IV – OBJETIVOS

a. Objetivo General

Caracterizar una tiorredoxina cloroplástica tipo m (MiTRX m) recombinante de mango (*Mangifera indica* L.)

b. Objetivos Específicos

Obtener la MiTRX m recombinante pura y soluble

Evaluar el efecto de diferentes temperaturas sobre la actividad reductora de la MiTRX m *in vitro*

Modelar la estructura tridimensional de la MiTRX m

V - MATERIALES Y MÉTODOS

El cDNA que codifica para una tioredoxina tipo *m* de mango (*Mangifera indica* L.) fue clonado en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas a cargo de la Dra. María A. Islas Osuna, con el cual se diseñó un gen sintético para llevar a cabo su sobreexpresión en un sistema heterólogo (*E. coli* BL21).

a. Subclonación de MiTRX*m* en Vector de Sobreexpresión

La región codificante de MiTRX*m* (Fig. 5), se utilizó para el diseño de un gen sintético en un vector de sobreexpresión comercial pJExpress 404 (DNA2.0, Menlo Park, CA, USA), el cual consistió en la secuencia nucleotídica de MiTRX*m* más una cola de polihistidinas (10 H) para la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía IMAC.

```
1 M A A V L E C V S V P R A S A S P A L S
1 ATGGCCGCCGTGCTCGAGTGCCTCAGCGTTCCACGTGCTTCGGCTTCTCCGGCTCTTTTCG
21 P S K L S S S S V S S I S A R R R R L P E
61 CCTTCTAAACTTTCGTCCTTCGGTTCTTCGATCTCTGCTCGCCGGAGATTGCCGGAA
41 F K G L K V V P T R S F G L M S H T Q C
121 TTCAAAGGCCTTAAGGTGCTCCGACTCGCTCATTTGGATTGATGAGCCATACTCAGTGT
61 S S L K L G R S G R I V C E A Q E T A V
181 TCGAGCTTGAACCTGGCCGCTCTGGACGAATCGTCTCGGAGGCTCAAGAAACAGCCGTT
81 D V P A V S D S T W Q S L V L E C E L P
241 GATGTCCCTGCAGTCTCTGATTCAACATGGCAATCACTTGTACTGGAATGTGAACTCCCG
101 V L V E F W A P W C G P C R M I H P I I
301 GTTTTGGTTGAATTCTGGGCTCCGTGGTGCGGACCCCTGCCGGATGATCCACCCAATAATT
121 D E L S K Q Y A G K L K C Y K V N T D E
361 GATGAACTTTCGAAACAGTATGCTGGGAAGCTTAAATGCTACAAAGTGAATACTGATGAG
141 S P P I A T R Y G I R S I P T V I I F K
421 AGCCCTCCAATTGCTACACGCTATGGAATTGGGAGCATCCCAACTGTTATAATATTC AAG
161 N G D K K D T I I G A V P K S T L I S S
481 AATGGGGATAAGAAAGATACAATTATTGGTGCTGTTCCCTAAATCCACTTTGATCTCCGAC
181 I E K F L *
541 ATGAGAAATTCTTG TAG
```

Fig. 5.- Secuencia nucleotídica codificante para la proteína deducida MiTRX*m*.
Residuos 1 – 73: Péptido señal, 73 – 185: Proteína. (*) Codón de terminación.

El diseño del gen sintético incluyó la optimización de codones, con el objeto de que la secuencia nucleotídica estuviera más acorde a los codones utilizados por la cepa de sobreexpresión (Fig. 6).

```

1 ATGGGCAGCCACCATCACCACCATCATCATCACCATCACAGCAGCGGCCACCTGGAAGTC
1 M G S H H H H H H H H H S S G H L E V
61 CTGTTTCAAGGTCCGTCCCACGAAGCGCAGGAAACGGCAGTTGACGTCCCGGCAGTCAGC
21 L F Q G P S H E A Q E T A V D V P A V S
121 GACTCGACCTGGCAAAGCCTGGTGCTGGAATGTGAGTTGCCGGTTCTGGTTGAGTTCTGG
41 D S T W Q S L V L E C E L P V L V E F W
181 GCCCTTGGTGCGGTCCGTGTCGTATGATTCACCCAATCATTGACGAGTTGAGCAAACAG
61 A P W C G P C R M I H P I I D E L S K Q
241 TACGCGGGCAAACCTGAAGTGCTATAAGGTTAATACCGATGAGTCTCCGCCGATTGCGACC
81 Y A G K L K C Y K V N T D E S P P I A T
301 CGCTACGGTATCCGTAGCATTCCGACCGTGATCATCTTCAAAAACGGTGATAAGAAAAGAT
101 R Y G I R S I P T V I I F K N G D K K D
361 ACTATCATTGGTGCTGTGCCGAAGTCCACGCTGATTAGCAGCATCGAGAAATTTCTGTGA
121 T I I G A V P K S T L I S S I E K F L *
421 TAA
141 *

```

Fig. 6.- Secuencia nucleotídica de MiTRXm optimizada para *E. coli*.

Se muestra la secuencia junto con la cola de histidinas (10) al extremo amino terminal. (*) Codón de terminación.

b. Sobreexpresión de la Proteína (MiTRXm)

La sobreexpresión de la proteína MiTRXm se realizó en células de *E. coli* cepa BL21 transformadas con el vector de expresión pJ Express 404 conteniendo el inserto de interés. Las células transformadas se cultivaron primero en un preinóculo de 5 mL de medio Luria-Bertani (LB), donde se incubaron a 37 °C durante toda la noche; posteriormente, dicha cantidad de cultivo se utilizó para inocular un cultivo de 100 mL, el cual se creció bajo las mismas condiciones (medio y temperatura). Finalmente, se inoculó un volumen de 1 L en medio LB. Todos los cultivos contenían ampicilina a una concentración de 100 µg/ml como medio de selección para las células transformadas (Rosenberg, 1987; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008).

La sobreexpresión de la MiTRX m se indujo mediante el uso de isopropil-1-tiol- β -D-galactósido (IPTG) a una concentración 1 mM, debido a que el sistema de expresión contiene el represor *lac*, el cual es inactivado por IPTG. La inducción se realizó cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm, correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento bacteriano (De-La-Re-Vega, 2004). El crecimiento bacteriano se siguió durante las seis horas siguientes a partir de la inducción de la sobreexpresión, tomando muestras de 2 mL cada hora, para posteriormente realizar un análisis de las mismas mediante SDS-PAGE. Las células fueron colectadas por centrifugación a 16,000 g a 4 ° C durante 5 min (Fig. 7).

Para llevar a cabo la lisis celular, las células recolectadas se resuspendieron en una solución “búfer de lisis” (EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7.5) conteniendo PMSF 0.5 mM y benzamidina 5 mM como inhibidores de proteasas. Una vez resuspendidas las células, se llevó a cabo el lisado de las mismas por sonicación a una razón de 10 pulsos x 3 ciclos, cuidando de mantener siempre las muestras en hielo. Una vez obtenido el lisado celular, se prosiguió a su clarificación por centrifugación a 16,000 g a 4° C durante 5 min (Andersen *et al.*, 1997; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008; Campos-Acevedo *et al.*, 2010). Las muestras clarificadas, se analizaron mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras.

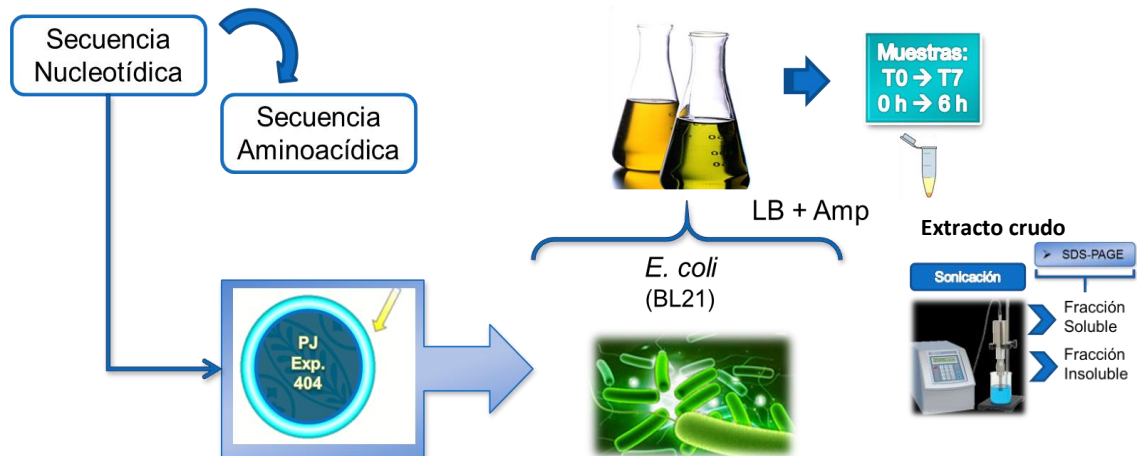


Fig. 7.- Sobreexpresión de MiTRXm en un sistema heterólogo.
 Modificado de: Sambrook *et al.*, 2001; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008

c. Obtención de Cuerpos de Inclusión

La proteína MiTRXm recombinante agregada en cuerpos de inclusión, se sometió a un proceso de solubilización mediante urea 8 M; llevando a cabo su replegamiento al dializar las muestras en una solución de fosfatos (NaPO_4 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1mM pH 7.0) con una membrana de 3.0 – 3.5 MWCO. La obtención de la MiTRXm soluble y activa se realizó siguiendo el protocolo de preparación de cuerpos de inclusión propuesto por Schürmann (1992). La diálisis de las muestras se realizó bajando la concentración de urea en dos etapas, la primera correspondió a urea 8 M hasta 4 M, mientras que la segunda se realizó de una concentración 4 M hasta 0 M. Cuando la concentración de urea fue de casi 0 M, se realizaron otras tres diálisis de dos hora únicamente en la solución de fosfatos.

El tratamiento aplicado a los cuerpos de inclusión consistió en el lavado de los mismos con tres tipos de soluciones: solución lavado 1 (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, DTT 5mM, Triton X-100 2%, EDTA 5 mM), solución de lavado 2 (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, DTT 5mM, EDTA 5 mM) y solución de lavado 3 (Tris-HCl 50 mM

pH 7.0, DTT 5mM, Triton X-100 2%, EDTA 5 mM, Urea 8 M). El protocolo de los lavados consistió en: 1) Se resuspendieron los cuerpos de inclusión provenientes de la lisis celular (protocolo de sobreexpresión de proteínas), en solución de lavado 1 a una razón de 4 ml x gramo de precipitado. 2) Se centrifugaron las muestras a 22,000 g a 4° C durante 30 min en una centrífuga Sorvall (modelo RC 5C plus). 3) Se desechó el sobrenadante y el precipitado obtenido se resuspendió en solución de lavado 2 (4 ml x gramo de pellet). Para llevar a cabo la resuspensión del precipitado se sonicaron las muestras durante 10 s o hasta homogenizar por completo. 4) Se centrifugaron de nuevo los cuerpos de inclusión a 22,000 g a 4° C durante 30 m y se volvió a dar un lavado con la solución 2. 6) Finalmente se prosiguió a resuspender el precipitado obtenido en solución de lavado 3, llevando cabo el procedimiento como se indica en paso 3 y 4.

Una vez que terminan los lavados de cuerpos de inclusión, se dejó la proteína en solución de lavado 3 a 4° C durante toda la noche, para posteriormente centrifugar las muestras bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente. El sobrenadante obtenido al final del protocolo fue el que se utilizó para los estudios posteriores del presente proyecto de investigación.

d. Purificación de la Proteína Recombinante

La purificación de la MiTRX m recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), con una solución de unión (NaPO₄ 20 mM, NaCL 500 mM, Imidazol 20 mM, pH 7.4 -7.6) y una solución de elución (NaPO₄ 20 mM, NaCL 500 mM, Imidazol 500 mM, pH 7.4 -7.6). La muestra se eluyó por medio de un gradiente de Imidazol 500 mM en una columna His-Trap FF crude de 1 ml (GE Health Care) con matriz Q-sepharose, en un cromatógrafo Äkta *prime* (GE Health Care, Suecia). Obtenida la proteína de interés, se evaluó su pureza mediante electroforesis en geles de

poliacrilamida SDS-PAGE al 15%, utilizando tinción azul de coomassie y plata (Laemmli, 1970;). La concentración de la proteína se determinó por medio del el método del ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008), mediante el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit, según instrucciones del protocolo estandarizado, así mismo la curva de calibración se realizó con seroalbúmina bovina (BSA).

e. Ensayo de Reducción de Disulfuros de la Insulina

La medición de la actividad reductora de MiTRXm se llevó a cabo por medio de la reacción de MiTRXm sobre la insulina al reducir sus puentes disulfuro. Una vez que se realizó la reacción (Fig. 8) se midió el incremento de la turbidez causada por la formación de uniones covalentes, de manera aleatoria, entre las cadenas B libres de insulina, a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro (Varian Cary-UV 50). Todo el proceso de reacción y medición de la turbidez generada se realizó a una temperatura de 25° C (Holmgren, 1979; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008). Las concentraciones del ensayo fueron: MiTRXm 0.683 μM, NaPO₄ 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1mM insulina 1 mg/ml, pH 7.0.

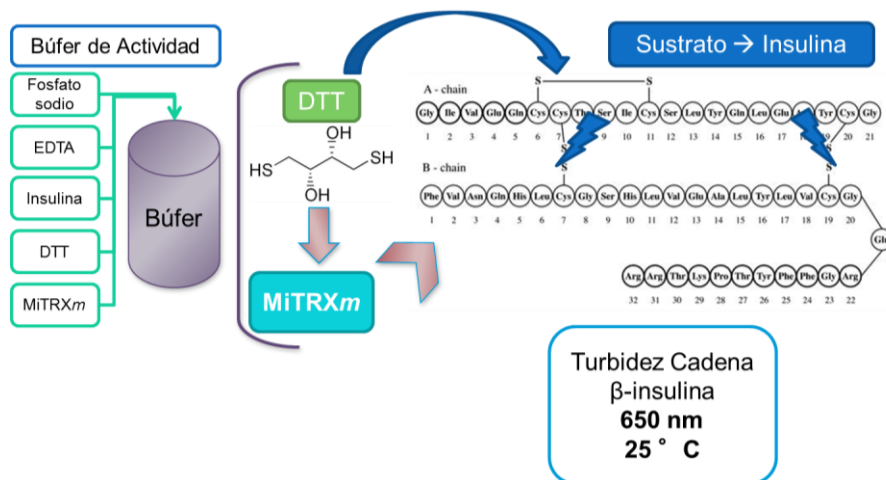


Fig. 8.- Ensayo de Actividad de MiTRXm sobre la insulina.

(Holmgren, 1979; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008; Campos-Acevedo *et al.*, 2010)

f. Ensayo de Termoestabilidad

La termoestabilidad se determinó incubando la proteína durante 5 minutos a distintas temperaturas (25 – 85° C) con incrementos graduales de 10 grados (Canali *et al.*, 2014). También se determinó la termoestabilidad de la proteína simulando el tratamiento hidrotérmico que se aplica en el mango. Por lo tanto el tiempo de incubación abarcó un rango mayor, desde los 0, 60, 100 y 120 min, a una temperatura constante de 46.1° C \pm 0.1 en termoblock (Fischer Scientific). En ambos casos una vez que transcurrió el tiempo de incubación, se prosiguió a realizar el ensayo estándar de actividad reductora a 25° C (Sotelo-Mundo *et al.*, 2007; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008).

g. Modelación de la Estructura 3D de MiTRXm

La modelación de la estructura 3D de la MiTRXm se realizó con el software informático MOE V2012.10 mediante la comparación por homología de una tiorredoxina de espinaca (*Spinacia oleracea*), identificada en la base de datos para proteínas PDB: 1FB0_A (Zhou *et al.*, 2003) y que es 66% idéntica a la MiTRXm.

h. Análisis Estadístico (Medias de Actividad Específica)

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) en el programa NCSS ver. 2007, donde se analizó si existían o no diferencias ($P \leq 0.05$) entre las medias de las actividades específicas a distintas temperaturas (25 – 85°C). Las medias fueron comparadas mediante una prueba de Tukey-Kramer a un nivel de confianza de 95%.

VI – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Sobreexpresión de la MiTRX m Recombinante

La proteína recombinante MiTRX m con una cola de polistidinas y un tamaño aproximado de 15.57 kDa se logró sobreexpresar (Fig. 9) en un sistema heterólogo bacteriano (*E. coli* BL21-Novagen), por medio de un gen sintético insertado en un vector de sobreexpresión plasmídico (pJExpress 404-TRX m). Dicho sistema de sobreexpresión heteróloga se encuentra bajo la regulación de la RNA polimerasa T5, la cual se desreprime del represor *lac* por medio de IPTG, por lo que la sobreexpresión de la proteína de interés se logró de forma satisfactoria.

En el análisis del patrón electroforético por medio de SDS-PAGE al 15% tanto de la fracción soluble como insoluble o pellet, se determinó que a pesar de que la sobreexpresión de la MiTRX m recombinante fue exitosa, ésta se agregó formando cuerpos de inclusión. Lo anterior se muestra claramente en la Figura 9b, donde se observa un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes al tamaño esperado de la proteína en la fracción insoluble. A pesar de haberse realizado diversos ensayos modificando variables como temperatura, concentración de inductor, cepa de sobreexpresión y medio de cultivo, la proteína siempre se obtuvo de manera insoluble.

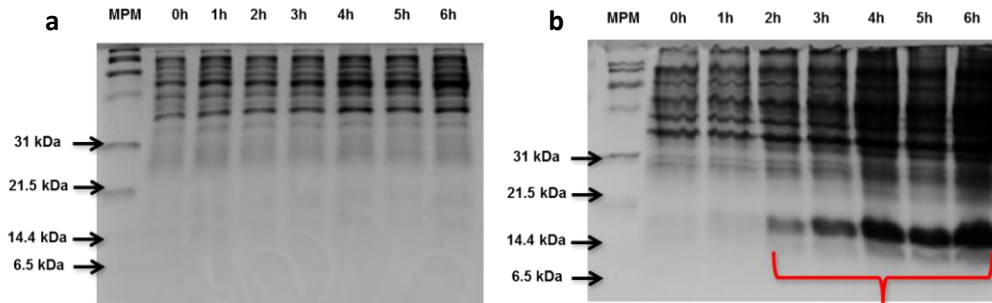


Fig. 9.- Análisis Electroforético SDS-PAGE 15% – MiTRXm.

a) Fracción soluble, b) Fracción Insoluble (pellet). Carriles en ambos geles: 1. – Marcador de peso molecular Broad Range (Biorad), 2 – 8.- Análisis de las fracciones desde el tiempo 0 (antes de la inducción) y las seis horas siguientes a partir de la inducción.

Para corroborar que la sobreexpresión de la MiTRXm se diera únicamente cuando se realiza la inducción con IPTG, se realizó un ensayo de sobreexpresión pero sin el inductor. El análisis electroforético muestra que no existe un patrón de bandeo similar al de la sobreexpresión, tanto en la fracción soluble como insoluble (Fig. 10).

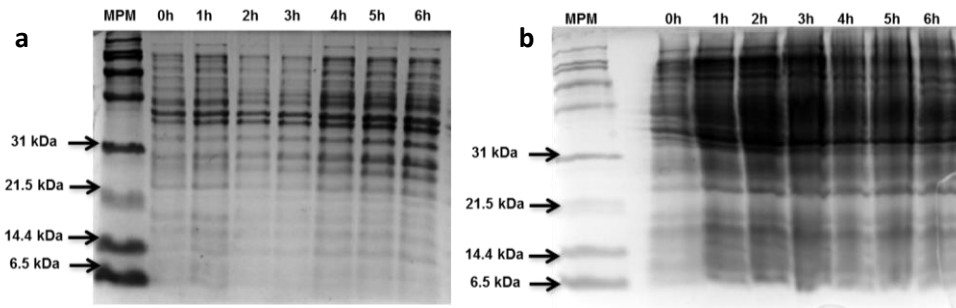


Fig. 10.- Análisis Electroforético SDS-PAGE 15% – Control negativo de la sobreexpresión de MiTRXm.

a) Fracción soluble, b) Fracción Insoluble. Carriles en ambos geles: 1. – Marcador de peso molecular Broad Range (Biorad), 2 – 8.- Análisis de las fracciones desde el Tiempo 0 y las seis horas siguientes a partir del momento equivalente a la inducción con IPTG.

La sobreexpresión de la MiTRX m recombinante de cloroplasto al darse de manera insoluble, se debe a que la proteína se encuentra desnaturalizada en cuerpos de inclusión como lo indican Schürmann (1992) y Gleason (1992) en tiorredoxinas f y m de cloroplasto de distintos organismos vegetales. La literatura enmarca de manera general a las tiorredoxinas como proteínas solubles por excelencia (Holmgren, 1985; Jacquot, *et al.*, 1997; Viera y Rey, 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado que al utilizar sistemas de sobreexpresión heteróloga para la obtención de tiorredoxinas cloroplásticas, como las f y m de espinaca (*Spinacea oleracea*), éstas se han dado en la fracción insoluble (Aguilar *et al.*, 1992; Del Val *et al.*, 1999; Capitani *et al.*, 2000), tal como sucede en la sobreexpresión de la MiTRX m en la presente investigación. Sin embargo, estos resultados difieren con las investigaciones llevadas a cabo por Aispuro-Hernández *et al.*, (2008) y Campos-Acevedo *et al.*, (2010) en tiorredoxinas citosólicas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), donde la sobreexpresión de las proteínas recombinantes en ambos casos se dió de manera soluble y activa.

b. Replegamiento de MiTRX m

La MiTRX m se logró replegar mediante diálisis en la solución de fosfatos (NaPO₄ 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 1mM pH 7.0), la cual es la correspondiente a la solución para el ensayo de actividad reductora. Con la finalidad de comprobar si la proteína se encontraba plegada en su forma activa una vez que se le retiró la urea se realizó un análisis por SDS-PAGE al 15%. En la Figura 11 se aprecia que la proteína se encuentra de manera soluble y plegada, por lo que el siguiente paso consistió en constatar que la proteína estuviera activa, para lo cual se realizó un ensayo de actividad reductora. Se prosiguió a medir la actividad de un extracto crudo, donde se encontraba la MiTRX m sin purificar. La Figura 11 también muestra que existe actividad en el extracto crudo, atribuible a

la tioredoxina recombinante de mango, debido a que ésta se encuentra en mayor proporción a otras proteínas.

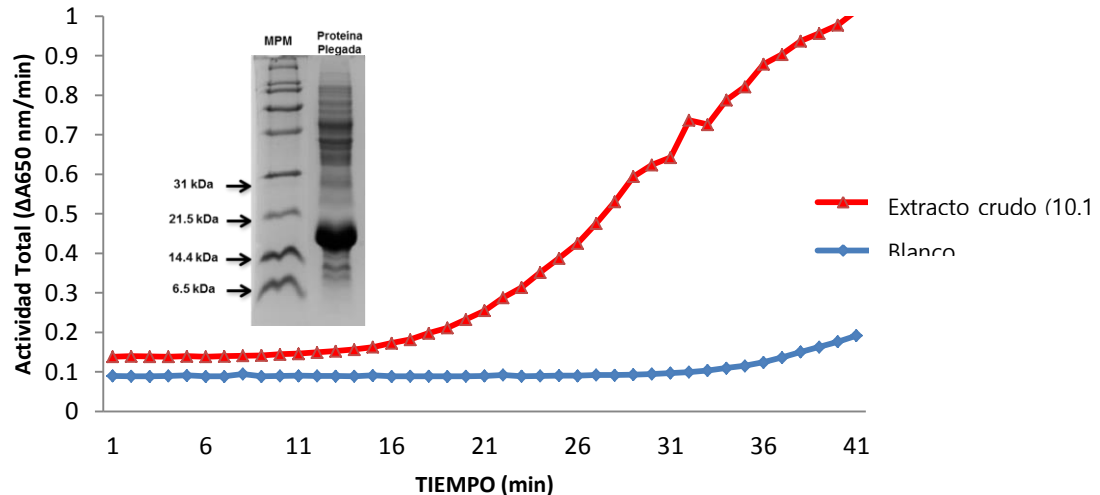


Fig. 11.- Análisis SDS-PAGE y Ensayo de Actividad Reductora de la MiTRXm replegada en un Extracto Crudo.

Análisis electroforético: SDS-PAGE 15% - Extracto crudo – Banda del tamaño esperado a MiTRXm se observa con mayor intensidad. La muestra corresponde a la proteína plegada sin urea. Gráfica: Actividad reductora de la tioredoxina recombinante presente en el extracto crudo.

Se calculó una actividad total de 0.034 unidades, en función del cambio en la absorbancia a 650 nm por minuto ($\Delta A_{650 \text{ nm}} \text{ min}^{-1}$). Una vez que se comprobó que la proteína se encontraba soluble, plegada y activa se prosiguió con su purificación mediante cromatografía IMAC.

c. Separación y Purificación de MiTRXm

En la Figura 12 se presenta el cromatograma de purificación, donde se pueden observar tres picos de interés correspondientes al aumento en la absorbancia a 280 nm, por efecto de la elución de la proteína con un gradiente de imidazol. Los primeros dos picos eluyeron a una concentración de 110 mM de imidazol y el tercero a 230 mM.

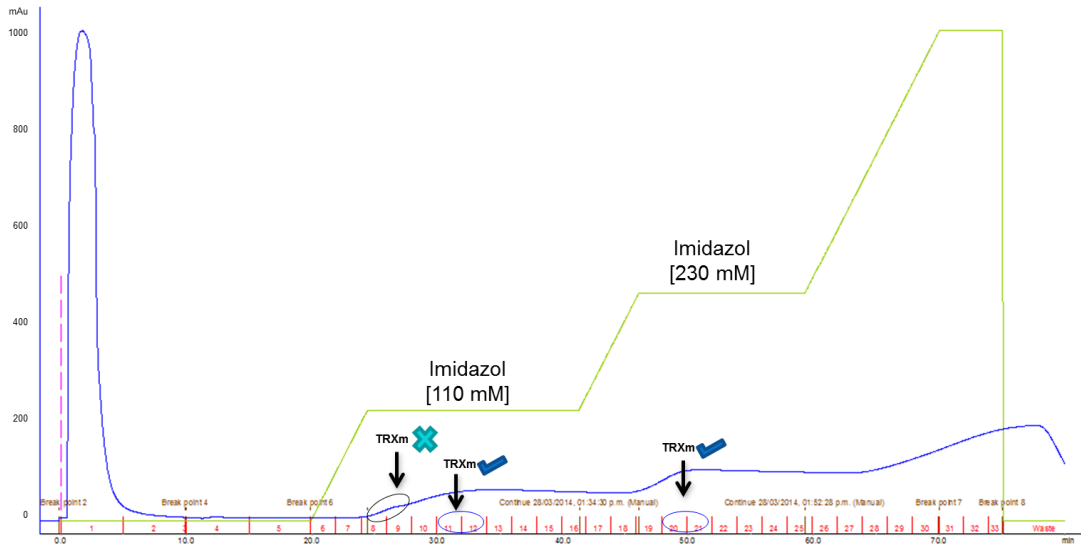


Fig. 12.- Cromatograma de separación y purificación de MiTRXm por cromatografía IMAC. Se muestran dos picos de interés a una elución de Imidazol de 110 mM y 230 mM respectivamente. El volumen inyectado de extracto crudo en la cromatografía fue de 4 ml [10.1 mg/ml], mientras que el volumen correspondiente a las fracciones fue de 2 ml [0.133 mg/ml].

Se realizó un análisis electroforético de las fracciones F20 – F28 correspondientes al pico de mayor intensidad en la cromatografía, las cuales fueron corridas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 15%) y teñidas con plata (Fig. 13). Donde es posible apreciar únicamente una banda intensa, acorde a una cinética de sobreexpresión y al tamaño esperado de MiTRXm.

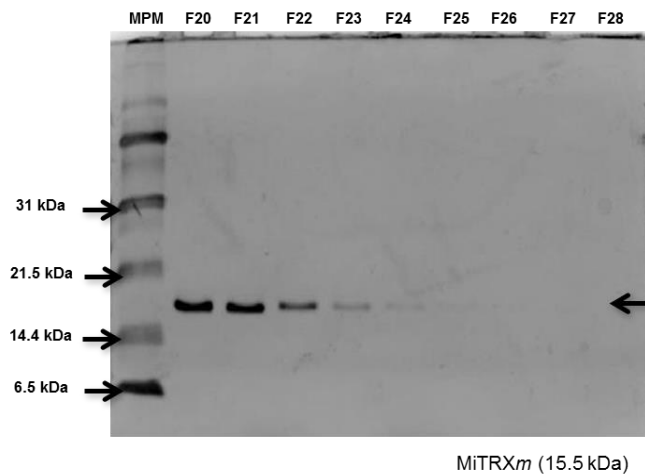


Fig. 13.- MiTRXm purificada y separada por cromatografía IMAC – Tinción Plata. Fracciones de la cromatografía eluidas a una concentración de 230 mM de Imidazol, analizadas por SDS-PAGE al 15% y teñidas con plata.

d. Ensayo de Actividad de Reducción de la Insulina

Una vez purificada la MiTRX m por cromatografía, fue posible comprobar su actividad en condiciones *in vitro*, mediante el ensayo de actividad de reducción de la insulina. En este ensayo, se pudo comprobar que la reducción de la insulina se debe a una proteína recombinante con actividad REDOX, por lo que sí corresponde a la actividad de la tiorredoxina del mango.

La concentración de tiorredoxina cloroplástica de mango en el ensayo fue de 0.683 μM , la cual presentó una actividad específica de 0.96 unidades $\Delta A_{650\text{nm}}/(\text{mg MiTRX}m) (\text{min})$. Dicha actividad específica es distinta a lo encontrado en diversas tiorredoxinas, como las citosólicas del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) y *E. coli*, o mitocondriales como las de Ternera (Holmgren, 1979; Reckenfelderbäumer, 2000; Aispuro-Hernández *et al.*, 2008; Campos-Acevedo; 2012). A pesar de que la actividad resulta ser menor en comparación a otras tiorredoxinas como lo muestra la Tabla 1, se observa que los valores se encuentran dentro del mismo orden de magnitud. Por lo que es posible concluir que la actividad específica para cada proteína estará dada en función del tipo de tiorredoxina al que pertenezcan, así como el organismo donde se encuentren (Viera y Rey, 2006; Meyer *et al.*, 2009).

Tabla. 1.- Actividad Específica de MiTRX m vs diversas TRX.

$(\Delta A_{650\text{ nm}} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1})$	TRX
0.96	MiTRX m
10.44	LvTRX1
8.4	LvTRX
4.93	<i>E. coli</i>
6.5	Hígado de Ternera
5.09	Timo de Ternera
3.6	<i>T. brucei</i>

e. Termoestabilidad de MiTRXm

La termoestabilidad de la MiTRXm recombinante se determinó en condiciones *in vitro* al someter a la proteína pura a distintas temperaturas en un rango desde los 25 hasta los 85°C. En la gráfica (Fig. 14) se observa una tendencia en la actividad específica de la proteína, la cual presenta un ligero aumento a los 45°C y 55°C de aproximadamente 11.3% y 4.1%, respectivamente. Sin embargo, existe un decremento en la actividad a medida que se alcanzan las mayores temperaturas (65 – 85° C), con respecto al control (proteína incubada a 25° C). Donde a temperaturas de 65° C y 85° C, la MiTRXm disminuye su actividad aproximadamente un 15% y 48%, respectivamente. Sin embargo, al no haber diferencias significativas en la actividad específica de la proteína, es posible argumentar que la MiTRXm es estable en el rango de los 25° hasta los 85° C.

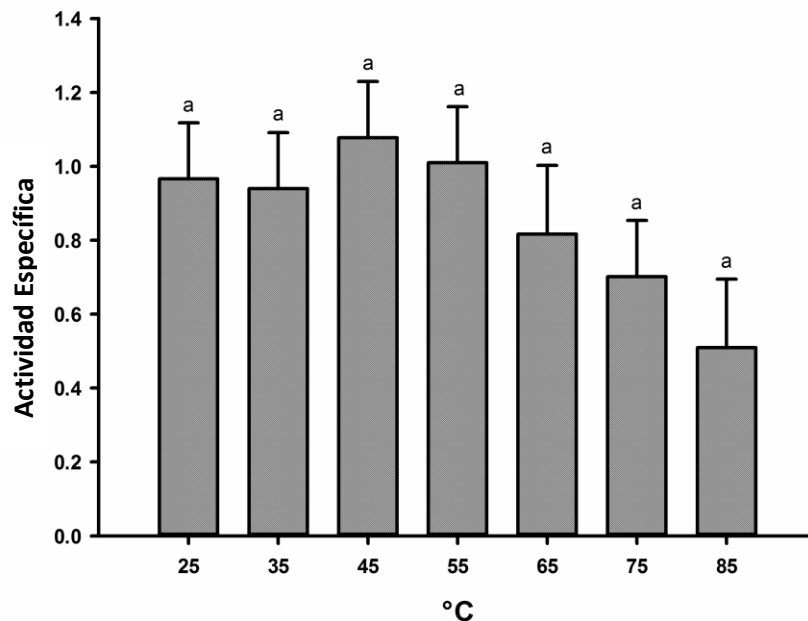


Figura. 14.- Termoestabilidad de MiTRXm.

Literales distintas muestran diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Las barras representan los valores medios \pm EE de tres repeticiones
Unidades: $\Delta A_{650 \text{ nm}} \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$

La termoestabilidad de la TRX se debe posiblemente al alto grado de compactación que presenta la estructura terciaria de la proteína, así como a la presencia de estructuras secundarias que forman el plegamiento tipo tiorredoxina, formado por 5 láminas beta, 4 de ellas hacia el interior y una externa, y 4 hélices alfa hacia el exterior (ver Fig. 16). Lo anterior permite que la proteína sea activa a pesar del aumento en la temperatura, lo cual concuerda con otros estudios llevados a cabo en tiorredoxinas de diversos organismos como invertebrados, levaduras, arqueas y ser humano (Holmgren, 1975; Kern *et al.*, 2003; Gromer *et al.*, 2004; Esposito *et al.*, 2012).

En la Figura 15, se muestra el comportamiento en la actividad específica de la MITRX_m, posterior a un ensayo de termoestabilidad en simulación del tratamiento hidrotérmico aplicado al fruto del mango en un rango de 60 a 120 min.

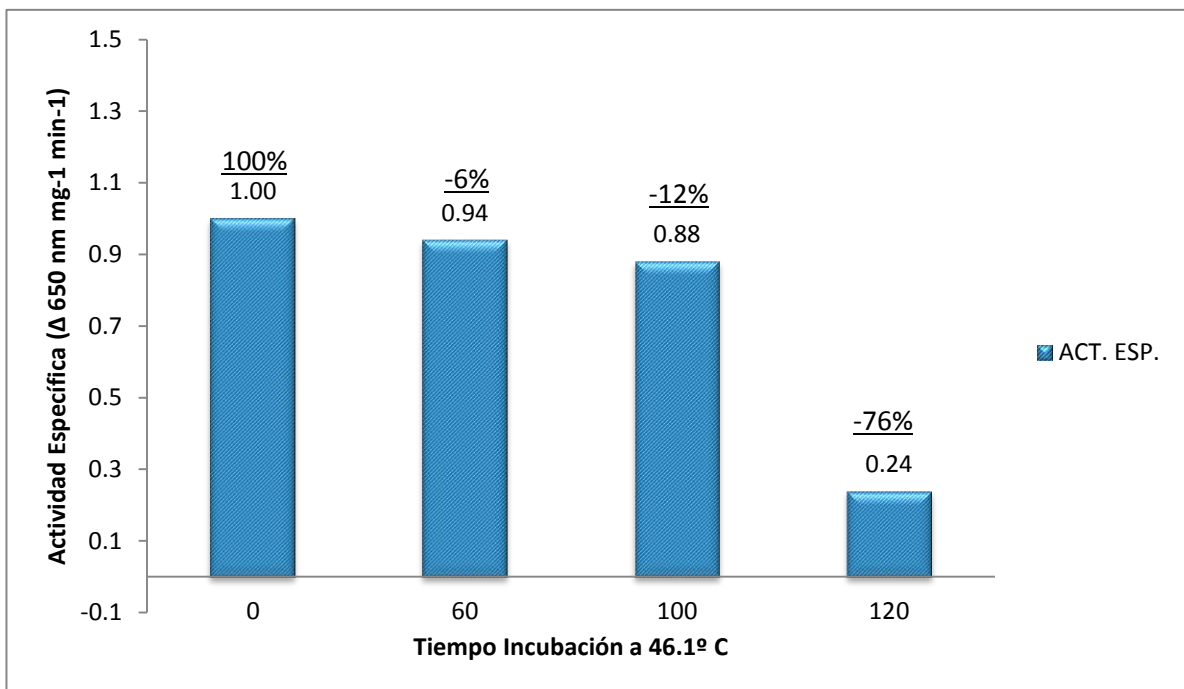


Fig. 15.- Termoestabilidad – Tratamiento Hidrotérmico de MiTRX_m.

El tiempo 0 corresponde al ensayo estándar a 25° C sin haber sido incubada la proteína. Por lo que se toma dicha actividad como el 100%. Se evaluó el porcentaje de disminución en la actividad según el paso del tiempo a 46.1° C.

Los resultados muestran que la proteína incubada durante 1 h se encuentra muy activa, disminuyendo aproximadamente un 6% su actividad específica, mientras que a 1.5 h disminuye al doble en aproximadamente un 12%. Sin embargo, esto difiere con la pérdida de actividad a las 2 h, donde el porcentaje de disminución es de un 76% aproximadamente. Estos resultados indican que la *MiTRXm* es activa aun en períodos largos de exposición a dicha temperatura lo que puede llegar a ser benéfico para las células del mango. El beneficio de una proteína termoestable y activa durante el tratamiento hidrotérmico, como la tiorredoxina cloroplástica de mango, es que ésta puede llevar a cabo su función, manteniendo el sistema REDOX celular. Otra ventaja consistiría en fungir como antioxidante ayudando a contrarrestar los efectos nocivos provocados por el aumento de temperatura (Buchanan *et al.*, 2012).

f. Modelo Estructural de *MiTRXm*

La Figura 16 muestra la estructura tridimensional en forma de listones, obtenida mediante modelación 3D de la *MiTRXm*. La proteína está constituida por 5 láminas beta y 4 hélices alfa, estructuras secundarias necesarias para que se dé el plegamiento tipo tiorredoxina.

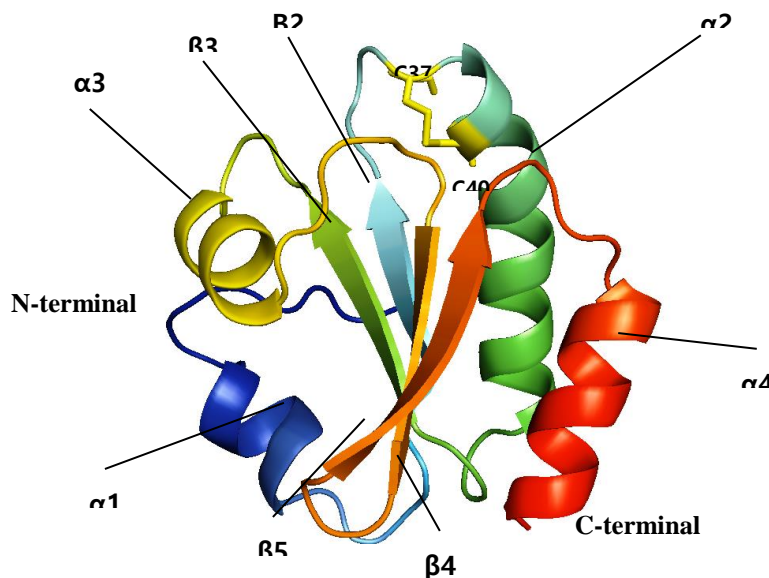


Fig. 16.- Modelo de la estructura 3D de *MiTRXm*.

Estructura tipo tiorredoxina: 5 láminas beta + 4 hélices alfa. Cisteínas oxidadas (C37-C40) del sitio activo conservado CXXC se muestran en color amarillo. Hélice $\alpha 1+\beta 1$ (no se muestra): amino terminal, hélice $\alpha 4$: carboxilo terminal.

En color amarillo – entre la hoja beta 1 y hélice alfa 2 – se muestran las cisteínas (forma oxidada) del sitio activo, formando una cistina mediante la unión por un puente disulfuro de la C37 y C40 (Arvizu *et al.*, 2012). El hecho de que el sitio activo quede posicionado hacia el exterior de la estructura, es esencial para que la proteína sea capaz de llevar a cabo su función REDOX.

En estudios recientes sobre tiorredoxinas de arqueobacterias del género *Sulfolobus* (Esposito *et al.*, 2012), se ha demostrado que no solamente influyen los factores de compactación y plegamiento para la termoestabilidad de dichas proteínas. En dicho estudio los autores proponen dos elementos importantes para la termoestabilidad de la tiorredoxina de *Sulfolobus sulfataricus* A1 (SsTRXA1). El primer factor es la extensión o longitud de la hélice α 1, mientras que el segundo corresponde al loop o lazo de unión entre dicha hélice α y la siguiente lámina β 2. Lo anterior se debe posiblemente a la delección de un aminoácido posicionado entre dicha hélice α y el lazo, ya que permitiría un rearrreglo en la estructura secundaria de la proteína.

La forma en que contribuyen estos dos factores a la termoestabilidad de la SsTRXA1, se debe esencialmente a que en dicha tiorredoxina se alarga más la hélice α 1 y se acorta el lazo conector (Figura 17). Esto propicia que la hélice alfa (extensa) se encuentre más cerca de la lámina β 2, lo cual favorece que la tiorredoxina de *S. sulfataricus* sea más compacta y termoestable que otras tiorredoxinas que no presentan dichas características, como la tiorredoxina citosólica de *E. coli* (Katti *et al.*, 1990) y la cloroplástica tipo *m* de espinaca (*S. oleracea*) (Capitani *et al.*, 2000).

La estructura y secuencia aminoacídica de la MiTRX m guarda una mayor similitud con la tiorredoxina de *E. coli*, y especialmente con la tiorredoxina de espinaca, puesto que pertenecen al mismo tipo y organelo. Debido a lo anterior, se realizó una comparación de las estructuras de la tiorredoxina termoestable

de *S. sulfataricus* contra la del mango lo que permitió realizar inferencias acerca de la termoestabilidad de la *MiTRXm* (Fig. 17) (Esposito *et al.*, 2012).

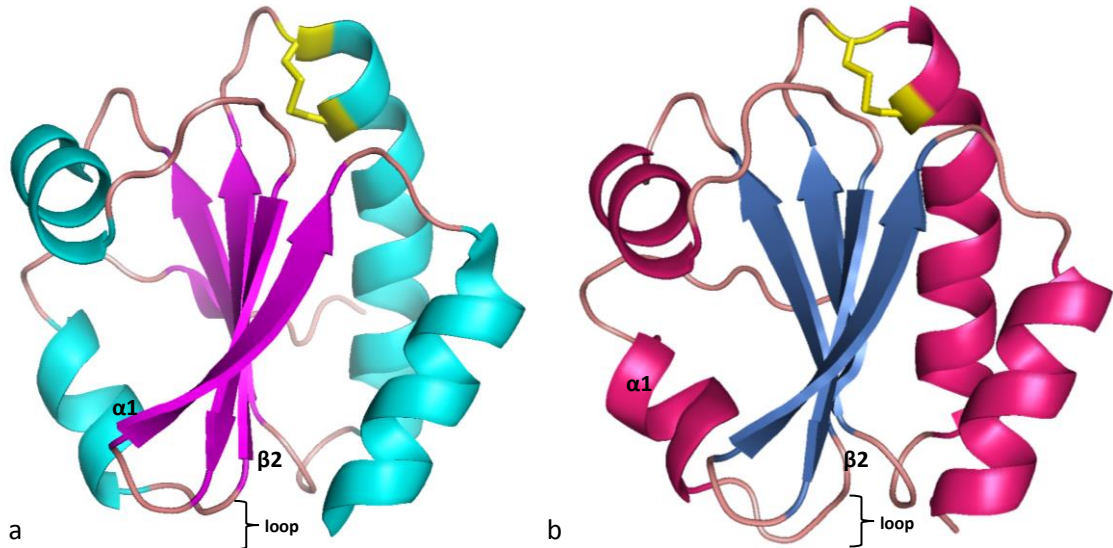


Fig. 17.- Modelo estructural de SsTRXA1 vs MiTRXm.

a) Estructura de la SsTRXA1, donde se puede observar una hélice $\alpha 1$ más extensa, así como un lazo de unión con lámina $\beta 2$ más corto en comparación con *MiTRXm*. b) Estructura terciaria de *MiTRXm*, la cual a diferencia de SsTRXA1 presenta una hélice $\alpha 1$ de menor longitud, así como un lazo de unión más largo. Ambas estructuras presentan las cisteínas del sitio activo en su forma oxidada (puente disulfuro).

Al comparar las estructuras terciarias y secundarias tanto de SsTRXA1 y *MiTRXm* es posible notar que a nivel de estructura terciaria no presentan gran diferencia. Sin embargo, al realizar una inspección más minuciosa, es factible observar que hay variación en la estructura secundaria. Dicha variación se localiza en la extensión de la hélice $\alpha 1$ y el lazo de unión con lámina $\beta 2$, mencionados anteriormente. Estas características no se observan en la tiorredoxina *m* de mango; la cual presenta una hélice $\alpha 1$ más corta y un lazo de unión con lámina $\beta 2$ más largo como puede observarse en la Figura 17.

Esto significa que la *MiTRXm* a pesar de ser una proteína termoestable como lo demuestran los experimentales anteriores, no lo es al nivel de la *SsTRXA1*, la cual llegó a presentar una termoestabilidad de hasta 105° C (incubada durante 1 hora). Lo anterior permitiría explicar por qué la actividad específica de la proteína disminuye arriba de los 65° C en los ensayos de termoestabilidad. Ya que al no contar con las variaciones de la tiorredoxina de *S. sulfataricus* (alargamiento de la hélice alfa 1 y acortamiento del loop o lazo de unión con beta 2) en su estructura secundaria, su tolerancia a temperaturas elevadas es menor. Por lo que la *MiTRXm* presenta termoestabilidad en un rango menor de temperaturas.

VII – CONCLUSIONES

La tiorredoxina cloroplástica tipo *m* de mango (*Mangifera indica* L.) MiTRX*m* recombinante presenta actividad *in vitro* posterior al proceso de sobreexpresión, desnaturalización y replegamiento de la misma. Es decir, la proteína se encuentra pura, soluble y en su conformación nativa lo que en efecto da como resultado una proteína activa.

La MiTRX*m* al encontrarse pura y soluble permitió que se lleven a cabo estudios posteriores para su caracterización bioquímica. Como parte de su caracterización, se demostró que la proteína es termoestable en un rango de 25 – 85° C, llevando a cabo su actividad específica.

La proteína también demostró ser activa simulando las condiciones *in vitro* del tratamiento hidrotérmico; donde una hora a 46.1° C afectó relativamente poco su actividad (6% de disminución). Sin embargo, aunque a los 80 y 100 min existió un decremento en el porcentaje de actividad específica, es hasta las dos horas cuando la proteína pierde casi el 76% de su actividad. Por lo anterior es posible inferir que la MiTRX*m* seguirá activa aún cuando se aplique el tratamiento hidrotérmico a los frutos de mango.

La modelación de la estructura de la MiTRX*m* demostró que aunque la proteína es termoestable en cierto rango de temperaturas, no presenta las características estructurales necesarias para soportar temperaturas más altas de 85° C y períodos de exposición mayores de dos horas; a diferencia de otras tiorredoxinas de organismos hipertermófilos (*S. sulfataricus* – SsTRXA1). Lo anterior podría explicar por qué existió una disminución de más del 50% de su actividad a las dos horas del tratamiento hidrotérmico, ya que al no presentar dichas características antes mencionadas, la MiTRX*m* comenzó a perder su

actividad posterior a los 100 min de incubación a 46.1° C. Sin embargo, los tiempos de aplicación del tratamiento hidrotérmico mayormente utilizados se encuentran dentro del rango de 1 h a 1.5 h (90 min), por lo que la proteína demostró ser activa en dicho rango.

Por lo anterior es posible concluir que una proteína termoestable tanto a la temperatura del tratamiento hidrotérmico como su duración, como la *MiTRXm* se traducirá en un beneficio para el fruto de dos maneras: se seguirán llevando a cabo las reacciones óxido-reducción del sistema REDOX, a la vez de que se podrá aminorar los efectos negativos generados por estrés oxidativo debido al tratamiento cuarentenario.

VIII - REFERENCIAS

Aguado-Llera, D., Martínez-Gómez, A., Prieto, J., Marenchino, M., Traverso J., Gómez, J., Chueca, A. y Neira, J. (2011). The conformational stability and biophysical properties of the eukaryotic thioredoxins of *Pisum sativum* are not family-conserved. *PLoS One*, 6, 3655 – 3659.

Ahsan, K., Lekli, I., Ray, D., Yodoi, J. y Das, D. (2009). Redox regulation of cell survival by the thioredoxin superfamily: an implication of redox gene therapy in the heart. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 2741-2758.

Aispuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Muhlia-Almazan, A., del-Toro-Sanchez, L., Robles-Sanchez, R. M., Hernandez, J. & Sotelo-Mundo, R. R. (2008). Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(1), 94-99.

Akif, M., Suhre, K., Verma, C., y Mande, S.C. (2005). Conformational flexibility of *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase: crystal structure and normal-mode analysis. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 61, 1603 – 1611.

Alkhalifioui, F., Renard, M. y Montrichard, F. (2006). Unique properties of NADP-thioredoxin reductase C in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 58, 969 – 978.

Andersson, M., Holmgren, A., y Spyrou, G. (1996). NK-lysin, a disulfide-containing effector peptide of T-lymphocytes, is reduced and inactivated by human thioredoxin reductase. Implication for a protective mechanism against NK-lysin cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 10116 – 10120.

Andersen, J., Sanders, D., Gasdaska, J., Weischel, A., Powis, G. y Montfort, W. (1997). Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and cristal structure of the aspartate 60/ asparagine mutant. *Biochemistry*, 36, 13979 – 13988.

Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygenspecies: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*, 55, 373 – 399.

Arnér, E. y Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6102 – 6109.

Arnér, E., Nordberg, J. y Holmgren, A. (1996). Efficient reduction of lipoamide and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225, 268 – 274.

Arvizu-Flores, A., Aispuro-Hernández, E., y Sotelo-Mundo, R. (2012). Tiorredoxinas antioxidantes en sistemas vivos y alimenticios. En: Álvarez, E., González, G., Alejandra, L. y Ayala, F. Antioxidantes en alimentos y salud. México. Editorial CLAVE. 2012.

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. y Buchanan, B. (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 100, 370 - 375.

Balsera, M., Soll, J. y Buchanan, B. (2010). Redox extends its regulatory reach to chloroplast protein import. *Trends in Plant Science*, 15, 515 – 521.

Barajas-López, J., Serrato, A., Cazalis, R., Meyer, Y., Chueca, A., Reichheld, J. y Sahrawy, M. (2010). Circadian regulation of chloroplastic f and m thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 31, 1 – 13.

Benitez-Alfonso, Y. y Jackson, D. (2009). Redox homeostasis regulates plasmodesmal communication in *Arabidopsis* meristems. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 655 – 659.

Bräutigam, K., Dietzel, L. y Pfannschmidt, T. (2010). A binary redox control mode as universal regulator of photosynthetic light acclimation. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 81 – 85.

Buchanan, B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 31, 341 – 374.

Buchanan, B. (1991). Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288, 1 – 9.

Buchanan, B., Holmgren, A., Jacquot, J. y Scheibe, R. (2012). Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 1822-1829.

Canali, E., Bolchi, A., Spagnoli, G., Seitz, H., Rubio, I., Pertinhez, T. A. & Ottonello, S. (2014). A high-performance thioredoxin-based scaffold for peptide immunogen construction: proof-of-concept testing with a human papillomavirus epitope. *Scientific reports*, 4.

Capitani, G., Markovic-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J., y Schürmann, P. (2000). Crystal Structures of Two Functionally Different Thioredoxins in Spinach Chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, 302, 135-154.

Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., y Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 99, 9745 – 9749.

De-La-Re-Vega, E., García-Orozco, K. D., Calderón-Arredondo, S. A., Romo-Figueroa, M. G., Islas-Osuna, M. A., Yepiz-Plascencia, G. M., & Sotelo-Mundo, R. R. (2004). Recombinant expression of marine shrimp lysozyme in *Escherichia coli*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(3), 12-13.

Chi, W., Sun, W. y Zhang, L. (2013). Intracellular Signaling from Plastid to Nucleus. *Annual Reviews of Plant Biology*, 64, 101–104.

Cui-Jun, Z. y Guo, Y. (2012). OsTRXh1 regulates the redox state of the apoplast and influences stress responses in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1 – 3.

Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J. y Eklund, H. (1996) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 264, 1044 – 1057.

Dai, S., Schwendtmayer., Schürmann, P., Ramaswamy, S. y Eklund, H. (2000). Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulphides by an iron-sulfur cluster. *SCIENCE*, 287, 1150-1155.

Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O. y Danon, A. (2009). A Small Family of Chloroplast Atypical Thioredoxins. *Plant Physiology*, 149, 1240 – 1250.

Dietz, K.J. (2008) Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. *Physiology of Plants*, 133, 459 – 468.

Dietz, K. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, 1089 - 1093.

Eklund, H., Gleason, F. y Holmgren, A. (1991): Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins: Structure Function and Genetics*, 11, 13 – 28.

Eslampanah, H. y Shahpiri, A. (2012). Molecular cloning and characterization of two isoforms of cytoplasmic/mitochondrial type NADPH-dependent thioredoxin reductase from rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Australian Journal of Crop Sciences*, 6, 1045 – 1050.

Esposito, L., Ruggiero, A., Masullo, M., Ruocco, M. R., Lamberti, A., Arcari, P., Zagari, A. y Vitagliano, L. (2012). Crystallographic and spectroscopic characterizations of *Sulfolobus solfataricus* TrxA1 provide insights into the determinants of thioredoxin fold stability. *Journal of Structural Biology*, 177, 506 – 512

Fernández, J., González, M. y Cejudo, F. (2012). Chloroplast redox homeostasis is essential for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1177 – 1179.

Feyziyev, Y. (2010). Oxygenic Photosynthesis: An Introduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 65, 71 – 82.

Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 436 – 442.

Gil-Bea, F., Akterin, S., Persson, T., Mateos, L., Sandebring, A., Avila-Cariño, J., Gutierrez-Rodriguez, A., Sundström, E., Holmgren, A., Winblad, B. y Cedazo-Minguez, A. (2012). Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Molecular Medicine*, 4, 1097 – 1111.

Gromer, S., Urig, S. y Becker, K. (2004). The thioredoxin system – from science to clinic. *Medicinal Research Reviews*, 24, 40 – 89.

Hand, S. y Hardewig, I. (1996). Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: Mechanisms and implications. *Annual Reviews of Physiology*, 58, 539 – 563.

Holmgren, A., Söderberg, B., Eklund, H. y Brändén, H. (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, 72, 2305 – 2309.

Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleotide diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U. S. A.*, 73, 2275 – 2279.

Holmgren, A., Buchanan, B. y Wolosiuk, R. (1977). Photosynthetic regulatory protein from rabbit liver is identical with thioredoxin. *FEBS Letters*, 82, 351 – 354.

Holmgren, A. (1977). Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 4600 – 4606.

Holmgren, A. (1979). Thioredoxins catalyzes the reduction of insuline disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 9627 – 9632.

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 237 – 71.

Holmgren, A. y Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods of Enzymology*, 252, 199 – 208.

Holmgren, A., Brändén, C. y Sjöberg, B. (1986). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems: Structure and Function. Raven Press, NewYork, 1986, 411 pp.

Hun, Y., Chan, J., Ho, P., Ho-Seung, K., Zulfugarov, I., Indra, W., Ho, J., Ro, J., Mee, Y., Tae, S., Yong-Yoon, C., Oh, C., Jae-Yean, K., Dae-Jin, Y., Choon-Hwan, L., Oh, K. y Yeol, S. (2008). Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin m knock-down. *Plant Physiology*, 148, 808 – 817.

Hüner, N., Bode, R., Dahal, K., Hollis, L., Rosso, D., Krol, M. y Ivanov, G. (2012). Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the “grand design of photosynthesis” revisited. *Fontiers in Plant Science*, 3, 255 – 258.

Jha, S., Narsaiah, K. Sharma, A., Singh, M., y Bansal, S. (2009). Quality parameters of mango and potential of non-destructive techniques for their measurement. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 1 – 14.

Jacquot, J., Lancelin, J. y Meyer, Y. (1997). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytologist*, 136, 543 – 570.

Katti, S., LeMaster, D., y Eklund, H. (1990): Crystal structure of thioredoxin from *E. coli* at 1.68 °Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 212, 167 – 184.

Kern, R., Malki, A., Holmgren, A. y Riharme, G. (2003). Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 371, 965 – 972.

Klein, J. y Lurie, S. (1992). Heat Treatments for Improved Postharvest Quality of Horticultural Crops. *Horticultural Technology*, 2, 833 – 347.

Kültz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology*, 67, 225 – 57.

Kuriyan, J., Krishna, T., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C. y Model, P. (1991). Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature*, 352, 172 – 174.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 – 685.

Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienberger, J., Bonnard, G. y Meyer, Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 98, 14144 – 14149.

Lemaire, S., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. y Issakidis-Bourguet, E. (2007). Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics*, 65, 345 – 360.

Leegood, R. y Walker, D. (1980). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in intact chloroplasts. Studies of the mechanism of inactivation. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 593, 362 – 370.

Lillig, C., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M., Hudemann, C., Bill, E. y Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron–sulfur protein: A possible role as redox sensor. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 102, 8168 – 8173.

Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 257 – 269.

Michelet, L., Zaffagnini, M., Marchand, C., Collin, V., Decottignies, P., Tsan, P., Jean-Marc, L., Trost, P., Miginiac-Maslow, M., Noctor, G. y Lemaire, S. (2005). Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 102, 16478 – 16483.

Meyer, Y., Buchanan, B., Vignols, F. y Reichheld, J. (2009). Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. *Annual Review of Genetics*, 43, 335-67.

Oliviera, M., Discola, K., Ales, S., Medrano, F., Guimarares, B. y Netto, L. (2010). Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions a structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. *Biochemistry*, 49, 3317-3326.

Møller, I., Jensen, P., y Hansson, A. (2007). Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, 58, 459 – 481.

Mustacich, D. y Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 346, 1-8.

Pfalz, J., Liebers, M., Grübler, B., Schröter, Y. y Dietzel, L. (2012). Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Frontiers in Plant Science*, 3, 472 – 480.

Oliveira, M., Discola, K., Simone, V., Medrano, F., Guimarães, B. y Netto, L. (2010). Insights into the Specificity of Thioredoxin Reductase-Thioredoxin Interactions. A Structural and Functional Investigation of the Yeast Thioredoxin System. *Biochemistry*, 49, 3317 – 3326.

Pillay, C., Jan-Hendrik, H. y Rohwer, J. (2011). The logic of kinetic regulation in the thioredoxin system. *BMC Systems Biology*, 5, 342 – 348.

Pfalz, J., Liebers, M., Hirth, M., Grübler, B., Holtzegel, U., Schröter, Y., Dietzel, L. y Pfannschmidt, T. (2010). Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Frontiers in Plant Science*, 3, 250 – 254.

Pfannschmidt, T. (2010). Plastidial retrograde signalling – a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends in Plant Science*, 15, 427 – 435.

Reott, M., Parker, A., Rocha, E. y Smith, J. (2009). Thioredoxins in Redox Maintenance and Survival during Oxidative Stress of *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 10, 3384 – 3391.

Rochaix, J. (2011) Assembly of the Photosynthetic Apparatus. *Plant Physiology*, 155, 1493 – 1500.

Rosenberg, A., Ladem B., Chui, D., Lin, S., Dunn, J. y Studier, F. (1987). Vectors for selective expresión of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*, 56, 125 – 135.

Sakamoto, W., Miyagishima, S. y Jarvis, P. (2008). Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *American Society of Plant Biologists*, 119, 1100 – 1112.

Sanz-Barrio, R., Fernández-San Millán, A., Carballeda, J., Corral-Martínez, P., Seguí-Simarro, J., y Farran, I. (2011). Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *Journal of Experimental Botany*, 63, 365 – 379.

Schürmann, P. y Buchanan, B. (2008). The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1235 – 1274.

Schürmann, P. y Jacquot, J. (2000). Plant thioredoxin systems revisited. *Annual Reviews of Plant Physiology*. *Plant Mol. Biol.*, 51, 371 – 400.

Singh, Z., Singh, M., Zane, V., Nath, P. (2013). Mango - postharvest biology and biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32, 217 – 236.

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. y Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bibinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76 – 85.

Sotelo-Mundo, R. R., Lopez-Zavala, A. A., Garcia-Orozco, K. D., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez-Contreras, E. F., Valenzuela-Soto, E. M., y Kanost, M. R. (2007). The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. *Protein and peptide letters*, 14(8), 774.

Stehr, M., Schneider, G., Aslund, F., Holmgren, A. y Lindqvist, Y. (2001) Structural basis for the thioredoxin-like activity profile of the glutaredoxin-like NrdHredoxin from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 35836 – 35841.

Tang, C. y Altman, R. (2011). Remote thioredoxin recognition using evolutionary conservation and structural dynamics. *Structure*, 19, 461 – 470.

Tovar-Méndez, A., Matamoros, M., Bustos-Sanmamed, P., Dietz, K., Cejudo, F. Rouhrier, N., Sato, S., Tabata, S. y Becana, M. (2011). Peroxiredoxins and nadph-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 156, 1535 – 1547.

Ungerstedt, J., Sowa, Y., Xu, W., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X. y Marks, P. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A*, 102, 673 – 678.

Viera, C. y Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *TRENDS in Plant Science*, 11.

Vener, A., Ohad, I. y Andersson, B. (1998). Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 217 - 223.

Wong, J., Cai, N., Charlene, K., Vensel, W., Hurkman, W. y Buchanan, B. (2004). Thioredoxin Reduction Alters the Solubility of Proteins of Wheat Starchy Endosperm: An Early Event in Cereal Germination. *Plant Cell Physiology*, 45, 407 – 415.

Yahia, E. (2006). Modified and controlled atmospheres for tropical fruits. *Stewart Postharvest Review*. 5, 2212 – 2215.

Yong-Chun, L., Jiang-Ping, R., Myeong-Je, C., Su-Mei, Z., Yong-Bum, K., Hong-Xiang, G., Wong, J., Hong-Bin, N., Peggy, G., Lemauxb, O., Yina, J. y Buchanan, B. (2009). The Level of Expression of Thioredoxin is Linked to Fundamental Properties and Applications of Wheat Seeds. *Molecular Plant*, 2, 430 – 441.