



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

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MODELACIÓN
ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA DEHIDROASCORBATO
REDUCTASA (DHAR) DE MANGO (*Mangifera indica* L.)**

Por:

Deyanira Fimbres García

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

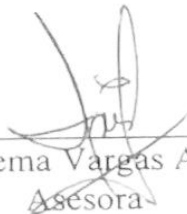
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Deyanira Fimbres García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



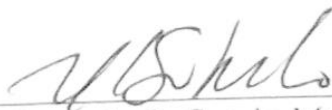
Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Directora de Tesis



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesora



Dra. Irasema Vargas Arispuro
Asesora

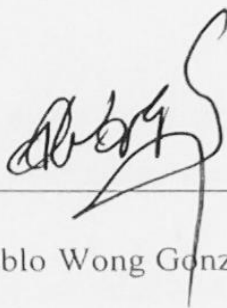


Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo
Asesor

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

A CONACYT, por el apoyo económico brindado al proyecto # CB2012-01-178296 que hizo posible la realización de este trabajo y además por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

A CIAD, por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta profesional.

A la Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, por recibirme en sus instalaciones y apoyarme en mis estudios.

A mi directora de tesis, la Dra. Carmen Contreras, por aceptarme como su hija académica, por siempre creer en mí y por apoyarme tanto académica como personalmente.

A la Dra. María Islas, por recibirme como un miembro más de su equipo de trabajo al abrirme las puertas de su laboratorio y por apoyarme en todo este trayecto.

A la Dra. Irasema Vargas, por aceptar ser miembro de mi comité, por sus consejos, sus porras y toda su ayuda durante este tiempo.

Al Dr. Rogerio Sotelo, por toda su ayuda, por sus recomendaciones, por el préstamo de equipos y de sus instalaciones que permitieron la realización de este trabajo.

Al equipo de trabajo de LANGEBIO, dirigido por el Dr. Luis Briebe y al M.C. Leonardo Fox por su apoyo en la obtención del constructo.

Al Dr. Aldo Arvizu de la Universidad de Sonora, por su ayuda en la modelación de la estructura y la purificación de la proteína.

Al laboratorio de Fisiología Vegetal dirigido por el Dr. Miguel Ángel, al M.C. Emmanuel y a Panchito, por su apoyo técnico y préstamo de equipos.

Al laboratorio del Dr. Martín Tiznado y al M.C. Javier Ojeda por el préstamo de material.

Al laboratorio de la Dra. Rosalba Troncoso y a Alberto Sánchez por su apoyo en el préstamos de equipos.

Al M.C. Jorge Mercado por todo su apoyo técnico y los ánimos durante mis largas jornadas de trabajo.

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio David, Jorge, Magda, Mitzuko, Lucía, Ángel, Chema y Eliezer, por hacer más llevaderos los momentos de trabajo.

Al laboratorio de estructura biomolecular, a la M.C. Karina García, Leo, Ignacio, por su ayuda brindada.

A mis compañeros de generación y mis AMIGOS, Cristóbal, Víctor, Cynthia, Yuri, Rocío, Julián, Ale, Karen, Ariel y Carmen por hacer de todo esto una experiencia inolvidable y compartir tantos momentos juntos.

A mis amigos externos a CIAD, Ericka, Mafer, Ale (las vivis), por su amistad y por su paciencia por mi falta de tiempo, por siempre estar conmigo. A Víctor Mariscal, Astrid, Samuel, María, por hacer posible que la amistad perdure desde la universidad y estar siempre ahí.

A mi amiga Yanira Ramírez, por no separarse de mí a pesar de no vernos seguido, te quiero amiga.

A Elenita, por su invaluable apoyo y por su compañerismo y amistad.

A mis Padres y mi hermano, porque directa o indirectamente me han apoyado desde siempre y comparten conmigo alegrías, tristezas y logros. En este logro tan importante para mi han contribuido en gran medida.

A toda mi familia, especialmente a mi abuela, a mis tíos y tías, a mis primos y a mis primas Perla, Judith, Karina, Valeria que son como mis hermanas y que siempre están en los momentos importantes.

A mi novio Cristóbal González, por llegar a mi vida en el momento preciso, por ser mi amigo y mi compañero, por caminar conmigo este trayecto, me encanta que compartiéramos también nuestro gusto por la ciencia. Gracias por tus palabras, por todo tu apoyo y por estar siempre conmigo en todo momento, por tu amor y por ser mi motor para seguir adelante, TE AMO.

Por último, gracias a DIOS, por darme vida, salud y fuerzas para cumplir esta meta.

DEDICATORIA

Sin duda alguna, esta dedicatoria es a mis abuelos que están en el cielo, me hubiera encantado compartir este y muchos logros con ustedes...

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Factores de Estrés Causantes de Daño Celular en Plantas.....	3
2.2. Sistema Antioxidante en Plantas Como Respuesta a Daño por Estrés.....	4
2.3. Ciclo Ascorbato-Glutatión, Proceso Clave Para el Balance Redox.....	6
2.4. Comportamiento de la Enzima Dehidroascorbato Reductasa Frente a Diversos Factores de Estrés.....	11
2.5. Características Generales de la Enzima DHAR.....	12
2.6. Mecanismo de acción de DHAR.....	19
2.7. El mango como modelo de estudio.....	21
III. HIPÓTESIS.....	23
IV. OBJETIVOS.....	24
4.1. Objetivo General.....	24
4.2. Objetivos Específicos.....	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Análisis de la Secuencia y Estructura de MiDHAR.....	25
5.1.1. Secuencia de MiDHAR.....	25
5.1.2. Modelación Estructural de MiDHAR.....	25
5.2. Expresión Heteróloga de DHAR Recombinante.....	26
5.2.1. Obtención del Constructo de DHAR en un Vector de Expresión.....	26

CONTENIDO (Continuación)	Página
5.2.2 Transformación de <i>E.coli</i> con el Constructo.....	26
5.2.3. Detección de Clonas Positivas.....	26
5.2.4. Sobreexpresión de DHAR Recombinante.....	27
5.3. Purificación de DHAR por Cromatografía Ni-NTA.....	28
5.3.1. Preparación del Clarificado.....	28
5.3.2. Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC).....	28
5.4. Determinación de la Actividad Enzimática de DHAR.....	29
5.5. Caracterización Cinética de DHAR.....	29
5.6. Caracterización Bioquímica de DHAR.....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1. Análisis de Secuencia.....	31
6.2. Análisis Estructural de DHAR.....	32
6.3. Sobreexpresión Heteróloga de DHAR.....	35
6.4. Purificación y Caracterización Bioquímica de MiDHAR Recombinante....	36
6.5. Caracterización Cinética de MiDHAR Recombinante.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas de biosíntesis de AsA en plantas.	8
2	Diagrama del ciclo Ascorbato-Glutatión.	9
3	Distribución de AsA en organelos fotosintéticos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	10
4	Estructuras cristalográficas de la enzima DHAR de diferentes plantas.	14
5	Alineamiento múltiple del dominio N-terminal de DHAR de varias plantas.	17
6	Mecanismo de acción propuesto para DHAR citosólica en espinaca.	21
7	Gen sintético (G-Block) de MiDHAR.	31
8	Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de DHARs.	32
9	Modelo estructural de DHAR de mango realizado por homología a la estructura cristalográfica de DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W).	34
10	Modelo de superficie de DHAR de mango realizado por homología a la a la estructura cristalográfica de DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W).	35
11	Perfil electroforético de sobreexpresión de DHAR.	36
12	Purificación de MiDHAR analizado por SDS-PAGE.	37
13	Fracciones puras de MiDHAR obtenidas por cromatografía IMAC.	38
14	Efecto del pH sobre la estabilidad de MiDHAR.	39
15	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de MiDHAR.	40
16	Regráfico resultante de la linearización de Lineweaver Burk	43
17	Mecanismo de catálisis propuesto para DHAR.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Actividad específica de DHAR recombinante por etapas de purificación.	37
2	Constantes cinéticas de MiDHAR para cada sustrato.	43
3	Constantes cinéticas de DHAR encontradas en varias plantas.	45

RESUMEN

Las plantas se encuentran expuestas de manera constante a diversos factores de estrés que las lleva a producir especies reactivas de oxígeno (ROS) adicionales a las generadas en el metabolismo celular, causándoles estrés oxidativo y daño celular. Para protegerse del daño oxidativo causado por ROS, las plantas cuentan con un sistema antioxidante, siendo el ascorbato (AsA) el principal antioxidante hidrosoluble en plantas. La cantidad de AsA es estrechamente controlada por sus rutas de síntesis y de reciclaje, donde el reciclaje tiene un importante rol en la respuesta y adaptación al estrés. En la vía de reciclaje de AsA, la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR), la cual es un miembro de la familia de las glutatión S-transferasas (GSTs) es clave para el mantenimiento del AsA reducido. El objetivo de este trabajo fue determinar las características bioquímicas y modelar la estructura tridimensional de la enzima DHAR de mango (MiDHAR). La proteína se sobreexpresó de forma heteróloga encontrándose en forma soluble y se purificó por cromatografía de afinidad a metales (Ni-NTA). Una vez purificada, se determinó su actividad enzimática así como su estabilidad a diferentes rangos de temperatura y pH. La proteína pura fue estable en un amplio rango de pH y temperatura conservando más del 80 y 75% de su actividad a pH 9 y 45°C, respectivamente. Por otra parte, MiDHAR mostró un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten y se determinaron las constantes cinéticas para sus sustratos, obteniendo una K_m y V_{max} para GSH de 5.63mM y 84.3 μ M min^{-1} y para DHA 0.77mM y 74.0 μ M min^{-1} respectivamente. A partir de la secuencia aminoacídica de MiDHAR, se obtuvo un modelo estructural por homología de la enzima, utilizando la estructura cristalina recientemente reportada de DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W) y se identificaron los posibles aminoácidos del sitio catalítico. Los resultados muestran que la MiDHAR es una enzima estable a valores de pH altos y es termoestable a las condiciones probadas, lo que podría brindarle resistencia en condiciones de estrés. Se sugiere un mecanismo catalítico de reducción tipo ping-pong, que sería necesario corroborar con otros estudios.

Palabras clave: DHAR, Ácido ascórbico, Ciclo ascorbato-glutatión, Cromatografía IMAC.

ABSTRACT

Constant exposure of plants to various stress factors leads to reactive oxygen species (ROS) production and oxidative stress, causing cellular damage. Plants have an antioxidant system to protect against oxidative damage caused by ROS, being ascorbate (AsA), the main water-soluble antioxidant in plants. The amount of AsA is strictly controlled by its synthesis and recycling pathways, where recycling plays an important role in the response and adaptation to stress. The dehydroascorbate reductase enzyme (DHAR), which is a member of the glutathione S-transferases (GSTs) family, is the key to maintain the reduced AsA in the recycling AsA pathway. The aim of the present study is to determine the biochemical and structural characteristics of a DHAR from mango. The protein was overexpressed in soluble form in a heterologous system and purified by metal affinity chromatography (Ni-NTA). Once purified, the enzyme activity and stability were determined at different ranges of temperature and pH. The purified protein was stable in a broad range of pH and temperature retaining more than 80 and 75% of its activity at pH 9 and 45°C, respectively. Furthermore, MiDHAR presented a Michaelis-Menten type behavior that was revealed by the kinetic constants determined for its substrates, obtaining a K_m y V_{max} for GSH of 5.63 mM and 84.3 $\mu\text{M min}^{-1}$, as well as for DHA 0.77 mM and 74.0 $\mu\text{M min}^{-1}$, respectively. A structural model of the MiDHAR was obtained by homology using the recently reported DHAR from rice (OsDHAR) (PDB: 5D9W); moreover, the possible residues of the catalytic site were identified. As shown by the results, the MiDHAR is an enzyme stable to high pH values and it is thermo stable at proved conditions, which could provide resistance to stress conditions. A ping-pong type reduction catalytic mechanism is suggested, that shall be required corroborate with further studies.

Keywords: DHAR, Ascorbic acid, ascorbate-glutathione cycle, IMAC Chromatography.

I. INTRODUCCIÓN

Por naturaleza las plantas se exponen constantemente a una gran diversidad de factores de estrés abiótico como sequía, salinidad, temperaturas extremas, ozono, radiación ultravioleta, entre otros. Por otra parte, las infecciones fúngicas, patógenos bacterianos, la infestación por herbívoros y plantas parasíticas, son causantes de estrés biótico en plantas. Con gran frecuencia estos factores de estrés conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando estrés oxidativo y daño celular.

Para protegerse del daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno, las plantas han desarrollado un amplio rango de sistemas de defensa que aumentan su resistencia a condiciones de estrés. Entre éstos se encuentran las enzimas antioxidantes, y metabolitos como el ascorbato (AsA), que es una de las moléculas antioxidantes más activas, localizada principalmente en sitios de generación de ROS (Noctor et al., 2000) donde desempeña su importante función.

El AsA es el principal antioxidante hidrosoluble en plantas y favorece la adaptación de las plantas a diversos factores de estrés. Su concentración es controlada por la síntesis, reciclaje, degradación y transporte, siendo la ruta del reciclaje primordial en la respuesta y adaptación al estrés en las plantas. En esta vía participa la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR), que pertenece a la familia de las glutatión S-transferasas (GSTs) y es clave para el mantenimiento del AsA reducido, así como de gran importancia para la resistencia a estrés abiótico en plantas. La DHAR se ha purificado y caracterizado de otras plantas y se ha propuesto que la eficiencia en la regeneración de AsA se debe al aumento de la expresión de DHAR.

Sin embargo, la falta de conocimiento de las características bioquímicas y estructurales que posee ésta enzima, resalta la importancia de estudiarla para comprender la manera

en la que lleva a cabo su función y así mantener los niveles de AsA reducido en la célula.

II. ANTECEDENTES

2.1. Factores de Estrés Causantes de Daño Celular en Plantas

Las plantas son por naturaleza inmóviles, razón por la cual durante su crecimiento están expuestas a una gran variedad de factores de estrés que afectan su metabolismo normal. Entre estos factores se encuentran la sequía, el frío, la salinidad, la radiación UV, los metales pesados, las temperaturas extremas, la deficiencia de nutrientes, la contaminación ambiental y los herbicidas, los cuales afectan su crecimiento y desarrollo. Como consecuencia, la exposición a estrés resulta en un incremento de ROS (McKersie, 1991). Así mismo, se enfrentan constantemente a infecciones por hongos, bacterias y patógenos virales, así como a la infestación por herbívoros y plantas parasíticas (Sun et al., 2015). Dentro de la célula vegetal, las ROS son continuamente formadas por reacciones biológicas del metabolismo incluyendo la fotosíntesis, la fotorespiración y la respiración, por lo tanto el cloroplasto, la mitocondria y los peroxisomas son fuente importante de ROS (Ding et al., 2008). Además, como ya se mencionó anteriormente, también son producidas por factores externos como lo son el estrés biótico y abiótico (Noctor et al., 2000). Independientemente de su fuente, la producción excesiva de ROS bajo condiciones anormales puede causar daño oxidativo de componentes celulares como proteínas, ácidos nucleicos y membranas lipídicas, lo que puede resultar en muerte celular (Wang et al., 2003).

Dentro de las principales ROS causantes de perturbar el balance redox de las células, se encuentran: El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($\cdot OH$). Los radicales superóxido son impermeables a la membrana y dismutan rápidamente a peróxido de hidrógeno ya sea de manera espontánea o por la acción de la

enzima superóxido dismutasa (Pandey et al., 2014). Por otra parte, se sabe que el H_2O_2 es también generado por medio de algunas reacciones mediadas por enzimas, como el metabolismo del glicolato en peroxisomas y la β oxidación de lípidos en la mitocondria; sin embargo, es moderadamente reactivo, relativamente estable y difunde a través de la membrana causando estrés oxidativo (Gill et al., 2010). Es importante mencionar que las ROS pueden causar daño celular pero también pueden actuar como señalizadores o inductores de respuesta ante estrés, esto dependerá del equilibrio que exista entre la producción de ROS y su eliminación en el sitio y tiempo apropiados (Knight y Knight, 2001).

El estrés abiótico es definido como las condiciones ambientales que reducen el crecimiento y el rendimiento por debajo de los niveles óptimos (Cramer et al., 2011). Una acumulación de ROS, como resultado de varios factores de estrés abiótico, es una de las principales causas de pérdida de productividad de cultivos en el mundo (Gill et al., 2010). Esto se atribuye a los múltiples daños que ocasionan en la célula vegetal, limitando así el crecimiento y desarrollo de la planta. Sin embargo, se ha demostrado que las plantas desarrollan respuestas a estrés que son dependientes del tejido u órgano afectado, para combatir el desbalance que crean las ROS en situaciones de estrés. Aunque se conoce de manera generalizada los tipos de respuesta que la planta desarrolla en defensa al estrés, existe poco énfasis en definir el comportamiento de tejidos vegetales específicos, incluso de los frutos, ante el estrés a lo largo de su desarrollo hasta la senescencia.

2.2. Sistema Antioxidante en Plantas como Respuesta a Daño por Estrés

A pesar de los múltiples daños causados por estrés, los frutos y los vegetales han desarrollado una amplia variedad de sistemas de defensa. Al exponerse a condiciones desfavorables, las plantas se someten a una situación de estrés y expresan respuestas de defensa, adquiriendo cierta resistencia al estrés abiótico. Tales respuestas celulares constan de la síntesis de proteínas contra el estrés, una sobreproducción de compuestos

antioxidantes y una acumulación de solutos compatibles para la célula (Vierling y Kimpel, 1992; Cushman y Bohnert, 2000; Wang et al., 2003). De esta manera, los frutos y los vegetales pueden enfrentarse a condiciones de estrés y situaciones ambientales no favorables y responder positivamente manteniendo su homeostasis.

Las ROS generadas principalmente por el estrés abiótico, inducen a la expresión de enzimas antioxidantes, cuya función primordial es reducir el daño oxidativo creado por ROS. Por consiguiente, se sabe que las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (Shin et al., 2013). Dentro de las enzimas antioxidantes se incluyen la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POX), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). Mientras que entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran aquellos que son hidrosolubles como el ascorbato, el glutatión, los compuestos fenólicos y los flavonoides; así como metabolitos liposolubles como α -tocoferol, β -caroteno y licopeno (Kumar et al., 2014).

Por otra parte, las enzimas glutatión transferasas, mejor conocidas como Glutatión S-transferasas (GSTs, EC 2.5.1.18), también son enzimas multifuncionales muy importantes en plantas. Estas enzimas detoxifican compuestos endógenos o endobióticos (de la propia célula) y xenobióticos (de origen externo) por conjugación del tripéptido glutatión (GSH) con una gran variedad de sustratos (Hayes et al., 2005). Las GSTs de plantas están subdivididas en siete clases: phi, zeta, tau, lambda, dehidroascorbato reductasa (DHAR), factor de elongación 1 gamma (EF1G) y tetraclorohidroquinona dehalogenasa (TCHQD); siendo lambda, DHAR, phi y tau específicas para plantas (Dixon et al., 2002). Las GSTs juegan un papel muy importante en respuesta a varios tipos de estrés, y sus niveles de expresión son altamente sensibles tanto a estrés biótico como abiótico, aseveración demostrada en estudios previos (Mohsenzadeh et al., 2012; Edwards y Cole, 1996; Chronopoulou et al., 2012).

De igual importancia, el ascorbato o ácido ascórbico (AsA), es el principal antioxidante hidrosoluble en plantas y desempeña un papel clave en la adaptación de las plantas a estrés ambiental. El AsA funciona como un importante antioxidante o reductor, en algunas vías como la regeneración de vitamina E en animales y en la detoxificación de

especies reactivas de oxígeno, entre otras funciones destacables (Chen et al. 2003; Bielen et al. 2013). Además la cantidad de AsA en las células es altamente regulada por su síntesis, reciclaje, degradación y transporte, de esta manera, se mantiene en cantidades óptimas para asegurar a las células en un ambiente redox.

2.3. Ciclo Ascorbato-Glutatión, Proceso Clave para el Balance Redox

El ascorbato, ácido ascórbico o vitamina C, es un derivado de la glucosa y es un componente no enzimático del sistema antioxidante, además como se mencionó anteriormente, es considerado el principal antioxidante hidrosoluble en plantas, encontrándose en cantidades milimolares (Gest et al., 2013).

En mamíferos, el AsA es partícipe en varios procesos fisiológicos cruciales como la reparación y el mantenimiento de huesos, dientes y cartílagos (Levine et al., 1995), en funciones cardiovasculares, desarrollo de inmunidad celular, en tejido conectivo y en la absorción de hierro no hemo, es decir el proveniente de alimentos vegetales (Cook y Reddy, 2001). Su deficiencia está directamente relacionada con la enfermedad del escorbuto y algunas otras enfermedades. Por otra parte, en plantas, el AsA tiene un importante papel en respuestas al estrés así como el crecimiento y desarrollo, y es uno de los metabolitos más abundantes que eliminan a las ROS generadas en procesos fisiológicos (Eltelib et al., 2011). Además el AsA, participa en mecanismos de defensa contra el ataque por patógenos y el estrés oxidativo ambiental, así mismo está implicado en la regulación de la división celular y expansión (Smirnoff, 1996).

De igual manera, en plantas el AsA es requerido por las giberelinas y en la síntesis de etileno, así como en reacciones catalizadas por dioxigenasas específicas dependientes de AsA (Davey et al., 2000). Entre otras de las varias funciones desempeñadas por el AsA, se incluye su participación como antioxidante o reductor en varias vías, incluyendo el ciclo de las xantofilas y la regeneración de vitamina E en animales (Pignocchi et al., 2003). Sin embargo, algunos invertebrados, insectos, peces, aves y mamíferos carecen de la capacidad de sintetizar AsA, tal es el caso del humano que tiene una mutación en el

gen que codifica para L-gulono-1,4-lactona oxidasa, la última enzima en la ruta de biosíntesis del AsA (Chatterjee, 1973), de tal manera que tiene que ser ingerido de fuentes dietarias, principalmente de plantas ricas en AsA.

En las plantas la cantidad de AsA en las células es equilibrada por su síntesis, reciclaje, degradación y transporte según lo indican varios estudios (Chen et al., 2003; Bulley et al., 2009). A la fecha han sido reportadas cuatro rutas de biosíntesis de AsA en plantas incluyendo la ruta de la L-galactosa (Wheeler et al., 1998), misma que ya ha sido bien caracterizada y propuesta como la principal vía de producción de AsA en plantas. El resto de ellas son la ruta de D-galacturonato, la ruta de L-gulosa y la de mioinositol (Agius et al., 2003; Wolucka y Van Montagu, 2003; Lorence et al., 2004) (Figura 1). La vía biosintética de AsA en plantas difiere de la de los mamíferos, y Smirnoff (1996) descubrió que el AsA es originado de L-galactosa, la cual bajo condiciones de oxidación es convertida a L-galactono-1,4-lactona en una reacción catalizada por L-galactosa deshidrogenasa dependiente de NAD. Enseguida es oxidada a L-ácido ascórbico por L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa localizada en mitocondria (Smirnoff, 1996). Algunos experimentos apoyan la explicación de esta vía, por ejemplo, se ha observado que en tejidos de hoja con precursores como L-galactosa o L-galactono-1,4-lactona se ha incrementado su contenido de AsA (Gallie, 2013). En otros estudios en *Arabidopsis* y *Medicago sativa* donde se aplicaron de manera exógena los mismos precursores, también hubo un incremento en AsA en hojas (Franceschi et al., 2002). Resultados similares se obtuvieron en hojas de papa así como en sus órganos y flores (Tedone et al., 2004).

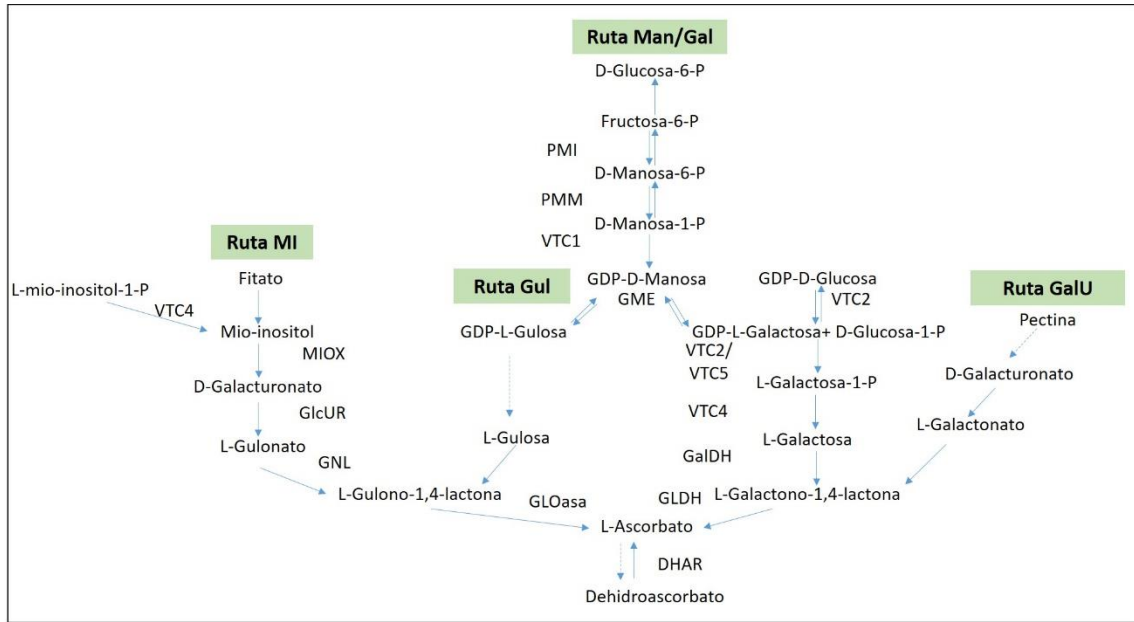


Figura 1. Rutas de biosíntesis de AsA en plantas. Fuente: Gallie, 2013.

Sin embargo, la síntesis de AsA es lenta, mientras que el reciclaje es mucho más rápido y además juega un importante papel manteniendo la homeostasis de AsA bajo condiciones de estrés (Stevens et al., 2008; Gallie, 2013). En el reciclaje de AsA, el ciclo ascorbato-glutatión o ciclo Halliwell-Asada desempeña el papel primordial. En este ciclo, en la reducción de H_2O_2 por APX, el AsA es oxidado para producir el radical de vida corta monodehidroascorbato (MDHA), el cual es directamente reducido a AsA mediante la acción de la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR). Por otra parte, al ser oxidado el AsA también puede generarse desproporcionadamente y de manera no enzimática el dehidroascorbato (DHA) y el AsA nuevamente. El DHA puede sufrir una reacción de hidrólisis irreversible y formar ácido 2-3 dicetogulónico, o bien ser reciclado a AsA por medio de la enzima DHAR. Dicha enzima para llevar a cabo su función utiliza GSH como reductor (Chen et al., 2003) (Figura 2) y es la enzima que contribuye mayormente al reciclaje de AsA, regulando así su estado redox.

Se ha demostrado la importancia de la enzima DHAR en el proceso de reciclaje de AsA y por consecuencia, el mantenimiento del balance redox en las células debido a que una

rápida reducción es crucial para mantener la capacidad antioxidante de AsA. Para esto se han realizado varios estudios y uno de ellos es la sobreexpresión de la enzima DHAR en hojas de tabaco y maíz, resultando en un incremento en el contenido de AsA (Chen et al., 2003). Este incremento de AsA fue acompañado por un incremento en GSH, resultando en un cambio en el estado redox intracelular. De esta manera se prueba que los niveles de vitamina C en plantas pueden ser elevados, no solo por la generación de mutantes en la vía de síntesis de AsA, sino también en el reciclaje de éste, donde DHAR tiene un papel primordial.

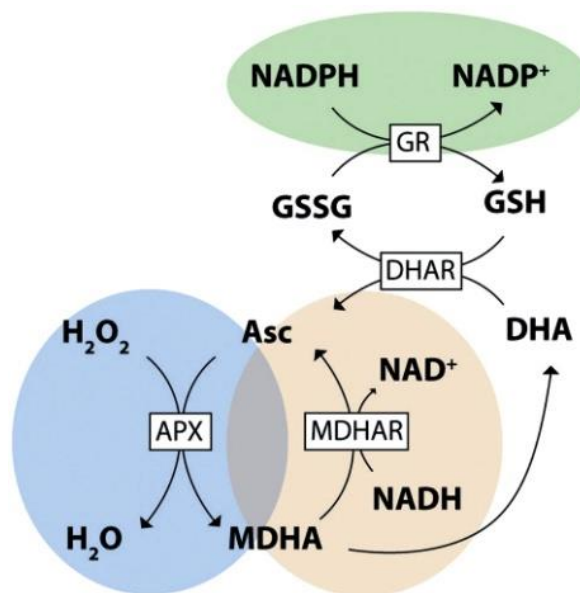


Figura 2. Diagrama del ciclo Ascorbato-Glutati6n. Este permite la detoxificaci6n de H_2O_2 a H_2O por medio de APX, as6 como el reciclaje de AsA. APX, ascorbato peroxidasa; Asc, ascorbato; DHA, dehidroascorbato; DHAR, dehidroascorbato reductasa; GR, glutati6n reductasa; GSH, glutati6n reducido; GSSG, glutati6n oxidado; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato reductasa; $NAD(P)H/NAD(P)^+$, nicotinamida adenina dinucleotido (fosfato) reducido/oxidado. Fuente: Gest et al., 2012.

Dentro de las plantas, el AsA puede ser acumulado principalmente en 6rganos fotosint6ticos; sin embargo, tambi6n puede ser encontrado en altas concentraciones en tejidos no fotosint6ticos. Esto depender6 en gran medida de los factores ambientales, del genotipo y del estado de desarrollo (Davey et al., 2000) (Figura 3). Generalmente, el AsA est6 presente en tejido meristem6tico, flores y frutos. Los frutos son considerados la

principal fuente de AsA; sin embargo, existe una variabilidad en las concentraciones de éste dependiendo del fruto. En cítricos, las concentraciones varían de un cítrico a otro, así el kiwi puede presentar valores de 7 $\mu\text{mol/g}$ FW, mientras que la pulpa del fruto camu-camu (*Myrciaria dubia*) así como el fruto de gubinge (*Terminalia ferninandiana*) tienen valores de 170 $\mu\text{mol/g}$ FW. Además, los niveles de AsA pueden variar dentro de la misma especie, como el tomate, en donde *Solanum pennellii* contiene más AsA que los cultivares tradicionales de *Solanum lycopersicum* (Stevens et al., 2007).

A pesar de esto, el aumento en los niveles de AsA por medio de la vía de reciclaje del mismo es pobremente explotado en frutos. La información es casi completamente dirigida al estudio en plantas como tabaco (*Nicotiana tabacum*), en las cuales al sobreexpresar DHAR, la enzima clave para la resíntesis de AsA, éste último es incrementado. Al incrementar los niveles de AsA se provee gran protección a la planta contra ozono y H_2O_2 , incluso contra otros factores de estrés abiótico (Chen et al., 2005). Es por esto que se propone la sobreexpresión de DHAR en frutos, ya que la sobreexpresión de ésta enzima o algunas otras participantes en el reciclaje, serían de gran importancia, tanto nutricional como económica, para proveer conocimiento en estrategias para modificar los niveles de AsA y mantener a los frutos en un balance redox.

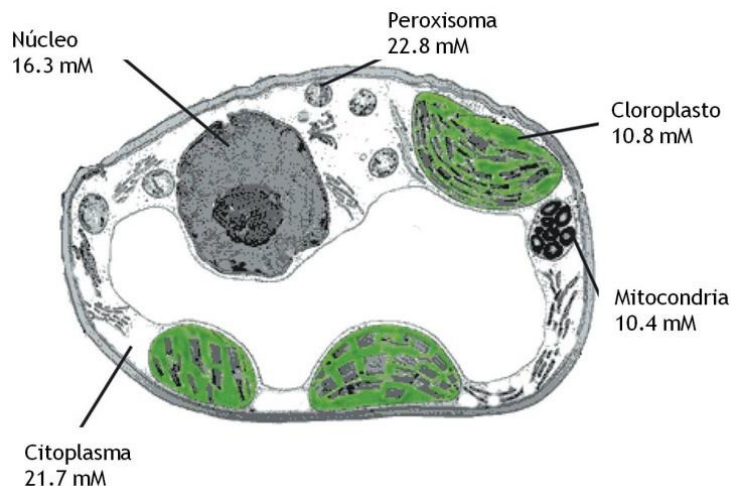


Figura 3. Distribución de AsA en organelos fotosintéticos de *Arabidopsis thaliana*. Fuente: Zechmann et al., 2011.

2.4. Comportamiento de la Enzima Dehidroascorbato Reductasa Frente a Diversos Factores de Estrés

La enzima DHAR ya ha sido purificada y caracterizada de algunas plantas como espinaca, papa y arroz (Dipierro et al., 1991; Hossain et al., 1984; Shimaoka et al., 2000; Urano et al., 2000). En varios estudios publicados hasta la fecha, se ha reportado el incremento de esta enzima como respuesta a varios factores de estrés como cadmio, silicio, ósmosis, temperatura, sequía y ácido salicílico (Aravind et al., 2005; Lu et al., 2008; Saruhan et al., 2009; Zhu et al., 2004). Además, por la importancia ya mencionada de la DHAR en la regeneración de AsA, se ha mostrado que la eficiencia de esta regeneración es debida al aumento en la expresión de DHAR. Es así como se ha comprobado que la sobreexpresión transgénica de DHAR en hojas de *Nicotiana tabacum* muestra un incremento en AsA reducido, y la supresión de dicha enzima causa el efecto contrario (Eltayeb et al., 2006). De igual forma, la sobreexpresión de DHAR citosólica de *Arabidopsis thaliana* en *Nicotiana tabacum* incrementa la tolerancia a sequía, ozono e incluso a aluminio (Yin et al., 2010).

En cuanto a frutos, en tomate se ha demostrado que un aumento de AsA a través de la sobreexpresión de DHAR, le confiere tolerancia al herbicida metil viológeno y estrés salino (Li et al., 2012). Sin embargo, el estudio del comportamiento de ésta enzima ante diversos factores de estrés, está mayormente enfocado a plantas como las ya mencionadas (*Arabidopsis*, tabaco y papa) en donde la tolerancia a estrés como salinidad, luz, altas temperaturas y metil viológeno se ha incrementado.

Otros reportes, explican que los niveles de transcritos de DHAR en arroz se ven afectados por temperaturas altas pero no por temperaturas bajas. Por otra parte, en *Arabidopsis*, se mostró que gracias a la expresión transgénica de DHAR hubo 46.2 % menos daño a la membrana causada por altas temperaturas (40°C) comparada con la forma silvestre (Wang et al., 2010). En el estudio realizado por (Pandey et al., 2014) se determinaron los perfiles de expresión de DHAR aislada y purificada de *Pennisetum glaucum* en respuesta a estrés abiótico, como temperatura y salinidad extremas. Como resultado de la caracterización de la enzima purificada se obtuvo que la temperatura

óptima para DHAR varía entre 30 y 50°C, lo cual sigue su desempeño en condiciones de extrema temperatura.

A causa de la escasa investigación referente a la expresión de dicha enzima para la regeneración de AsA en frutos como el tomate, como ya fue descrito anteriormente, se realizó una investigación basada en sobreexpresar DHAR en esta planta y establecer una relación con los niveles de AsA. Contradictoriamente a lo ya reportado en *Arabidopsis* y tabaco, la sobreexpresión de DHAR en tomate no tuvo como resultado el incremento en los niveles de AsA en los tejidos fotosintéticos. Sin embargo, en condiciones de poca luz, se observaron aumentos en los niveles de AsA por la sobreexpresión de DHAR en frutos maduros y verde maduros en relación a la forma silvestre. Por otra parte, MDHAR redujo los niveles de AsA solamente en la fruta verde madura (Haroldsen et al., 2011).

2.5. Características Generales de la Enzima DHAR

La DHAR (E.C. 1.8.5.1) es miembro de la familia de las GSTs, pero a diferencia de otras GSTs, DHAR es una proteína monomérica. La familia de proteínas GST se caracteriza por compartir una estructura tridimensional similar y poseer un conjunto de residuos altamente conservados, implicados en la unión a glutatión en su sitio activo denominado sitio G. Además, contienen un dominio de unión hidrofóbico o sitio H, conformado por residuos menos conservados, los cuales coordinan la unión a co-substratos de naturaleza hidrofóbica como algunos xenobióticos.

Para la mayoría de las clases de GSTs, el sitio G está conformado por un aminoácido singular que es serina, el cual le permite interactuar con el grupo sulfhidrilo del glutatión (GSH), para catalizar una serie de reacciones químicas (Dixon et al., 2011). En plantas, todas las GSTs descritas son dímeros compuestos por subunidades de aproximadamente 25 kDa, y en base a su similitud de secuencias y organización de genes, es como se han clasificado en las siete clases ya mencionadas (ϕ , τ , λ , ζ , EF1G, DHAR y TCHQD) (Dixon et al., 2002).

A diferencia de las anteriores, la DHAR es una proteína monomérica y de un peso molecular aproximado a 25 kDa (Dixon et al., 2002). Además poseen cisteína en su sitio activo en lugar de serina como el resto de las GSTs, razón por la cual son denominadas “cisteinil” GSTs, donde se incluye a la clase lambda de las GSTs que también contiene cisteína en su sitio activo. La sustitución de este aminoácido en el sitio activo cambia completamente el perfil de reactividad de estas enzimas, en donde esta cisteína puede formar reversiblemente un enlace disulfuro con el grupo tiol del GSH, creando así la capacidad para reducir sustratos (Dixon et al., 2011).

En cuanto a la estructura de la DHAR, ésta posee el típico plegamiento de las GSTs, conteniendo un dominio N-terminal, un gran dominio C-terminal y una pequeña región ligadora o linker. Este tipo de estructura fue predicha con base en modelos por homología de DHARs de la conífera *Pinus bungeana*, del kiwi *Actinidia chinensis* y de la gramínea *Pennisetum glaucum* así como del álamo *Populus tomentosa* (Pandey et al., 2014; Liu et al., 2015; Yang et al., 2009; Tang y Yang, 2013). A pesar de que la DHAR pertenece a la familia de GSTs, no tienen actividad de conjugación de GSH con sustratos xenobióticos estándar para GSTs, como 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa -1,3-diazol (NBD-Cl) o 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (DCNB) (Tang y Yang, 2013). Sin embargo, la DHAR puede reducir DHA a AsA utilizando GSH como sustrato reductor, lo cual podría atribuirse a una conformación en el sitio activo muy selectiva.

Recientemente se reportó la primera estructura cristalográfica de una DHAR de arroz (OsDHAR) (Do et al., 2016) (Figura 4), hallazgo que proporciona información para una comprensión más fina y exacta del comportamiento de la enzima. En este mismo año, se obtuvo la estructura cristalográfica de dos DHAR más, una corresponde al álamo *Populus trichocarpa* (PtDHAR3A) y la otra a *Pennisetum glaucum* (PgDHAR) (Lallement et al., 2016; Das et al., 2016) (Figura 4). Anteriormente se habían obtenido modelos generados por homología a partir de proteínas similares, como la proteína intracelular de canal de cloro (CLIC1), cuya estructura obtenida por difracción de rayos X está reportada (Arnold et al., 2006). Sin embargo, tales modelos generales fueron mayormente hechos para plantas, y no se tienen este tipo de estudios para frutos a pesar

de que desde 2003 fueron identificados dos genes DHAR en manzana y kiwi (Chew et al., 2003). Las nuevas estructuras cristalográficas de OsDHAR, PtDHAR3A y PgDHAR han sustituido a CLIC1 como templado para construir modelos más precisos de DHAR.

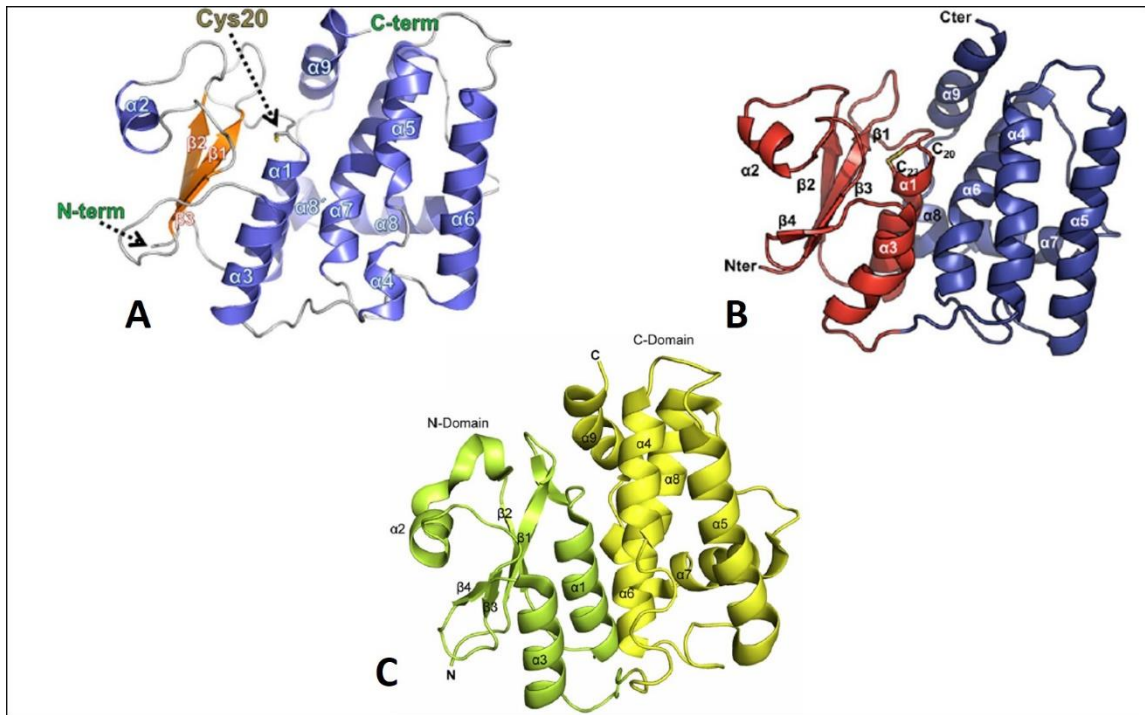


Figura 4. Estructuras cristalográficas de la enzima DHAR de diferentes plantas. A) DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB ID: 5D9W), B) DHAR de *Populus trichocarpa* (PtDHAR3A) (PDB ID: 2N5F), C) DHAR de *Pennisetum glaucum* (PgDHAR) (PDB ID: 5IQY). Dominio N-terminal con motivos alternados α hélice y hojas β . Dominio C-terminal consistiendo mayormente en motivos α hélice. Fuente: Do et al., 2016; Lallement et al., 2016; Das et al., 2016.

Las enzimas DHARs de plantas son codificadas por una familia multigénica y existen al menos dos isoformas conocidas, una es cloroplástica y la otra citosólica (Yoshida et al., 2006). Sin embargo aún se desconoce cuál de estas dos isoformas contribuye mayormente a mantener el pool de ascorbato reducido. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se encontraron cuatro genes de DHAR, mientras que para los álamos *Populus trichocarpa* y *Populus tomentosa* fueron encontrados tres. De las cuatro DHARs de *A. thaliana*, se predijo que dos eran citosólicas y dos cloroplásticas (Dixon et al., 2002). Por otra parte, a pesar de que las DHARs de *P. trichocarpa* tuvieron patrones de

expresión similares, mostraron diferentes actividades enzimáticas hacia DHA (Lan et al., 2009), lo mismo sucedió para las tres DHARs de *P. tomentosa* (Tang y Yang, 2013). Estos estudios revelan que la familia de genes DHAR de plantas podría ser funcionalmente divergente.

Se reportó un estudio en el 2013 en donde se clonaron tres genes DHAR de *P. tomentosa* y se evaluaron varios factores, como sus patrones de expresión, localización subcelular y sus características catalíticas, principalmente (Tang y Yang, 2013). En el análisis de la secuencia se encontró el residuo de cisteína 20, conservado en todas las DHAR que fueron alineadas, por lo cual le atribuyen una importancia como parte del sitio catalítico de la enzima. Para corroborar esta aseveración sustituyeron este aminoácido por alanina, y como consecuencia DHAR no mostró ninguna actividad hacia DHA. Además, se encontró que los residuos Asp72 y Ser73 fueron conservados en todas las DHARs de plantas. De esta manera, es como puede obtenerse un conocimiento cada vez más claro sobre las características de la enzima que le permiten llevar a cabo su función.

Debido a la escasa información que se tiene en cuanto a las características estructurales y bioquímicas de DHAR, se han realizado varios estudios principalmente en plantas. Análisis de secuencias de DHAR de varias plantas mostraron un porcentaje de identidad de entre el 75 y el 80%. Gracias a la comparación por alineamiento múltiple realizado en este trabajo, pudieron visualizarse residuos conservados en todas las DHAR analizadas, los cuales se propone que forman parte del sitio activo de la enzima o bien, que le brindan estabilidad para poder llevar a cabo su función reductora. Además, se observó que el dominio N-terminal fue más conservado que el dominio C-terminal en todas las secuencias de DHAR comparadas (Figura 5).

En este contexto, además de los análisis realizados en DHARs de *P. tomentosa*, en plantas como *Pennisetum glaucum* y patata dulce (*Ipomoea batatas* [L.]) también se han llevado a cabo análisis de la secuencia aminoacídica de esta proteína, y sólo en *P. glaucum* se propone que los residuos de Cys6 y la Cys20 forman parte del sitio activo de la enzima (Jiang et al., 2008; Tang et al., 2013). En el caso de patata dulce y *P. tomentosa* se propone solo a la Cys20 como parte del sitio activo y responsable de llevar a cabo la función reductora de la enzima. Cabe destacar que tanto en patata dulce como

en las otras DHAR evaluadas se observó la presencia del motivo CxxS, mismo donde se encuentra localizado Cys20. Los motivos CxxS y CxxC son frecuentemente conservados en enzimas redox dependientes de tiol (Jiang et al., 2008). Shimaoka y colaboradores (2003) han proporcionado información donde aclaran que el residuo de cisteína en la primera posición de este motivo tiene el papel clave en la formación de un puente disulfuro con GSH, el cual es esencial para la conversión de DHA a AsA.

Además de Cys20, se propone a los residuos Lys8, Pro61, Asp72 y Ser73, como componentes críticos en el sitio activo, que contribuyen a la actividad catalítica de la enzima DHAR en *P. tomentosa*, sin embargo, de entre ellos, solo Pro61 y Asp72 actúan estabilizando la estructura del sitio activo (Tang y Yang, 2013). Dichos hallazgos fueron basados en comparaciones con la secuencia aminoacídica de CLIC1, en donde se observó que Cys24, Pro65 y Asp76 formaban parte del sitio G e interactuaban directamente con GSH.

Estudios similares, en cuanto a análisis de secuencia, se han hecho en arroz, ajonjolí, espinaca, acerola y pino, entre otros (Eltelib et al, 2010; Shimaoka et al., 2003; Yang et al., 2009), destacando los dominios conservados y los residuos responsables de la actividad catalítica, así como la identificación de los motivos característicos ya mencionados.

Por otra parte, gracias a la estructura cristalográfica de OsDHAR se han elucidado otros residuos como parte del sitio catalítico, los cuales son altamente conservados en todas las DHAR reportadas (Figura 5). Como parte de la interacción con AsA se proponen los residuos Cys20 (encargado de realizar la función reductora), Lys8, Lys210, Trp207, Pro21, Phe104 y Ser23 (Do et al., 2016). En la unión de GSH interactúan los mismos residuos y adicionalmente His160.

Continuando con lo ya descrito, en *P. trichocarpa* se encontraron tres DHAR, mismas que fueron analizadas por localización subcelular y solo una de ellas (PtDHAR1) resultó ser cloroplástica, el resto se encontró en citosol (Lallement et al., 2016). PtDHAR2 contiene dos cisteínas en el dominio N-terminal y solamente una forma parte del sitio catalítico, encontrándose en el motivo CxxS. Curiosamente PtDHAR 1 y 3, una

cloroplástica y la otra citosólica respectivamente, contienen tres cisteínas en el dominio N-terminal, dos de ellas formando parte del sitio catalítico, por lo tanto se encuentran dentro del motivo CxxC. A diferencia de lo aseverado en otros estudios, en donde se atribuye el papel catalítico a la primer cisteína contenida en este motivo, en esta investigación se comprobó que ambas cisteínas contribuyen fuertemente para que DHAR realice su función eficazmente (Lallement et al., 2016).

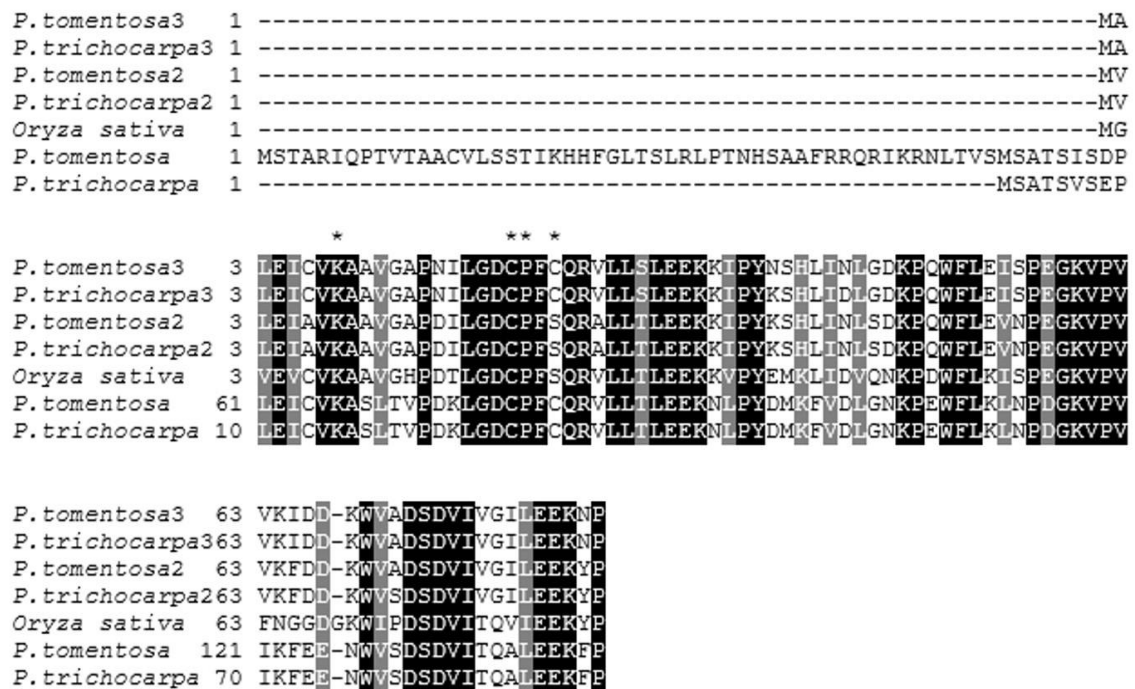


Figura 5. Alineamiento múltiple del dominio N-terminal de DHAR de varias plantas. DHAR 1 de *Populus tomentosa*; DHAR 2 de *Populus tomentosa*; DHAR 3 de *Populus tomentosa*; DHAR 1 de *Populus trichocarpa*; DHAR 2 de *Populus trichocarpa*; DHAR 3 de *Populus trichocarpa*; DHAR de *Oryza sativa*. Los residuos conservados son marcados en negro. Los posibles aminoácidos en el sitio catalítico que forman parte del dominio tiorredoxina son marcados con asterisco.

De este modo, se realizaron variantes de PtDHAR3A en donde se sustituyó a la Cys20 y a la Cys6 por Serina y la actividad fue 10 veces menor y al obtener una mutante de PtDHAR3A C6S, C23S solo se conservó aproximadamente 0.015% de la actividad de la proteína silvestre (Lallement et al., 2016). De acuerdo a lo anterior se especula que aunque las cisteínas de forma individual no tengan un impacto importante, son necesarias en conjunto para la actividad enzimática de DHAR. En la estructura cristalográfica de PtDHAR3A, 21 residuos de los 35 que son conservados en las DHAR

se encuentran localizados en proximidad a la Cys20 lo que sugiere un sitio activo muy conservado. En la interacción de PtDHAR3A con GSH se ha propuesto que interaccionan Asp72, Ser73, Cys20, Val60 y Lys47, residuos presentes en el sitio G. Por otra parte, en la interacción con DHA intervienen los residuos Asp19, Lys209, Lys111, Lys156 y Cys20 (Lallement et al., 2016).

En cuanto a la estructura resuelta para PgDHAR, se observó la presencia de los dominios N-terminal y C-terminal conectados por una región ligadora rica en prolina (Harrop et al., 2001). El dominio N-terminal consiste de una topología de hélices α y hojas β ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$) que es característico al plegamiento de tiorredoxina, mientras tanto el dominio C-terminal se constituye solamente de hélices α . Se probaron ligandos no específicos para resolver los aminoácidos presentes en el sitio activo y se propuso que en la unión de GSH al sitio activo de la enzima participan los residuos Pro61, Asp73, Ser74 y Cys20, en cambio en la interacción con DHA intervienen Gly206, Lys8, Asp19 y Cys20 (Das et al., 2016). La información proporcionada gracias a la obtención de las tres estructuras cristalográficas, es de gran utilidad para comprender la función de la DHAR y nos permite realizar comparaciones más exactas a la hora de obtener modelos por homología.

Además del análisis de secuencia, se ha llevado a cabo una caracterización bioquímica y cinética de la DHAR. Tal es el caso de la DHAR de *Pinus bungeana* (Yang et al., 2009) en donde se encontró que la enzima es estable a 55°C aproximadamente y presenta valores de K_m y V_{max} para DHA de 0.08 ± 0.01 mM y 34.12 ± 0.79 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína, respectivamente. Para GSH los valores de K_m y V_{max} fueron 1.03 ± 0.05 mM y 136.20 ± 6.85 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína respectivamente.

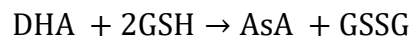
Estudios similares fueron realizados en *P. glaucum* (Pandey et al., 2014) y en *P. tomentosa* (Tang et al., 2013), en donde se reportó una temperatura óptima para DHAR entre 30 y 50°C para la primera y de 55°C para la segunda. El pH óptimo tanto para *P. glaucum* como para *P. tomentosa* fue de 6.5-8.5 y de 7, respectivamente. En cuanto a los valores de K_m y V_{max} , se reportaron una K_m^{DHA} de 0.1334 mM y V_{max}^{DHA} de 35.84 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína y una K_m^{GSH} de 0.04167 mM y V_{max}^{GSH} de 15.7728 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de proteína para *P. glaucum*. En algunos casos, se encontraron ligeras

diferencias comparando las DHAR estudiadas. Esto confirma que existe una divergencia entre DHAR de plantas, sin embargo, el comportamiento en general de esta enzima, es muy similar en todas las plantas.

2.6. Mecanismo de Acción de DHAR

Las enzimas reductoras, específicamente las reductoras de DHA, contienen el motivo CxxC o CxxS. Esto ha sido demostrado por mutagénesis dirigida, por ejemplo en una tioltransferasa de hígado de cerdo, donde se observó que la Cys22 era esencial para la reducción de DHA (Washburn et al., 1999). En el caso de las plantas, la posición de esta Cys puede variar, sin embargo el motivo CxxC o CxxS sigue siendo identificado. Para comprender la manera en la que la enzima DHAR reduce a DHA, se realizaron estudios cinéticos en espinaca y se mostró que la catálisis por la enzima DHAR es llevada a cabo por medio de un mecanismo bi-uni-uni-uni-ping-pong (Shimaoka et al., 2003).

Durante la catálisis, se forma un puente disulfuro entre la enzima reaccionando con DHA y el GSH, y se sabe que la cisteína es esencial para la actividad de DHAR. La DHAR cataliza la reducción de DHA a AsA utilizando GSH como donador de electrones como se muestra en la siguiente reacción:



Primeramente, se une de manera libre el DHA a la enzima DHAR y por tanto el sustrato que se une más tarde es el GSH. El primer producto generado entonces, es el AsA y la manera en la que ocurre es gracias al grupo sulfhidrilo de la cisteína en la enzima reducida que reacciona con DHA para producir AsA, y la enzima DHAR queda en su forma oxidada E-S-SG. Una segunda molécula de GSH reduce a la enzima oxidada y se genera la enzima reducida E-S y el glutatión oxidado (GSSG) tal como se ejemplifica en la figura 6.

Aunque este mecanismo propuesto para explicar la reacción de catálisis por la enzima DHAR fue elucidado y estudiado en espinaca, puede generalizarse para DHAR de otras plantas, debido a que los estudios realizados a la fecha demuestran que éstas contienen el motivo característico CxxC o CxxS, en donde la cisteína juega el papel primordial para que la reacción de reducción se lleve a cabo.

De igual manera, gracias a la obtención de la estructura cristalográfica de DHAR, se logró elucidar tanto los aminoácidos presentes en el sitio activo y que interaccionan de manera particular con cada sustrato, así como las características bioquímicas, que en conjunto con los datos estructurales nos permiten entender el mecanismo por el cual la enzima realiza su función. De este modo, se destaca el estudio de DHAR de arroz (Do et al., 2016), donde se propone un mecanismo para la reducción de DHA dependiente de GSH para reciclar el AsA. En este mecanismo se sugiere que la función de la enzima se realiza en dos etapas, en la primer etapa ocurre la unión de DHA a la enzima DHAR por medio de la Cys20, además Lys8 podría desempeñar un importante papel en el reconocimiento de DHA. El producto liberado en esta etapa es el AsA y la generación del ácido sulfénico de la Cys, donde Ser23 podría estabilizar al residuo de Cys ionizado. Por otra parte, en la segunda etapa, ocurre la reducción de la Cys ionizada y la regeneración de la enzima por la unión de una primer molécula de GSH al sitio G de la enzima y posteriormente la unión de una segunda molécula de GSH al sitio H de la enzima (Do et al., 2016).

Lo anterior confirma los hallazgos de Shimaoka y colaboradores (2003), debido a que el mecanismo propuesto es muy parecido, aunque hoy se sabe que una de la moléculas de GSH se une al sitio hidrofóbico de la enzima y no al sitio G. Sin embargo, para comprender de manera más precisa el mecanismo catalítico de la DHAR es necesario la realización de la caracterización cinética de estas enzimas.

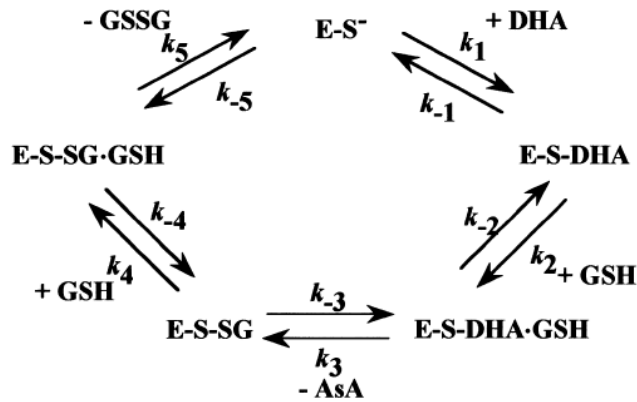


Figura 6. Mecanismo de acción propuesto para DHAR citosólica en espinaca (Shimaoka et al., 2003).

2.7. El Mango como Modelo de Estudio

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto miembro de la familia Anacardiaceae la cual incluye numerosos frutos tropicales. Es nativo del sur de Asia de donde ha sido distribuido mundialmente hasta convertirse en uno de los frutos tropicales mayormente cultivados con una gran importancia económica. El mango es considerado uno de los frutos mundiales de elección para consumo por su apariencia atractiva y su sabor único, además de sus múltiples propiedades nutricionales. De entre los frutos tropicales, el mango es de los principales frutos producidos en cantidad y valor. México es uno de los principales productores de mango y el segundo mayor exportador, teniendo una producción anual de 1,775,506.77 ton (SIAP, 2015).

El mango es una rica fuente de compuestos bioactivos como β -caroteno, ácido ascórbico y fenoles totales lo que le confiere una gran capacidad antioxidante. Estos compuestos antioxidantes difieren en tipo y cantidad por la variedad de mango, la parte de la planta, el estado de madurez y su manejo tanto pre como poscosecha (González-Aguilar et al., 2008). El mango es rico en ácido ascórbico, específicamente el cultivar “Ataulfo”, que puede tener hasta 158.5 mg por 100 g de peso fresco, de tal forma que aproximadamente 100 gramos de pulpa es suficiente para satisfacer el 146, 69 y 45 % de la ingesta diaria recomendada de ácido ascórbico en Mexicanos de 4-8, 9-18 y 19-50 años respectivamente (Wall-Medrano et al., 2014). Sin embargo los niveles de AsA se ven

afectados por múltiples factores, mencionados anteriormente, por lo cual es de interés conocer los efectos de estos factores, como el estrés, sobre las concentraciones y variaciones en los niveles de este antioxidante en frutos como el mango.

El proceso de regeneración de AsA es importante para mantener los niveles de este antioxidante en las células y la enzima DHAR desempeña un papel clave en dicho proceso. En el mango no se han reportado estudios de esta enzima a la fecha. En nuestro grupo de trabajo, a partir de un transcriptoma de mango, se han identificado dos secuencias que codifican para DHAR. Por medio de análisis de las secuencias con otras depositadas en bases de datos, se identificó que una es de origen citosólico y la otra cloroplástico. Con esto, surge la inquietud de realizar un análisis profundo de esta proteína que pudiera contribuir a la comprensión de su función y la manera en la que la lleva a cabo.

Por lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar las características bioquímicas y estructurales de la DHAR citosólica de mango (MiDHAR) y determinar su similitud con las DHAR de plantas que ya han sido caracterizadas bioquímica, cinética y estructuralmente. Esto ayudará a entender el mecanismo de su actividad reductora, y a proponer mediante el modelo la relación función-estructura. Además, su purificación a partir de sobreexpresión heteróloga nos permitirá en un futuro, obtener una estructura cristalina que nos ayudará a conocer más a detalle su mecanismo catalítico.

III. HIPÓTESIS

La enzima DHAR recombinante de mango (MiDHAR) mantiene su actividad a temperaturas altas y pH básico.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar las características bioquímicas y el modelo estructural de la enzima dehidroascorbato reductasa de mango (MiDHAR).

4.2. Objetivos Específicos

1. Obtener un modelo estructural de la enzima MiDHAR por homología.
2. Obtener la enzima MiDHAR pura por medio de sobreexpresión heteróloga y mediante cromatografía IMAC.
3. Determinar las características bioquímicas y cinéticas de la MiDHAR recombinante.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Análisis de la Secuencia y Estructura de MiDHAR

5.1.1. Secuencia de MiDHAR

La secuencia codificante para DHAR de mango (MiDHAR) fue obtenida a partir del transcriptoma de mango cv. Ataulfo (Dautt et al., 2015) del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas de CIAD. La secuencia deducida de aminoácidos fue identificada como DHAR por medio de un análisis mediante el algoritmo BLAST comparando con otras secuencias de la base de datos no redundante de GenBank (NCBI). Se identificaron los aminoácidos en el sitio catalítico y las regiones conservadas por medio de los servidores ClustalW (EMBL-EBI) y BoxShade (ExpASy).

5.1.2. Modelación Estructural de MiDHAR

A partir de la secuencia deducida de aminoácidos, se elaboró un modelo de la estructura de MiDHAR por reemplazo molecular utilizando como molde la estructura cristalina de la DHAR de arroz (OsDHAR) depositada en la base de datos Protein Data Bank (PDB: 5D9W), por medio del software MOE versión 2012.10 (Zhou et al., 2003).

5.2. Expresión Heteróloga de DHAR Recombinante

5.2.1. Obtención del Constructo de DHAR en un Vector de Expresión

El marco de lectura abierto de la secuencia del cDNA de MiDHAR (incluyendo el codón de terminación) fue optimizada para la lectura de codones en *E.coli*, y fue utilizada para obtener el constructo en el vector de expresión pET19b (Novagen), por medio de un gen sintético G-block (IDT). El gen sintético MiDHAR fue clonado en el vector de expresión por medio de los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. Este vector contiene el gen *bla* el cual confiere resistencia a ampicilina, además de una cola de polihistidinas (10x His-Tag) que permitió su purificación.

5.2.2. Transformación de *E.coli* con el Constructo

El plásmido recombinante con cDNA codificando para MiDHAR (constructo) se introdujo en células de *E. coli* BL21 Gold (DE3) por medio de choque térmico (transformación por choque térmico). Se utilizó 1 μL del constructo ($91.7 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) y 50 μL de bacterias competentes, las cuales previamente se enfriaron en hielo por 10 min y se incubaron a 42°C por 1 minuto para realizar el choque térmico. Posteriormente se adicionaron 250 μL de medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) para la recuperación de las bacterias transformadas, incubando a 37°C por 1 hora con agitación constante. Una vez transformadas las células con el constructo se sembraron en placas con medio sólido LB (Luria-Bertani), adicionado con ampicilina ($100 \mu\text{g/mL}$) para poder identificar las clonas positivas, y se incubaron a 37°C por 24h.

5.2.3. Detección de Clonas Positivas

Por medio del crecimiento en medio LB y su resistencia al antibiótico ampicilina, se seleccionaron las colonias positivas a la transformación, las cuales se analizaron por

PCR de colonia. Para la PCR se utilizó como templado el sobrenadante de una colonia positiva lisada e iniciadores específicos para el vector (iniciadores universales T7), para verificar la presencia del constructo dentro de la célula. Las condiciones para la PCR fueron: Una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos que constan de una desnaturalización a 94° por 1 minuto, un alineamiento a 50°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto y por último, una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación de las colonias positivas se analizaron por medio de electroforesis en agarosa al 1% utilizando Gel Red (Biotium) para su visualización por medio de un equipo de fotodocumentación (GelDoc™ EZ). Se corroboró la secuencia del constructo por medio de secuenciación (Sequencing facility, The University of Arizona, Tucson, AZ, EEUU) de DNA plasmídico extraído por el método de lisis alcalina (Sambrook, 1989) a partir de células Top 10 transformadas con el constructo.

5.2.4. Sobreexpresión de DHAR Recombinante

Se seleccionó una colonia positiva de *E.coli* para cultivarla en matraz Fernbach, en 1L de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), con agitación constante a 37°C. Posteriormente, al alcanzar una densidad óptica de 0.6 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, se realizó la inducción adicionando isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG) (Invitrogen) 0.4 mM, siguiendo el cultivo por 6 horas a 37°C. Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos a partir de la inducción (0, 3 y 6 horas) para corroborar la sobreexpresión y se obtuvieron los precipitados bacterianos. Dichos precipitados fueron resuspendidos en un buffer de lisis (Tris-HCl 50mM, lisozima 100 µg/mL y PMSF 1mM) y se realizó una lisis celular por sonicación (15 pulsos por tres ciclos) utilizando un sonicador Branson Sonifer 450 (EEUU). Los lisados obtenidos se centrifugaron a 8000 x g por 15 minutos, recolectando los sobrenadantes y precipitados para analizarlos por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Laemli, 1976) y por tinción con Azul de Coomassie. Al mismo tiempo se realizó un ensayo con un cultivo sin inducir de las mismas células

transformadas. A las muestras recolectadas después de la inducción, también se les determinó concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y actividad enzimática para DHAR (De Tullio et al., 1998).

5.3. Purificación de DHAR por Cromatografía Ni-NTA

5.3.1. Preparación del Clarificado

Se resuspendió 1g de precipitado bacteriano por cada 4 mL de buffer de lisis. Posteriormente se realizó una lisis celular por sonicación (15 pulsos por tres ciclos) con el sonicador Branson Sonifer 450 (EEUU). Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación (Sorvall RC-2B, rotor SS-34) con una velocidad de $32000 \times g$ por 20 minutos a 4°C. El clarificado obtenido se dializó con el buffer de unión para cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) (fosfato de sodio 20mM, NaCl 500mM, imidazol 20mM, pH 7.4), utilizando una membrana de 12-24 kDa y se realizaron tres recambios del mismo buffer.

5.3.2. Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC)

El dializado obtenido se utilizó para inyectarse en una columna Niquel-Sefarosa de alto rendimiento (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con buffer de unión, según las instrucciones del proveedor. La proteína sobreexpresada que se unió a la columna de alto rendimiento, se eluyó con buffer de elución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5M, imidazol 160 mM, pH 7.4), condiciones previamente determinadas en un sistema de purificación AKTA (GE Helathcare, EEUU). Las fracciones puras de DHAR se analizaron por SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie, además se utilizó tinción con plata como criterio de pureza.

5.4. Determinación de la Actividad Enzimática de DHAR

La actividad de la enzima DHAR se determinó en un espectrofotómetro Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, EEUU) por medio del monitoreo de la formación de AsA a una longitud de onda de 265 nm y un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 14\text{mM}^{-1} \text{cm}^1$ (De Tullio et al., 1998). La mezcla de reacción constó de un buffer de fosfato de sodio 50mM (pH 7.0), GSH 5mM, DHA 0.5mM, EDTA 1mM y 0.4 μg de enzima (De Tullio et al., 1998). La velocidad de reducción no enzimática de DHA por GSH fue medida en células por separado como control. La actividad de DHAR se corrigió restando los valores de absorbancia obtenidos en la presencia o ausencia de enzima.

5.5. Caracterización Cinética de DHAR

Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de DHAR fueron determinados midiendo la actividad enzimática como se describió anteriormente, utilizando diferentes concentraciones de DHA (0.1-1.4 mM) y de GSH (0.1-5 mM), manteniendo una concentración de sustrato fija y variando la concentración del otro, para los dos sustratos (Yang et al., 2009). Se realizaron tres experimentos diferentes y en cada uno de ellos las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos experimentales se analizaron utilizando el software GraFit v7 (Erithacus Software). Los valores de K_m y V_{max} se determinaron por medio de gráficos de Lineweaver-Burk, a partir de los cuales se calcularon los parámetros de número de recambio y eficiencia catalítica (K_{cat} y K_{cat}/K_m).

5.6. Caracterización Bioquímica de DHAR

Para estudiar el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima MiDHAR recombinante se incubó la proteína por 15 minutos en diferentes condiciones de buffer, como buffer de acetato de potasio 50 mM (pH 4.0 y 5.0), buffer de fosfato de sodio 50 mM (pH 6.0 y 7.0), buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.0 y 9.0) y buffer CAPS 50 mM (pH 10) y posteriormente se determinó actividad enzimática (Pandey et al., 2014). Se realizaron

tres experimentos y en cada uno de ellos las mediciones se realizaron por triplicado. Se calcularon las medias y la desviación estándar para cada experimento.

Para la estabilidad térmica de DHAR, la enzima se incubó en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7 en un rango de temperatura de 20 a 80°C por 1 hora para determinar su actividad como se describió anteriormente. De la misma manera, se realizaron tres experimentos y en cada uno de ellos las mediciones se realizaron por triplicado. Se calcularon las medias y la desviación estándar para cada experimento.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de Secuencia de DHAR

La secuencia de MiDHAR (Figura 7) tiene un marco de lectura abierto (ORF) de 642 nucleótidos que codifican para una proteína deducida de 213 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 23.68 kDa que es similar al reportado en otras DHAR en plantas. Gracias a un alineamiento múltiple realizado con DHARs de otras plantas se identificaron los residuos que se sugiere que forman parte del sitio catalítico y el motivo característico CxxS o CxxC de las DHAR (Figura 8).

```
1  M A L E V C V K A A V G A P D L L G D C
1  ATGGCTCTGGAAGTCTGTGTGAAAGCTGCCGTTGGTGCTCCCGATCTTCTTGGGGACTGC
21  P F C Q R V L L T L E L K K V P Y K A H
61  CCATTCTGCCAAAGGGTTCGTCTAACGTTGGAGCTGAAAAAAGTTCCTTACRAGGCACAC
41  H I D T S D K P K W F L E V N P E G K V
121  CACATCGACACCCAGTGACAAACCCAAATGGTTTTTGGAGGTAAACCAGAAGGGAAAGSTG
61  P V V K F D D K W V P D S D V I V G I L
181  CCAGTAGTGAAGTTTGATGATAAATGGGTGCCTGACTCTGACGTGATGTGTGGAAITCTT
81  E E K Y P E P P L S T P P E F A S V G S
241  GAGGAGAAGTACCCTGAGCCTCCTCTCAGTACTCCTCCTGAATTTGCCTCTGTGGGATCA
101  K I F S C F F Q F L K S K D P N D G T E
301  AAGATTTTCTCATGTTTCTTCCAGTTTCTTAAAGCAAGGATCCAAATGATGGGACAGAG
121  Q A L L E E L K A L D E H L K K H G G P
361  CAGGCCTTGCTTGAGGAATTGAAGGCGTTGGATGAGCATCTGAAGAAACATGGGGTCCA
141  F I A G E K I T A V D L S L A P K L Y H
421  TTCATTGCTGGCGAAAAGATCACTGCAGTCGATTTGAGCTTAGCACCAGTGTACCAC
161  L E V A L G H F K K W S V P E S F P H V
481  CTTGAGGTAGCTCTAGGGCATTTCAGAAAGTGGAGTGCCTGAGAGCTTTCCTCATGTT
181  H S Y M K T L G S L E S F Q K T K T A P
541  CACAGCTACATGAAGACGCTAGGCAGTCTGGAATCATTTTCAGAAAACCAAGACTGCACCC
201  E Y V I A G W S P K V N A -
601  GAATATGTGATTGCAGGATGTCGCCGAAGGTCAATGCATGA
```

Figura 7. Gen sintético (G-Block) de MiDHAR. Secuencia de aminoácidos optimizada para su expresión en *E.coli*.

```

mango      1  MALEVCVRAAVGAPDVLGDCPFQQRVLLTLELKKVVPYKAEHIDTSDKPKWFLEVNPEGKV
arabidopsis 1  MALDICVKRAVGAAPDVLGDCPFQQRVLLTLELKKVVPYKTHLINVSDKPKWFLDISPEGKV
tabaco     1  MAVEICVRAAVGAPNVLGDCPFQQRALLTLELKKVVPYKMEILINVSDKPKWFLEVNPEGKV
tomate     1  MVVEVCVRAAVGAPDVLGDCPFQQRVLLTLELKKVVTYKKEILINVSDKPKWFLEVNPEGKV
patata     1  MAVELCVRAATGAPDVLGDCPFQQRVTLTLELKKVVPYKTHLININTSDKPKWFLEVNPEGKV
arroz      1  MGVEVCVRAAVGHPDVLGDCPFQQRVLLTLELKKVVPYEMRIIDVQNKEDWFLKISPEGKV

mango      61  PVVK-FDDKWPDSDVIVGLLEEKYPEPELSTPPEFASVGSKIFBCEFCFLKSKDPNDGI
arabidopsis 61  PVVK-LDGKQVADSDVIVGLLEEKYPEPSLKTTPPEFASVGSKIFSAFVTFLKSKDANDGS
tabaco     61  PVIK-FDEKWIIPDSDVIVGLLEEKYPNPSLSSPPEFASVGSKIFPSFVSRKSKDASDGI
tomate     61  PVIN-FGDKWIIPDSDVIVGLLEEKYPNPSLIAPPEFASVGSKIFPTEFVSFPKSKDSSDSI
patata     61  PVIK-FDDKWIISDVIVGLLEEKYPNPSLSAPPEVASVGSKIFPSFVKFLTSKDPDSDGI
arroz      61  PVFNGGDGKWIIPDSVLTQVIEEKYPTPSLVTTPPEYASVGSKIFBCEFTFLKSKDPNDGS

mango      120 EQALLDELKALDEHLRKHGGPFTAGEKITAVDLSLAPKLYHIEVALGHFKKWSVPESLFPH
arabidopsis 120 EKAIYDELEALENHLRTHSGPFVAGEKITAVDLSLAPKLYHIEVALGHYKKNWSVPESLITS
tabaco     120 EQALLDELKALDEHLRAHG-PYVNGANICSVDSLAPKLYHIEVALGHFKKWSVPELSLH
tomate     120 EQALLDELKALDEHLRAHG-PYINGQNVCSVDSLAPKLYHIEVALGHFKKWSVPELSLH
patata     120 EQAIYDELKALDEHLRAHG-PFVNGENICSVDSLAPKLYHIVVVLGHYKKNWSVPENLTH
arroz      121 EKALLDELKALDEHLRAHG-PFINGQNI SAADLSLAPKLYHIOVALGHFKGWKIPEDLTN

mango      180 VHSYMKTLGSLESFQRTK-TAPEYVIAGWSEKINA
arabidopsis 180 VRNYAKALFSRESFENTK-AKKEIVVAGWSEKINA
tabaco     179 VRKYMKLLFERESFQRTK-AAKEYVIAGWAKINP
tomate     179 VRNYMKLLFERESFQRTK-AEEKYVIAGWAKI--
patata     179 VHNLYKLLFARESFQRTKPPKEEYVIAGWASKINA
arroz      180 VHAYTEALFSRESFIRTK-AAKEHLIAGWAKINA

```

Figura 8. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de DHARs. DHAR de mango fue alineada con DHAR de otras plantas como Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) (GenBank AAL71855.1), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (GenBank AAL71857.1), tomate (*Solanum lycopersicum*) (GenBank NP_001234822.1), patata (*Ipomoea batatas*) (GenBank ABM91437.1) y arroz (*Oryza sativa*) (GenBank AAL71856.1). Los aminoácidos propuestos para el sitio catalítico están marcados en rojo.

6.2. Análisis Estructural de DHAR

Se obtuvo un modelo estructural de la enzima DHAR de mango por homología mediante el software MOE, utilizando como templado a la estructura cristalina de DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W). Anteriormente, se utilizaba a la proteína humana intracelular de canal de cloro (CLIC1) como templado para construir modelos de DHAR por homología. Lo anterior debido a que se ha reportado una gran similitud estructural y una estrecha relación filogenética de algunas DHARs con CLICs de vertebrados e invertebrados, porque son proteínas similares a GST (Harrop et al., 2001).

En la figura 9 se muestra el modelo obtenido de MiDHAR, donde se observa claramente que presenta la estructura característica de las GSTs. Se destacan los dominios N-terminal y C-terminal unidos por una pequeña región ligadora o linker. El dominio N-terminal o dominio tiorredoxina está constituido por el dominio estructural $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, en donde β_3 es antiparalela con respecto a las otras hojas β . El dominio C-terminal es más grande y consta en su totalidad de hélices α . Los posibles aminoácidos del sitio catalítico, son ubicados mayormente en el dominio N-terminal y marcados en la figura 9.

Como ya se mencionó anteriormente, se cree que la actividad catalítica de esta enzima es atribuida al residuo Cys20, localizada en la primer hélice α del dominio N-terminal (Do et al., 2016). Esta cisteína está ubicada dentro del motivo CxxC y es la responsable de formar un puente disulfuro con la cisteína del GSH. En el modelo de superficie de MiDHAR se puede observar la cavidad formada entre las hélices α_1 y α_9 , donde se encuentra dicho residuo y donde posiblemente se lleve a cabo la función reductora de esta enzima (Figura 10).

Además, se han propuesto otros aminoácidos que forman parte del sitio catalítico de las DHARs, por la estrecha relación filogenética con las proteínas CLIC. De este modo, con base en reportes previos en donde se observó que Cys24, Pro65 y Asp76 de CLIC1 de *D. melanogaster* interactúan directamente con GSH (Tang et al., 2013), se realizó una comparación a nivel de secuencia y estructura con la DHAR de *P. tomentosa*. Como producto de dicha comparación, se propuso a los residuos Cys20, Lys8, Pro61, Asp72 y Ser73 como parte del sitio G y las propiedades catalíticas de estos residuos fueron investigadas por mutagénesis dirigida (Tang y Yang, 2013).

Sin embargo, gracias a la obtención de la estructura cristalográfica de OsDHAR, se puede obtener información más fina y precisa de los residuos que forman parte del sitio activo en las DHARs. Efectivamente se observó que Cys20 y Lys8 son residuos importantes en el sitio catalítico, siendo Cys20 la responsable de realizar la función catalítica actuando por medio de un ataque nucleofílico (Do et al., 2016). Esto fue descubierto utilizando a OsDHAR con una mutación de la Cys20, la cual perdió la actividad reductasa, y estos resultados fueron similares a los encontrados en una mutante C20S de DHAR de *P. tomentosa* (PtDHAR2) (Tang et al., 2013). Tanto la cisteína

catalítica (Cys20) como la Lys8 se identificaron en la secuencia de MiDHAR, por lo que puede especularse que su actividad enzimática es controlada por estos residuos.

La participación de estos residuos en la catálisis, se explica en el modelo de OsDHAR, donde el ácido ascórbico se une al bolsillo situado entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal (Do et al., 2016). Específicamente, el grupo 3'OH del AsA forma un puente de hidrógeno con la cadena lateral de Lys8, y el grupo 6'OH con Lys210. Además, el grupo 5'OH interactúa con Asp19 y finalmente con Pro21, Phe104 y Trp207 por interacciones de Van der Waals. En el modelo de MiDHAR, se pudieron ubicar estos residuos, así como su posible interacción con AsA (Figura 9, Panel B).

Por otra parte, para la unión de GSH al sitio activo, Trp 207 es rotado ligeramente hacia el GSH para producir una interacción hidrofóbica, así mismo, Lys8 y Lys210 sufren movimientos para interactuar. Además, His160 forma un puente de hidrógeno con el grupo carboxilo del GSH. Todos estos residuos fueron identificados y conservados en otras DHAR incluyendo MiDHAR, solo variando la Cys en la posición 23 y Phe103, por lo que podría proponerse que las interacciones mencionadas anteriormente ocurren en MiDHAR.

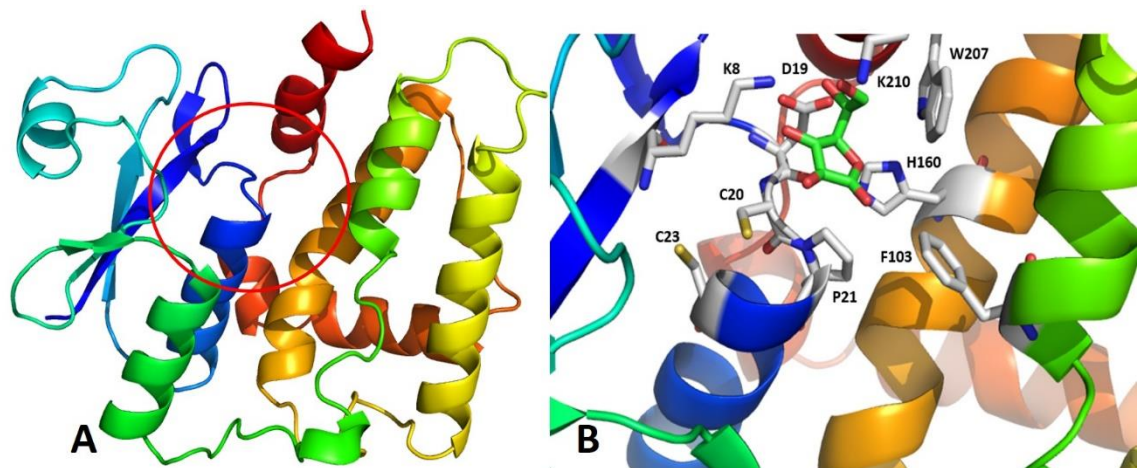


Figura 9. Modelo estructural de DHAR de mango realizado por homología a la estructura cristalina de DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W). A: Modelo en representación de listón de MiDHAR mostrando en azul el extremo N-terminal y en rojo el C-terminal. B: Acercamiento del sitio activo. Los aminoácidos en el sitio catalítico son ubicados en el extremo N-terminal y encerrados en un círculo rojo y pueden apreciarse claramente al hacer un acercamiento del sitio activo. El AsA se muestra en color verde.

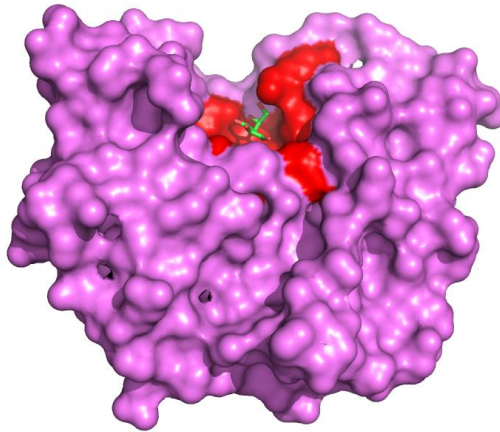


Figura 10. Modelo de superficie de DHAR de mango realizado por homología a la DHAR de arroz (OsDHAR) (PDB: 5D9W). Los aminoácidos en el sitio catalítico son ubicados en el bolsillo señalado de color rojo. El AsA se muestra en color verde.

6.3. Sobreexpresión Heteróloga de DHAR

Se realizó la sobreexpresión de MiDHAR de manera exitosa, encontrándose la proteína de interés de forma soluble, tal y como se muestra en la figura 11, donde puede observarse en forma de una banda de 29 kDa. Lo anterior se debe a que la secuencia codificante para DHAR, correspondiente a una proteína deducida de 25 kDa, contiene además una cola de polihistidinas (10x His-tag) en el extremo N-terminal. Datos similares fueron reportados por DHARs de otras plantas (Chun et al., 2007; Dixon et al., 2002; Shimaoka et al., 2000). Se observa claramente como aumenta la sobreexpresión conforme transcurre el tiempo después de la inducción con IPTG 0.4 mM. Con base al monitoreo de la cinética de sobreexpresión desde la inducción con IPTG (T0) hasta las 24 horas (T24), se eligió el T6 (6 horas después de la inducción) como el óptimo para recuperar el pellet bacteriano y así purificar la proteína de interés. Dichos resultados contrastan a lo reportado por Pandey y colaboradores (2014), donde utilizaron una concentración de 1 mM de IPTG por solo 4 horas para sobreexpresar a la proteína DHAR. Por otra parte, Tang y Yang (2013) reportan haber utilizado a la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) para la transformación con el constructo de interés, y una concentración de IPTG de 0.1 mM por toda la noche para la sobreexpresión de la proteína. Resultados

similares a los mencionados fueron reportados por Yang y colaboradores en el 2009 y por Shimaoka y colaboradores en el 2000.

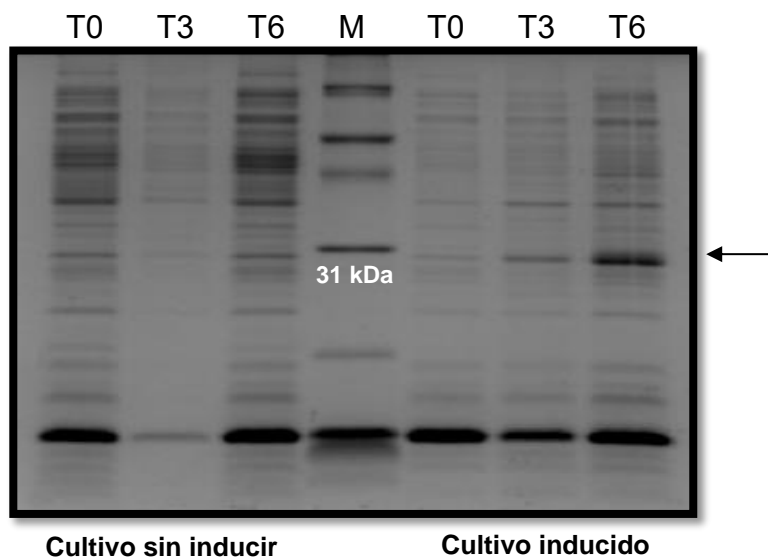


Figura 11. Perfil electroforético de sobreexpresión de DHAR. SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, 2 y 3 son cultivos sin inducir a las 0, 3 y 6 horas. Carril 4, marcador de peso molecular, destacando la banda correspondiente a 31 kDa. Carril 5, 6 y 7 son cultivos inducidos con IPTG 0.4 mM a las 0, 3 y 6 horas.

Además, se realizó un ensayo de un cultivo sin inducir con la misma cepa transformada (BL21 Gold) con el fin de comparar el perfil de proteínas respecto al cultivo que fue inducido con IPTG. Se comprobó de manera efectiva que en este ensayo no hubo un aumento en la sobreexpresión de la banda correspondiente a la proteína de interés (29kDa), con lo que se concluye que la proteína no es producto del metabolismo natural de la bacteria si no de la sobreexpresión.

6.4. Purificación y Caracterización Bioquímica de MiDHAR Recombinante

La proteína MiDHAR fue purificada del lisado de *E.coli* utilizando una columna de afinidad Ni-NTA y la proteína pura mostró una sola banda en SDS-PAGE (Figura 12). Además como criterio de pureza también se realizó una tinción con plata, observando una sola banda lo que confirmó que la proteína estaba totalmente pura (Figura 13). La pureza de la proteína recombinante también fue determinada a través del proceso de

purificación, debido a que se determinó actividad enzimática al clarificado, al dializado y a la muestra pura (Tabla 1).

Las DHARs de plantas son miembros de la familia de las GSTs, las cuales pueden utilizar sustratos como 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-Cl), p-nitrobenzilclorídrico (NBC), 4-ácido nitroftálico (4-NPA) y 3,4-dicloronitrobenzeno (DCNB) (Dixon et al., 2002) para conjugar con el GSH. Sin embargo, MiDHAR muestra actividad hacia el sustrato DHA, que es considerado el sustrato específico para DHAR, utilizando GSH como reductor. La mayor actividad específica para MiDHAR usando DHA y GSH como sustratos, fue $389.81 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína y fue encontrada para la proteína pura (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad específica de DHAR recombinante por etapas de purificación

Etapas de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
Clarificado	4	73.11	1.64 ± 0.15
Dializado	3.5	65.7	4.25 ± 0.64
Proteína pura	0.7	0.47	368.53 ± 74.54

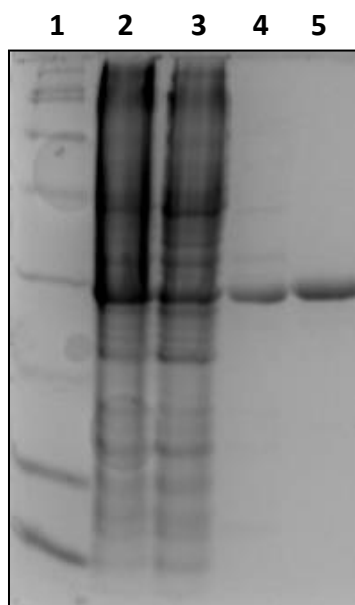


Figura 12. Purificación de MiDHAR. Gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular, carril 2 es la proteína inyectada a la columna, carril 3 corresponde a la proteína no unida, el carril 4 a las uniones no específicas y por último el carril 5 corresponde a la proteína pura.

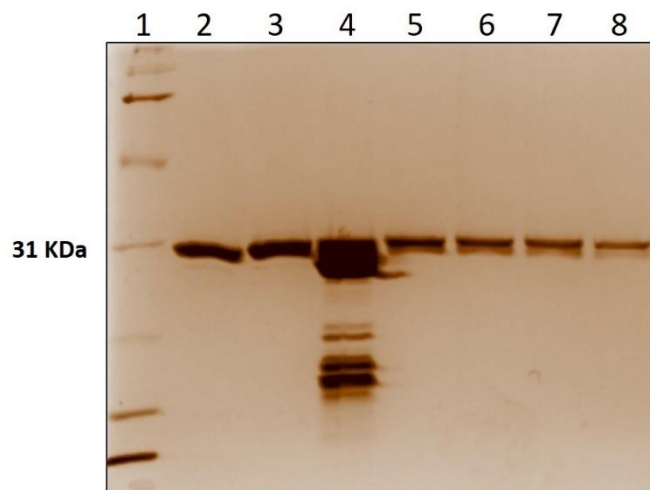


Figura 13. Fracciones puras de MiDHAR obtenidas por cromatografía IMAC. Carril 1, marcador de peso molecular, carriles 2, 3, 5, 6, 7 y 8, fracciones puras de MiDHAR.

Estos resultados indican una alta actividad específica comparada con otras DHARs de plantas, tal es el caso de DHAR de maíz (ZmDHAR) que mostró una actividad específica de $13.47 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, DHAR de *P. tomentosa* (PtoDHAR2) mostró $48.89 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, DHAR de sésamo con un valor de $153 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, DHAR de espinaca con $360 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, DHAR de *Pinus bungeana* (PbDHAR) con $19.84 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína y DHAR de Arabidopsis (AtDHAR2) con un valor de $264 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Zhang et al., 2015; Tang et al., 2013, Chun et al., 2007; Shimaoka et al., 2000; Yang et al., 2009; Dixon et al., 2002) entre otras. Es importante resaltar que MiDHAR tiene una mayor actividad específica que las DHAR de las plantas mencionadas a pesar de que todas éstas fueron obtenidas por sobreexpresión heteróloga.

Para investigar el efecto del pH sobre la estabilidad de la proteína, MiDHAR fue incubada en diferentes soluciones amortiguadoras con pHs desde 4 hasta 10 con intervalos de una unidad de pH. La proteína recombinante mantuvo su actividad en un amplio rango de pH, desde 5 hasta 10, reteniendo más del 80% de su actividad enzimática máxima, siendo el pH de 9 en donde se obtuvo la mayor actividad (Figura 14), lo cual sugiere un cierto grado de resistencia alcalina. Estos hallazgos son diferentes a los encontrados para DHARs de otras especies como OsDHAR, ZMDHAR, DHAR de *P. tomentosa* y DHAR de *Pennisetum glaucum* entre otras (Urano et al., 2000; Zhang et

al., 2015; Tang et al., 2013; Pandey et al., 2013), debido a que éstas no muestran actividad enzimática en un rango tan amplio y la mayor actividad la presentan alrededor de pH 7.

Esta diferencia puede ser debida a las distintas propiedades de ionización en los procesos de reacción catalizados por el dominio tiorredoxina, ya que a pesar de que dicho dominio es muy similar en todas las DHAR, los aminoácidos cargados presentes en el sitio activo de MiDHAR son fácilmente ionizables y forman parte del dominio tiorredoxina. Además, puede ser atribuido a la especie de planta o al tejido u organelo de donde proviene la enzima, debido a que los procesos fisiológicos internos de la planta conllevan una acumulación de iones diferente en citosol que en cloroplasto (Fomenko et al., 2002). Sin embargo, en un estudio realizado en kiwi, se observó un comportamiento similar al mostrado por MiDHAR, en donde la DHAR homóloga de kiwi (AcDHAR1) mostró estabilidad en un amplio rango de pH de 6 a 10, reteniendo más del 80% de su actividad aún en pH básico (Liu et al., 2015). Consecuentemente se puede especular que la estabilidad a pH de MiDHAR asegura su función bajo condiciones ambientales extremas como el estrés salino, ya que éste eleva notablemente el pH, otorgando eficiencia en el reciclaje de AsA contra daño oxidativo causado por estrés ambiental.

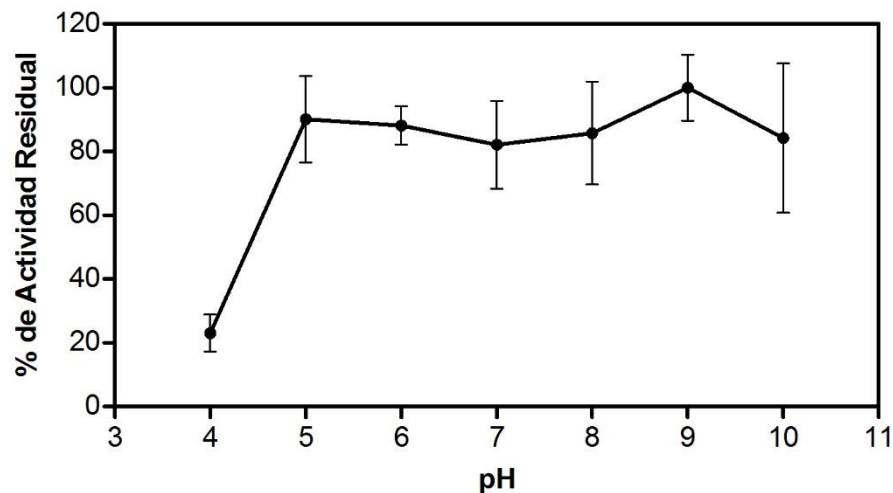


Figura 14. Efecto del pH sobre la estabilidad de MiDHAR. La proteína pura MiDHAR fue pre-incubada a varios pH por 15 minutos. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos diferentes con tres repeticiones cada uno.

Para conocer la estabilidad de MiDHAR a diferentes temperaturas, la proteína fue incubada por 1 hora a las temperaturas del ensayo en un rango de 20 a 80°C. La MiDHAR mostró cierto grado de termoestabilidad al retener más del 75% de su actividad inicial a 40°C (Figura 15). Al aumentar la temperatura a 50°C la actividad de MiDHAR decrece notoriamente pero aún conserva el 35% de su actividad, además puede observarse que aún a la temperatura más alta probada en este ensayo que es 80°C la proteína aún conserva actividad.

En otros estudios, se muestra una estabilidad de la DHAR en un rango más amplio, por ejemplo PbdHAR (Yang et al., 2009) retiene aproximadamente el 77% de su actividad a 55°C, PtoDHAR2 retiene el 78% de su actividad a 55°C (Tang y Yang, 2013) y la DHAR homóloga de kiwi (AcDHAR1) conserva el 61% de su actividad a 55°C sugiriendo en todos los casos que son proteínas termoestables. Además, AcDHAR1 sigue el mismo patrón que MiDHAR en el comportamiento frente a diferentes temperaturas, destacando que AcDHAR1 fue incubada por 15 minutos a cada una de las temperaturas, mientras que MiDHAR fue por 1 hora, lo que sugiere una mayor tolerancia a temperaturas extremas.

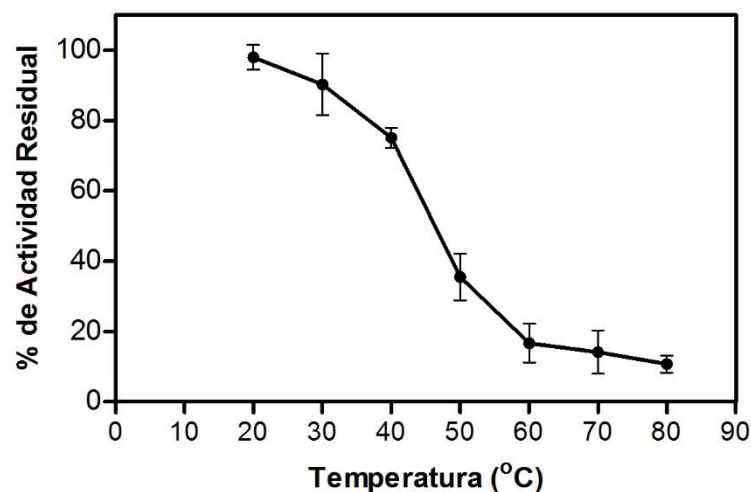


Figura 15. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de MiDHAR. La proteína pura MiDHAR fue pre-incubada a diferentes temperaturas por una hora. Los datos se presentan como la media \pm desviación estándar de tres experimentos diferentes con tres repeticiones cada uno.

De acuerdo a los resultados observados sobre la termoestabilidad de MiDHAR, se puede asegurar la funcionalidad de la proteína aún en condiciones ambientales extremas, tal es el caso de las altas temperaturas de las zonas tropicales donde se cultiva el mango. Siendo así, puede sugerirse que bajo estrés oxidativo, DHAR es requerida de manera más eficiente para regenerar el AsA y eliminar las ROS.

Algunos factores han sido estrechamente relacionados con la estabilidad de proteínas a las altas temperaturas, a pesar de que la comparación a nivel de secuencias de aminoácidos es complicada debido a varias sustituciones que son observadas en proteínas relacionadas. Muchos de estos factores son cuestionados con frecuencia, debido a que no se sabe si pueden generalizarse para todas las proteínas termoestables o solamente funcionan en proteínas específicas (DiRuggiero et al., 1993; Ragone y Colonna, 1995). Sin embargo, el factor común es que algunas sustituciones de aminoácidos que han mostrado ser necesarias para la termoestabilidad de las proteínas ocurren principalmente en sus hélices α (Menendez-Arias y Argos, 1989).

Algunos estudios han revelado que el balance de energía en las hélices α puede ser influenciado por puentes de hidrógeno en el esqueleto de la proteína, interacciones entre las cadenas laterales, interacciones electrostáticas entre grupos cargados y extremos polares, entre otras (Scholtz y Baldwin, 1992). Por lo anterior, es necesaria una alta estabilidad de las hélices α ; sin embargo, no es suficiente para la termoestabilidad de una proteína. Generalizando, la energía de formación de hélices α en conjunto, no de manera individual, brinda una estabilidad conformacional a las proteínas en condiciones de temperaturas altas. Estos hallazgos pueden ser extrapolados para explicar la termoestabilidad de MiDHAR debido a su gran contenido de hélices α localizadas tanto en el dominio N-terminal como en el C-terminal, que en conjunto podrían conferir una estabilidad conformacional a la proteína brindando una resistencia a altas temperaturas.

Por otra parte, se ha demostrado que las sustituciones de algunos aminoácidos pueden ser cruciales para brindar termoestabilidad a las proteínas. En un trabajo realizado por López-Camacho y colaboradores (1996) se obtuvieron mutantes de β -glucosidasas con resistencia a temperaturas altas, con el fin de encontrar factores estructurales que

explicaran la resistencia térmica de la enzima. A través de secuenciación, se localizó en una de las mutantes, llamada tr1, una sustitución de glutamato en la posición 96 por una lisina. Una doble mutante obtenida, constó de una sustitución de metionina por una isoleucina en la posición 416 además de la sustitución ya mencionada en la posición 96.

Como consecuencia, dichas mutaciones, causaron un incremento en el contenido de hélices α y un decremento de hojas β , observando así una marcada termorresistencia de las mutantes comparando con la forma silvestre de la β -glucosidasa (López-Camacho et al., 1996). Algunos cambios estructurales podrían estar directamente relacionados con el incremento de termoestabilidad atribuido a estas mutaciones como la formación de puentes salinos, los cuales han sido directamente relacionados con una mayor resistencia a temperatura o a otros agentes desnaturalizantes (Walker et al., 1980). De la misma manera, los aminoácidos cargados pueden participar en la estabilización de hélices α , teniendo como resultado un mejor empaquetamiento de la proteína y de este modo, una mejor termoestabilidad (Sali et al., 1988; Nicholson et al., 1988).

En el caso de MiDHAR, la presencia de grupos cargados en el sitio activo como Asp19, especialmente Lys8 y Lys210, puede estar relacionada en la estabilización de las hélices α , particularmente las del dominio tiorredoxina, al interaccionar entre ellos por puentes salinos por su carácter ácido y básico, y por ende, contribuir a la termoestabilidad de la proteína.

6.5. Caracterización Cinética de MiDHAR Recombinante

Las constantes cinéticas para MiDHAR se determinaron por medio de un ajuste no lineal. Se observó un comportamiento de tipo Michaelis-Menten al obtener las gráficas de velocidad inicial (V_o) respecto a la concentración de cada sustrato, variando de 0.1mM a 1.4mM para DHA y de 0.1mM a 5mM para GSH. Posteriormente se obtuvieron las gráficas de dobles recíprocos, observando un comportamiento lineal y un conjunto de líneas paralelas lo que podría atribuirse a un mecanismo de tipo ping-pong tal como lo reportó Shimaoka y colaboradores (2003).

Tabla 2. Constantes cinéticas de MiDHAR para cada sustrato

	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M min}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
GSH	5.6312 \pm 0.7716	86.3 \pm 0.0070	158.74	28.18
DHA	0.7751 \pm 0.1778	74.00 \pm 0.0008	136.12	175.61

*Los datos son mostrados como la media \pm el error estándar

Para obtener las constantes cinéticas para MiDHAR K_m , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_m (Tabla 2) se llevaron a cabo los regráficos utilizando los inversos de las V_{max} obtenidas y de las concentraciones de cada sustrato (Figura 16).

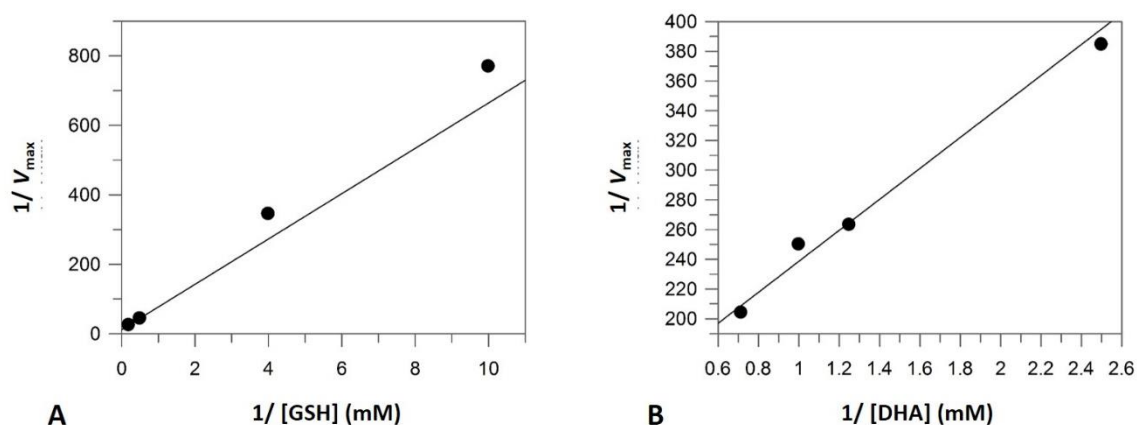


Figura 16. Regráfico resultante de la linearización de Lineweaver-Burke. Panel A: Regráfico linearizado de MiDHAR utilizando GSH variable. Panel B: Regráfico linearizado de MiDHAR utilizando DHA variable.

Todos los miembros de la familia de las GSTs muestran una mayor afinidad hacia el sustrato GSH comparada con el otro sustrato que conjugan. Las DHAR, a pesar de ser miembros de esta familia, no cumplen como tal una función detoxificante más bien su función es llevar a cabo la reducción de DHA, que es su sustrato específico. Por lo cual muestran menores valores de K_m que indican una mayor afinidad hacia DHA, ya que solo utiliza GSH como donador de electrones, como se obtuvo para MiDHAR (Tabla 2).

La velocidad máxima V_{max} , estima el número de centros activos de la enzima, es decir, sería la velocidad que se obtendría cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato.

En cuanto a la V_{\max} de MiDHAR calculada para cada uno de los sustratos puede destacarse que la mayor fue para GSH, lo que nos indica que es mayor la velocidad en la que el GSH se une a toda la enzima. La K_{cat} o número de recambio nos da una idea de la cantidad de moléculas de sustrato que son transformadas en producto, por unidad de tiempo, siempre y cuando existan condiciones de saturación. De este modo se obtuvo un valor de 136.12 s^{-1} para DHA y 158.74 s^{-1} para GSH. Por otra parte la eficiencia catalítica K_{cat}/K_m nos permite conocer la eficiencia que tiene una enzima con cada uno de sus sustratos, por lo que puede concluirse con los valores obtenidos que la MiDHAR es más eficiente con el sustrato DHA.

A pesar de que los valores de K_m son mayores para GSH y menores para DHA tal como lo reportan trabajos anteriores, los resultados obtenidos de la caracterización cinética de MiDHAR difieren un poco de lo ya reportado (Tabla 3). Por ejemplo, en el trabajo realizado por Yang y colaboradores (2009) donde fue caracterizada una DHAR de pino (PbDHAR), se encontró una mayor afinidad por el sustrato DHA que para GSH. Además se observó que la mayor V_{\max} fue para GSH aunque la mayor eficiencia catalítica fue obtenida para DHA.

La caracterización cinética para la homóloga AcDHAR1 (DHAR citosólica de kiwi) proporcionó una menor K_m para DHA que para GSH, una V_{\max} mayor para GSH, y por último, una K_{cat} más elevada para GSH que para DHA. A pesar de que todos los valores reportados parecen ser similares, se muestran ligeras diferencias inclusive entre las DHAR encontradas dentro de una misma planta, indicando una divergencia funcional en las isoformas de esta proteína.

Sin embargo, los valores de K_m tanto para GSH y DHA en MiDHAR se encuentran dentro del rango de lo reportado para otras plantas, siendo ligeramente más altos en MiDHAR. Por otro lado, la K_{cat} para MiDHAR tanto para GSH como para DHA es mayor a las reportadas para las DHAR de otras plantas.

Tabla 3. Constantes cinéticas de DHAR encontradas en varias plantas.

DHAR	Constantes cinéticas						Referencia
	GSH			DHA			
	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)	
PbDHAR	1.03 ± 0.05	40.53	39.35	0.08 ± 0.01	10.15	126.93	Yang et al., 2009
PgDHAR	0.04	N.D	N.D	0.13	N.D	N.D	Pandey et al., 2014
AcDHAR1	1.27 ± 0.13	24.82	19.54	0.11 ± 0.01	20.83	189.39	Liu et al., 2015
ZmDHAR3	1.079±0.053	N.D	N.D	0.150±0.004	N.D	N.D	Zhang et al., 2015
MiDHAR	5.6312±0.77	158.74	28.18	0.7751±0.17	136.12	175.61	El presente estudio

*N.D: no determinado.

Esto nos da una idea de los ciclos catalíticos que la enzima puede realizar cada segundo, por lo que puede decirse que la enzima MiDHAR procesa más rápido a cada uno de sus sustratos respecto a la mayoría de DHARs reportadas. No obstante, la constante de eficiencia K_{cat}/K_m es muy parecida a lo reportado para la mayoría de las DHAR, especialmente a la homóloga de kiwi, observando en todos los casos una mayor eficiencia catalítica para el sustrato DHA.

Cabe resaltar que las caracterizaciones cinéticas de las DHARs a la fecha, proporcionan datos de K_m y V_{max} aparentes debido a que para los ensayos se emplea solo una concentración fija de uno de los sustratos y se varían las concentraciones del sustrato restante y viceversa. En el presente trabajo se reporta una cinética más completa para MiDHAR ya que se toman en cuenta las K_m y V_{max} aparentes, variando las concentraciones de cada uno de los sustratos y por medio de un regráfico se obtienen estos valores generales gracias a un análisis de regresión no lineal.

Sin embargo, aunque existe una ligera diferencia de los resultados obtenidos con lo ya reportado, el comportamiento cinético es constante, es decir, existe una mayor afinidad de la enzima por su sustrato clásico que es DHA. Con los resultados obtenidos, en conjunto con el estudio de las estructuras cristalográficas reportadas para DHAR, se sugiere que MiDHAR sigue el mismo mecanismo reportado por Shimaoka y colaboradores (2003) y lo propuesto en el modelo por Do et al. (2016).

En dicho modelo propuesto para la DHAR de arroz (OsDHAR) (Do et al., 2016), la reducción de DHA a AsA por DHAR se propone que ocurre en dos etapas, en la primera se genera la oxidación de la cisteína catalítica (Cys20) y en la segunda sucede la reducción de la misma (Figura 17). Con los valores cinéticos de MiDHAR se puede concluir que primeramente se une el sustrato DHA a DHAR por medio de Cys20. Do y colaboradores (2016), proponen que Lys8 desempeña un papel importante en el reconocimiento de DHA por la enzima debido a que en la estructura se localiza muy cercano al sitio de unión y presenta diferente conformación espacial en la estructura de DHAR oxidada por lo que pudiera participar también en la liberación de AsA. Además la importancia de este residuo se confirma al obtener una mutante de la enzima (K8A) y se verifica que decrece su actividad enzimática notoriamente. Este residuo se encuentra

conservado en MiDHAR y en el modelo generado se localiza en estrecha cercanía con Cys20 en el sitio activo.

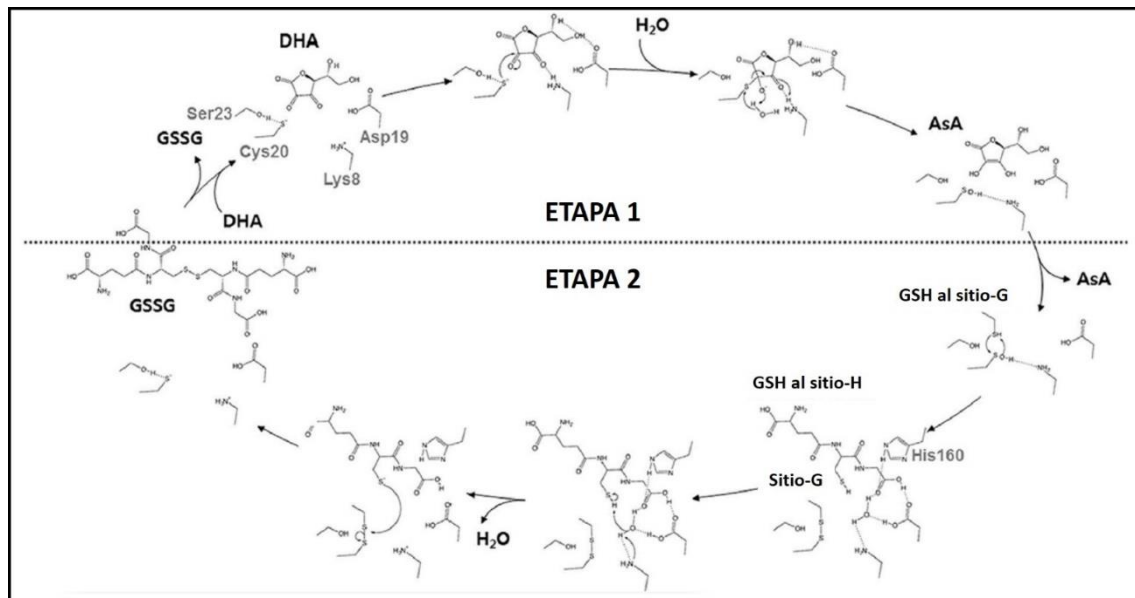


Figura 17. Mecanismo de catálisis propuesto para DHAR. En conjunto con los datos cristalográficos se obtiene un mecanismo de catálisis para DHAR de arroz que puede generalizarse a otras DHAR incluyendo MiDHAR. Fuente: Do et al., 2016.

La Cys20 de OsDHAR reduce DHA a AsA por medio de un ataque nucleofílico y se forma el ácido sulfénico, es decir, uno de los estados oxidados de la cisteína, el cual es muy inestable. Para estabilizar este grupo ionizado es probable que intervenga Ser23 de acuerdo a la cercanía que tiene con Cys20, ya que se encuentra a una distancia aceptable (3.4 Å) para formar puente de hidrógeno (Do et al., 2016). En el caso de MiDHAR el residuo Lys8 es altamente conservado al igual que en otras DHAR; sin embargo, cuenta con una Cys23 en lugar de una Ser como lo reportan para la DHAR de arroz.

En este caso, puede proponerse, de igual manera, que la cisteína en la posición 23, puede estabilizar al grupo ionizado de la Cys20 debido a la estrecha cercanía que se visualiza entre éstos. Estas especulaciones pueden ser respaldadas con lo reportado por Lallement

et al. (2016), en donde se reporta una Cys23 dentro del motivo CxxC y se comprueba que en conjunto con Cys20 es crucial para la actividad catalítica de PtDHAR3A.

Posteriormente, el AsA es liberado como producto por desplazamiento por la unión de GSH al sitio G de la enzima OsDHAR, de este modo ocurre la reducción de la cisteína y la regeneración de la enzima por la unión de una segunda molécula de GSH al sitio H con la consiguiente liberación de una molécula de GSSG. Dado lo anterior, se sugiere un mecanismo tipo ping pong para la enzima en la región de la cisteína del sitio activo y una unión secuencial ordenada del GSH en el sitio H (Do et al., 2016). Los aminoácidos responsables de la interacción tanto con AsA como con DHA en la DHAR de arroz, son conservados en MiDHAR incluyendo la His160 responsable del reconocimiento de GSH al sitio G; sin embargo, a pesar de que la Phe se encuentra en la posición 103 se encuentra direccionada hacia el sitio activo.

Por lo encontrado en el presente trabajo, este mecanismo puede generalizarse para MiDHAR; sin embargo, para complementar los estudios tanto bioquímicos como cinéticos, la determinación de la estructura cristalina de esta proteína es necesaria para comprender de manera más precisa y establecer una relación función-estructura de MiDHAR.

VII. CONCLUSIONES

La MiDHAR presentó estabilidad a valores de pH altos (hasta pH 10) y mantuvo su actividad hasta los 50°C después de ser incubada por 1 hora, lo que podría indicar su termoestabilidad. Lo anterior, podría brindarle resistencia en condiciones de estrés. La obtención de las constantes cinéticas, en conjunto con el análisis del modelo obtenido sugiere un mecanismo de catálisis de MiDHAR similar al reportado para la DHAR de arroz, pudiendo ser de tipo ping pong.

Los resultados obtenidos podrían representar una buena descripción tanto de las características bioquímicas como del mecanismo catalítico de reducción de MiDHAR a nivel atómico y proveer información para entender la relación estructura función de esta enzima.

REFERENCIAS

Agius F., González-Lamothe R., Caballero J. L., Muñoz-Blanco J., Botella M. A. y Valpuesta V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature biotechnology*, 21(2):177-181.

Aravind P. y Prasad M. N. V. 2005. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2):107-116.

Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2):195-201.

Bielen A., Remans T., Vangronsveld J. y Cuypers A. (2013). The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *International journal of molecular sciences*, 14(3):6382-6413.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1):248-254.

Bulley S. M., Rassam M., Hoser D., Otto W., Schünemann N., Wright M., MacRae E., Gleave A. y Laing W. (2009). Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, ern327.

Chatterjee I. B. (1973). Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182(4118):1271-1272.

Chen Z. y Gallie D. R. 2005. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology*, 138(3):1673-1689.

Chen Z., Young T. E., Ling J., Chang S. C. y Gallie D. R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6):3525-3530.

Chew O., Whelan J. y Millar A. H. 2003. Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47):46869-46877.

Chronopoulou E., Madesis P., Asimakopoulou B., Platis D., Tsaftaris A. y Labrou N. E. (2012). Catalytic and structural diversity of the fluzafop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 235(6):1253-1269.

Chun J.-A., Lee W.-H., Han M.-O., Lee J.-W., Yi Y.-B., Goo Y.-M., Lee S.-W; Bae S.-C; Cho K.-J y Chung, C.-H. 2007. Molecular and biochemical characterizations of dehydroascorbate reductase from sesame (*Sesamum indicum* L.) hairy root cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15):6067-6073.

Cook J. D. y Reddy M. B. (2001). Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *The American journal of clinical nutrition*, 73(1):93-98.

Cramer G. R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M. y Shinozaki K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC plant biology*, 11(1):163.

Cushman J. C. y Bohnert H. J. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current opinion in plant biology*, 3(2):117-124.

Das B. K., Kumar A., Maindola P., Mahanty S., Jain S. K., Reddy M. K. y Arockiasamy A. (2016). Non-native ligands define the active site of *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br dehydroascorbate reductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(4):1152-1157.

Dautt M., Ochoa A., Contreras C. A., Pacheco M. A., Casas S., Sanchez A. y Islas M. A. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp de novo transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in plant science*, 6.

Davey M. W., Montagu M. V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I. J. J., Strain J. J., Favell D. y Fletcher J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry,

function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7):825-860.

De Tullio M. C., De Gara L., Paciolla C. y Arrigoni O. 1998. Dehydroascorbate-reducing proteins in maize are induced by the ascorbate biosynthesis inhibitor lycorine. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(6):433-440.

Ding Y., Cheng H. y Song S. (2008). Changes in extreme high-temperature tolerance and activities of antioxidant enzymes of sacred lotus seeds. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51(9):842-853.

Dipierro S. y Borraccino G. 1991. Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry*, 30(2):427-429.

DiRuggiero J., Robb F. T., Jagus R., Klump H. H., Borges K. M., Kessel M., Mai X. y Adams M. W. (1993). Characterization, cloning, and in vitro expression of the extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic Archaeon, ES4. *Journal of Biological Chemistry*, 268(24):17767-17774.

Dixon D. P., Davis B. G. y Edwards R. 2002. Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34):30859-30869.

Dixon D. P., Steel P. G. y Edwards R. 2011. Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling. *Plant signaling & behavior*, 6(8):1223-1227.

Do H., Kim I. S., Jeon B. W., Lee C. W., Park A. K., Wi A. R. y Kim H. W. 2016. Structural understanding of the recycling of oxidized ascorbate by dehydroascorbate reductase (OsDHAR) from *Oryza sativa* L. japonica. *Scientific Reports*, 6:19498.

Edwards R. y Cole D. J. (1996). Glutathione transferases in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 54(2):96-104.

Eltayeb A. E., Kawano N., Badawi G. H., Kaminaka H., Sanekata T., Morishima I., Tanaka K. 2006. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiologia Plantarum*, 127(1):57-65.

Eltelib H. A., Badejo A. A., Fujikawa Y. y Esaka M. 2011. Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of plant physiology*, 168(6):619-627.

Fomenko D. E., y Gladyshev V. N. 2002. CxxS: Fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Science*, 11(10):2285-2296.

Franceschi V. R. y Tarlyn N. M. 2002. L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology*, 130(2):649-656.

Gallie D. R. (2013). L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013.

Gallie D. R. 2013. Increasing Vitamin C Content in Plant Foods to Improve Their Nutritional Value—Successes and Challenges. *Nutrients*, 5(9):3424-3446.

Gest N., Gautier H. y Stevens R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule?. *Journal of experimental botany*, 64(1):33-53.

Gill S. S. y Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12):909-930.

González G., Robles R., Martínez M., Olivás G., Alvarez E. y De La Rosa L. 2008. Bioactive compounds in fruits: health benefits and effect of storage conditions. *Stewart Postharvest Review*, 4(3):1-10.

Haroldsen V. M., Chi-Ham C. L., Kulkarni S., Lorence A. y Bennett A. B. 2011. Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10):1244-1249.

Harrop S. J., DeMaere M. Z., Fairlie W. D., Reztsova T., Valenzuela S. M., Mazzant M., Tonini R., Qiu M. R., Jankova L., Warton K. y Bauskin, A. R. (2001). Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48):44993-45000.

Hayes J. D., Flanagan J. U. y Jowsey I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45:51-88.

Hossain M. A. y Asada K. 1984. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology*, 25(1):85-92.

Jiang Y.-C., Huang C.-Y., Wen L. y Lin C.-T. 2008. Dehydroascorbate reductase cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): expression, enzyme properties, and kinetic studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(10):3623-3627.

Knight H. y Knight M. R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, 6(6):262-267.

Kumar S., Yadav P., Jain, V. y Malhotra S. P. 2014. Isozymes of antioxidative enzymes during ripening and storage of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). *Journal of food science and technology*, 51(2):329-334.

Laemli U. K. (1976). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680.

Lallement P. A., Roret T., Tsan P., Gualberto J. M., Girardet J. M., Didierjean C., Rouhier N. y Hecker A. (2016). Insights into ascorbate regeneration in plants: investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from *Populus trichocarpa*. *Biochemical Journal*, 473(6):717-731.

Lan T., Yang Z.-L., Yang X., Liu Y.-J., Wang X.-R. y Zeng Q.-Y. 2009. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *The Plant Cell Online*, 21(12):3749-3766.

Levine M., Dhariwal K. R., Welch R. W., Wang Y. y Park J. B. (1995). Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6):1347S-1356S.

Li Q., Li Y., Li C. y Yu X. 2012. Enhanced ascorbic acid accumulation through overexpression of dehydroascorbate reductase confers tolerance to methyl viologen and salt stresses in tomato. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48:74-86.

Liu F., Guo X., Yao Y., Tang W., Zhang W., Cao S. y Liu, Y. 2015. Cloning and Function Characterization of Two Dehydroascorbate Reductases from Kiwifruit (*Actinidia chinensis* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-12.

Lopez-Camacho C., Salgado J., Lequerica J. L., Madarro A., Ballestar E., Franco L. y Polatina J. (1996). Amino acid substitutions enhancing thermostability of *Bacillus polymyxa* β -glucosidase A. *Biochemical journal*, 314(3):833-838.

Lorence A., Chevone B. I., Mendes P. y Nessler C. L. (2004). Myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, 134(3):1200-1205.

Lu P., Sang W. G. y Ma K. P. 2008. Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive *Eupatorium* species in China. *Journal of integrative plant biology*, 50(4):393-401.

McKersie B. D. 1991. The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants. *Current topics in plant physiology (USA)*.

Menéndez-Arias L. y Argosf P. (1989). Engineering protein thermal stability: sequence statistics point to residue substitutions in α -helices. *Journal of molecular biology*, 206(2):397-406.

Nicholson H., Becktel W. J. y Matthews B. W. (1988). Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with alpha-helix dipoles. *Nature*, 336:651-656.

Noctor G., Veljovic-Jovanovic S. y Foyer C. H. 2000. Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402):1465-1475.

Pandey P., Achary V. M. M., Kalasamudramu V., Mahanty S., Reddy G. M. y Reddy M. K. 2014. Molecular and biochemical characterization of dehydroascorbate reductase from a stress adapted C4 plant, pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br]. *Plant cell reports*, 33(3):435-445.

Pignocchi C. y Foyer C. H. 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current opinion in plant biology*, 6(4):379-389.

Ragone R. y Colonna G. (1995). Do globular proteins require some structural peculiarity to best function at high temperatures?. *Journal of the American Chemical Society*, 117(1):16-20.

Sali D. R. X. O. A., Bycroft M. y Fersht A. R. (1988). Stabilization of protein structure by interaction of alpha-helix dipole with a charged side chain. *Nature*, 335(6192):740-743.

Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press.

Saruhan N., Terzi R., Saglam A. y Kadioglu A. 2009. The relationship between leaf rolling and ascorbate-glutathione cycle enzymes in apoplastic and symplastic areas of *Ctenanthe setosa* subjected to drought stress. *Biological research*, 42(3):315-326.

Scholtz J. M. y Baldwin R. L. (1992). The mechanism of alpha-helix formation by peptides. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 21(1):95-118.

Shimaoka T., Miyake C. y Yokota A. 2003. Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 270(5):921-928.

Shimaoka T., Yokota A. y Miyake C. 2000. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant and Cell Physiology*, 41(10):1110-1118.

Shin S.-Y., Kim M.-H., Kim Y.-H., Park H.-M. y Yoon H.-S. 2013. Co-expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase from *Brassica rapa* effectively confers tolerance to freezing-induced oxidative stress. *Molecules and cells*, 36(4):304-315.

SIAP. 2015. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Recuperado de <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.

Smirnoff N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plant. *Annals of Botany*, 78:661-669.

Stevens R., Buret M., Duffé P., Garchery C., Baldet P., Rothan C. y Causse M. 2007. Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology*, 143(4):1943-1953.

Stevens R., Page D., Gouble B., Garchery C., Zamir D. y Causse M. (2008). Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant, cell & environment*, 31(8):1086-1096.

Sun L., Huang L., Hong Y., Zhang H., Song F. y Li D. 2015. Comprehensive Analysis Suggests Overlapping Expression of Rice ONAC Transcription Factors in Abiotic and Biotic Stress Responses. *International journal of molecular sciences*, 16(2):4306-4326.

Tang Z.-X. y Yang H.-L. 2013. Functional divergence and catalytic properties of dehydroascorbate reductase family proteins from *Populus tomentosa*. *Molecular biology reports*, 40(8):5105-5114.

Tedone L., Hancock R. D., Alberino S., Haupt S. y Viola R. 2004. Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC plant biology*, 4(1):16.

Urano J. i., Nakagawa T., Maki Y., Masumura T., Tanaka K., Murata N. y Ushimaru T. 2000. Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS letters*, 466(1):107-111.

Vierling E. y Kimpel J. A. (1992). Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 3(2):164-170.

Walker J. E., Wonacott A. J. y Harris J. I. (1980). Heat Stability of a Tetrameric Enzyme, D-Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase. *European Journal of Biochemistry*, 108(2):581-586.

Wall A., Velderrain G. R., González G. A., Laura A., López J. A. y Álvarez E. 2014. El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud. *Nutricion hospitalaria*, 31(n01):67-75.

Wang Vinocur, B. y Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1):1-14.

Wang Xiao, Y., Chen W., Tang K. y Zhan L. 2010. Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology*, 52(4):400-409.

Washburn M. P. y Wells W. W. 1999. The catalytic mechanism of the glutathione-dependent dehydroascorbate reductase activity of thioltransferase (glutaredoxin). *Biochemistry*, 38(1):268-274.

Wheeler G. L., Jones M. A. y Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393(6683):365-369.

Wolucka B. A. y Van Montagu M. (2003). GDP-mannose 3', 5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48):47483-47490.

Yang H. L., Zhao Y. R., Wang C. L., Yang Z. L., Zeng Q. Y. y Lu H. 2009. Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *Journal of Integrative plant biology*, 51(11): 993-1001.

Yin L., Wang S., Eltayeb A. E., Uddin M. I., Yamamoto Y., Tsuji W. y Tanaka, K. 2010. Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*, 231(3):609-621.

Yoshida S., Tamaoki M., Shikano T., Nakajima N., Ogawa D., Ioki M. y Inoue, Y. 2006. Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(2):304-308.

Zechmann B., Stumpe M. y Mauch F. 2011. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*, 233(1):1-12.

Zhang Y. J., Wang W., Yang H. L., Li Y., Kang X. Y., Wang X. R. y Yang Z. L. 2015. Molecular Properties and Functional Divergence of the Dehydroascorbate Reductase Gene Family in Lower and Higher Plants. *PloS one*, 10(12):e0145038.

Zhou Z., Fisher D., Spidel J., Greenfield J., Patson B., Fazal A. y Madura J. D. 2003. Kinetic and docking studies of the interaction of quinones with the quinone reductase active site. *Biochemistry*, 42(7):1985-1994.

Zhu Z., Wei G., Li J., Qian Q. y Yu J. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Plant Science*, 167(3):527-533.