



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Estandarización del método de reducción
xantina-XO para determinar el potencial redox
estándar de la proteína VVD**

Tesis que presenta

Karla Paola García Beltrán

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

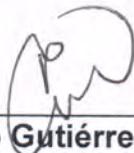
Dr. Braulio Gutiérrez Medina

San Luis Potosí, S.L.P., febrero del 2016

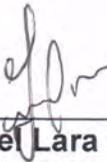


Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Estandarización del método de reducción xantina-XO para determinar el potencial redox estándar de la proteína VVD”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karla Paola García Beltrán** y aprobada el tres de enero del dos mil dieciséis por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Director de la tesis



Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



Dra. Daphne Edith González Juárez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biofísica de la División de Materiales Avanzados del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Braulio Gutiérrez Medina.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No 297724.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 143 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 3 días del mes de febrero del año 2016, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Samuel Lara González	Presidente	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Secretario	IPICYT
Dra. Daphne Edith González Juárez	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karla Paola García Beltrán

sobre la Tesis intitulada:

Estandarización del método de reducción xantina-XO para determinar el potencial redox estándar de la proteína VVD

que se desarrolló bajo la dirección de

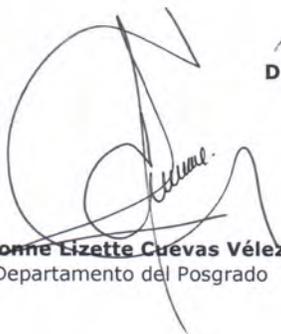
Dr. Braulio Gutiérrez Medina

El Jurado, después de deliberar, determinó

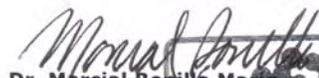
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 3 días del mes de febrero de 2016.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



INSTITUTO POTOSINO
DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARÍA ACADÉMICA

Dedicatorias

A mis padres Blanca Rosa Beltrán Torres
y Salvador de los Reyes García Reyes
con amor y gratitud

Agradecimientos

Al Dr. Braulio Gutiérrez Medina por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Sergio Casas Flores, a la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz y al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por abrirme las puertas de sus laboratorios.

Al Dr. Vicente Rodríguez González, a la M. en C. Claudia Verónica Espinoza Silva y al Laboratorio de Evaluación de Propiedades Catalíticas, IPICYT, por facilitarme el uso de sus instalaciones.

Al Dr. José Guadalupe Sampedro Pérez y al laboratorio de Biofísica de Proteínas del Instituto de Física, UASLP, por haberme permitido realizar el ensayo de espectroscopía de fluoerescencia.

Al Dr. Braulio Gutiérrez Medina, al Dr. Sergio Casas Flores, al Dr. Samuel Lara González y a la Dra. Daphne Edith González Juárez por sus comentarios y sugerencias que mejoraron este trabajo.

A la M. en C. Carmen Noemí Hernández Candia por sus enseñanzas y dedicación.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por haberme dado la oportunidad y los recursos para estudiar el posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con No 297724.

Al laboratorio de Biofísica, IPICYT, en especial a Mónica Buendía Padilla porque hizo que la maestría fuera más divertida.

A mis familiares y amigos por su apoyo, paciencia y cariño.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Copia del acta de examen	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras.....	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Glosario.....	xiii
Resumen	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo 1	1
1. Introducción	1
1.1. Los dominios PAS	3
1.2. Los dominios LOV	4
1.2.1. Mecanismos estructurales de señalización.....	7
1.3. La proteína VVD	8
1.3.1. El proceso de fotoadaptación.....	8
1.3.2. Estructura.....	9
1.3.3. Fotoquímica de la formación del aducto	9
1.3.4. Cambio conformacional de VVD	13
1.4. El potencial redox	15
1.4.1. El Potencial redox celular.....	16
1.4.2. Medición del potencial redox estándar de flavinas unidas a una proteína	17
1.4.3. Principio del método de reducción xantina-XO	19
Capítulo 2.....	21
2. Materiales y métodos	21
2.1. Materiales para la estandarización del método de reducción xantina-xantina-XO	21
2.2. Cepa bacteriana y vector de expresión	21
2.3. Sobreexpresión y purificación de la proteína VVD-36	21
2.3.1. Sobreexpresión de proteínas	21
2.3.2. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a níquel.....	22
2.3.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	22
2.4. Cuantificación de proteínas	23
2.4.1. Espectroscopía por absorción de FAD	23
2.4.2. Ensayo de Bradford	23
2.4.3. Espectroscopia por absorción UV-Visible	24

2.4.4.	Cinética de decaimiento del aducto	24
2.4.5.	Estandarización del sistema de reducción xantina-XO	24
2.4.5.1.	Actividad enzimática del sistema xantina-XO	25
2.4.5.2.	Cuantificación de la xantina y del ácido úrico	25
2.4.5.3.	Evaluación del sistema xantina-XO en condiciones anaeróbicas.....	25
2.4.5.4.	Reducción del colorante safranina T en condiciones anaeróbicas	26
2.4.6.	Caracterización de VVD en condiciones anaeróbicas	26
Capítulo 3	27
3.	Resultados y discusión.....	27
3.1.	Expresión y purificación de la proteína VVD-36	27
3.2.	Cinética de decaimiento del aducto de la proteína VVD-36 bajo diferentes concentraciones de glicerol	27
3.3.	Estandarización del sistema de reducción xantina-XO	31
3.3.1.	Actividad enzimática del sistema xantina-XO bajo diferentes concentraciones de xantina	31
3.3.2.	Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones anaeróbicas	34
3.3.3.	Caracterización de la proteína VVD-36 en condiciones anaeróbicas	39
3.3.4.	Reducción del colorante safranina T con el sistema xantina-XO	40
Capítulo 4	45
4.	Conclusiones	45
Referencias	46
Anexos	53

Lista de tablas

Capítulo 3	27
3. Resultados y discusión	27
Tabla 3.1 Condiciones reportadas en la literatura bajo las que se ha llevado a cabo el método de reducción xantina-XO	32

Lista de figuras

Capítulo 1	1
1. Introducción	1
Figura 1.1 Estructura secundaria del dominio LOV2 de la fototropina PHY3 de <i>Adiantum capillus veneris</i>	5
Figura 1.2 Estructura secundaria de la proteína VVD-36 y la fotoquímica de la formación del aducto	11
Figura 1.3 Espectro de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36	12
Figura 1.4 Cambio conformacional de la proteína VVD.....	14
Capítulo 3	27
3. Resultados y discusión	27
Figura 3.1 Gel de poliacrilamida con SDS de la expresión y purificación de la proteína VVD-36	28
Figura 3.2 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 a diferentes concentraciones de glicerol y tiempo de vida medio del aducto	30
Figura 3.3 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones aeróbicas	33
Figura 3.4 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones aeróbicas a diferentes concentraciones de glicerol	35
Figura 3.5 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en gas N ₂	37
Figura 3.6 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en presencia de la combinación GOx-glucosa/catalasa.....	38
Figura 3.7 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 con 10% de glicerol en presencia del sistema glucosa-GOx/catalasa	41
Figura 3.8 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 con 20% de glicerol en presencia del sistema glucosa-GOx/catalasa	42
Figura 3.9 Reducción del colorante de referencia safranina T en condiciones anaeróbicas.....	44
Anexos	53
Figura S1. Espectro de fluorescencia de la proteína VVD-36.....	60

Anexos

Anexos	53
5.1. Preparación de soluciones	53
5.1.1. Expresión y purificación de proteínas	53
5.1.2. Ensayo de Bradford	55
5.1.3. Estandarización del sistema de reducción xantina- xantina oxidasa.....	55
5.1.4. Sistema glucosa-GOx/catalasa.....	56
5.2. Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa.....	57
5.3. Reacción catalizada por la enzima catalasa	57
5.4. La ecuación de Nernst en el sistema de reducción xantina-XO	57
5.5. Espectro de fluorescencia de la proteína VVD-36.....	58

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
°C	Grados Celsius
E^0	Potencial redox estándar
E_m	Potencial redox estándar o potencial del punto medio
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FMN	Flavina Mononucleótido
g	El valor de la aceleración debido a la gravedad terrestre (= 9.8 ms ⁻²)
GOx	glucosa oxidasa
h	Hora
K	Kelvin
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
λ	Longitud de onda
LB	Medio Luria Bertani
LOV	Luz -Oxígeno-Voltaje (<i>Light-Oxygen-Voltage</i>)
mg	Miligramo
min	Minuto
mM	Milimolar
μM	Micromolar
mV	Milivolt
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Níquel-Nitroloacético
nm	Nanómetro
PAS	Per-ARNT-Sim (<i>Period-Single-minded-Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>)
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS (<i>SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
V	Volts
VVD	Vivid
VVD-36	Vivid trunca en los primeros 36 residuos
WC-1	<i>White Collar 1</i>
WC-2	<i>White Collar 2</i>
WCC	<i>White Collar Complex</i>
wt	Silvestre (<i>wild type</i>)
XO	Xantina Oxidasa

Glosario

Aducto. También llamado compuesto de adición. Producto de una reacción de adición, es decir, una reacción en la que dos o más moléculas se unen por fuerzas de van der Waals, por enlaces de coordinación o por enlaces covalentes, sin la pérdida de átomos.

Fotociclo. Secuencia de cambios estructurales que sufre una molécula cuando es expuesta a la luz. En cuanto a los dominios LOV (*Light-Oxygen-Voltage*), un fotociclo es el mecanismo que inicia cuando estos se encuentran en el estado de oscuridad, es decir, cuando la flavina de FAD (flavina adenina dinucleótido) está completamente oxidada. La absorción de la luz azul desencadena la formación de un aducto transitorio entre el átomo de carbono C4a de la flavina y el grupo tiol del residuo de la cisteína activa del dominio LOV. El átomo N5 de la flavina es reducido, uniendo un átomo de hidrógeno que se piensa que proviene de la cisteína activa. El aducto resultante decae espontáneamente dependiendo del ambiente de la proteína, concluyendo un fotociclo.

Potencial redox. También llamado potencial de reducción. Es la medida en Volts (V) de la tendencia de un compuesto para ganar electrones y por lo tanto ser reducido. Los electrones fluirán del compuesto con el potencial redox menor al compuesto con el potencial redox mayor (más positivo).

Potencial redox estándar. Es el potencial redox de un compuesto a una temperatura de 298 K, a 1 atm de presión y a una concentración 1 M de reactantes.

Resumen

Estandarización del método de reducción xantina-XO para determinar el potencial redox estándar de la proteína VVD

Las algas, las plantas, las bacterias y los hongos presentan proteínas que contienen dominios LOV (*Light-Oxygen-Voltage*) que funcionan como receptores de la luz azul y controlan diversas respuestas celulares. Los dominios LOV se definen como un subgrupo de dominios PAS (Per-ARNT-Sim) que unen un cofactor de flavina capaz de formar un aducto reversible cisteína-flavina en respuesta a su exposición a la luz. A partir de diversos experimentos de caracterización estructural y funcional de los dominios LOV, ya se cuenta con un modelo de la fotoquímica de la formación del aducto. Sin embargo, poco se sabe acerca de si estos dominios son capaces de detectar otros estímulos además de la luz. En este sentido, proponemos como modelo de estudio a la proteína VVD del hongo filamentoso *Neurospora crassa*, una proteína bien estudiada y caracterizada que cuenta con un único dominio LOV. Como primer paso, se sugiere determinar el potencial redox estándar (E_m) del dominio LOV de VVD mediante el sistema de reducción xantina-xantina oxidasa (xantina-XO) previamente reportado en la literatura. Con ello sería posible saber si el valor del potencial redox estándar de la proteína se encuentra dentro de los parámetros fisiológicos del hongo.

En el presente trabajo se optimizaron las condiciones de sobreexpresión y purificación de la proteína VVD, evitando su agregación. Encontramos que la concentración de glicerol es un parámetro clave para evitar la formación de agregados. Asimismo, se desarrolló un protocolo experimental para determinar el potencial redox de VVD empleando el sistema xantina-XO. En particular, mediante la variación sistemática de parámetros, logramos obtener las condiciones y concentraciones de los reactantes bajo las cuales se llevarán a cabo las mediciones con la proteína de estudio VVD. Los protocolos desarrollados constituyen la base para determinar el potencial redox no sólo de VVD sino también de otras proteínas de interés que participen en reacciones de óxido-reducción.

Palabras clave. Condiciones anaeróbicas, dominio LOV, potencial redox, VVD, sistema xantina-XO

Abstract

Standardization of the xanthine-XO reduction method to determine the standard redox potential of the protein VVD

Algae, plants, fungi and bacteria have proteins that contain LOV (Light-Oxygen-Voltage) domains that function as receptors for blue light and control several cellular responses. The LOV domains are defined as a subset of PAS (Per-ARNT-Sim) domains that bind a flavin cofactor capable of forming a reversible cysteine-flavin adduct in response to exposure to light. From various structural experiments and functional characterization of the LOV domains, a model of photochemistry adduct formation has been proposed. However, little is known about whether these domains are able to detect stimuli other than light. Accordingly, we propose as a model of study the protein VVD protein found in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. The protein VVD has a single LOV domain, and has been well studied and characterized. As a first step, it is suggested to determine the standard redox potential (E_m) of the LOV domain of VVD by the xanthine-xanthine oxidase (xanthine-XO) reduction system previously reported in the literature. This would make it possible to know if the standard redox potential value of protein is within the physiological parameters of the fungus.

In this study, we optimized the overexpression and purification conditions of the VVD protein, preventing its aggregation. We found that glycerol concentration is a key parameter to avoid aggregate formation. In addition, an experimental protocol was developed to determine the redox potential of VVD using the xanthine-XO system. In particular, through systematic variation of parameters, we obtained the reactants conditions and concentrations under which we will carry out the measurements with the our protein of study (VVD). The protocols developed here constitute the basis to determine the redox potential not only of VVD but also from other proteins of interest involved in redox reactions.

Keywords. Anaerobic conditions, LOV domain, redox potential, VVD, xanthine-XO system

Capítulo 1

1. Introducción

La célula requiere de dominios proteicos que detecten señales físicas o químicas en el ambiente para así obtener información acerca de su entorno. Entre estos dominios se encuentran los dominios LOV (*Light-Oxygen-Voltage*), una subclase de la superfamilia de dominios PAS (Per-ARNT-Sim) cuya función conocida hasta ahora es detectar la luz azul ($\lambda = 400 - 480 \text{ nm}$) en proteínas fotorreceptoras [69, 63]. A nivel molecular, los dominios LOV son pequeñas unidades estructurales de una proteína que unen, de manera no covalente, un cofactor de flavina denominado cromóforo. Al absorber la luz, el átomo de carbono en la posición 4a (C4a) de la flavina forma un enlace covalente reversible con el grupo tiol de una cisteína activa de la proteína (aducto) [55]. Actualmente, los estados singulete y triplete electrónicamente excitados de la flavina han sido identificados como los únicos intermediarios en la fotoquímica de los dominios LOV [66]. Sin embargo, dado que las flavinas están implicadas en reacciones óxido-reducción dentro de la célula y que al formarse el aducto ocurre una reacción de óxido-reducción entre la flavina y el tiol, se piensa que en los fotociclos de los dominios LOV pueden estar involucrados otros estados redox de las flavinas y ser controlados por el potencial redox externo [46].

Uno de los sistemas de percepción de la luz más estudiados es el que utiliza el hongo filamentoso *Neurospora crassa* (*N. crassa*). En este organismo, la luz azul regula diversos fenómenos biológicos tales como: i) la inducción de la síntesis de carotenoides en micelio [23], ii) la formación de esporas asexuales (conidias) [23], iii) la formación de protoperitecios (estructuras reproductivas femeninas) bajo condiciones limitadas de Nitrógeno [13], iv) la polaridad peritecial dependiente de luz [47], v) el fototropismo positivo de los picos periteciales [24] y vi) el cambio de fase en el ritmo circadiano durante la conidiación [56]. Así, la luz es una fuente de información importante

para el hongo, pero también es un agente estresante que incrementa la concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que podría alterar el potencial redox celular [20,61].

Actualmente se sabe que la percepción de la luz en *N. crassa* es mediada por el las proteínas *White Collar-1* (WC-1), *White Collar-2* (WC-2) y *Vivid* (VVD) [48]. WC-1 y WC-2 son dos factores transcripcionales de distinto tamaño que comparten una organización similar de dominios funcionales que incluye un dominio dedo de zinc tipo GATA (estructura que se une al ADN), una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación (AD). WC-1 contiene además dos dominios PAS y un dominio LOV que une FAD, mientras que WC-2 contiene sólo un dominio PAS [49]. Ambas proteínas forman un complejo llamado Complejo White Collar (WCC), donde WC-1 funciona como fotorreceptor [19]. En respuesta a la luz azul, el complejo WCC dimeriza induciendo la transcripción de la mayoría de los genes que responden a la luz azul, incluyendo *vvd*, un fotorreceptor con un único dominio LOV. Bajo iluminación constante, VVD inhibe la actividad del homodímero WCC por la formación competitiva de heterodímeros WCC-VVD, permitiéndole al hongo detectar cambios de intensidades de luz [38]. Es de notar que se ha reportado que VVD también podría detectar moléculas oxidantes intracelulares, tales como el superóxido; sin embargo, el proceso molecular aún no ha sido explorado [65].

Debido a la fotoquímica de la formación del aducto de las proteínas con dominios LOV al detectar la luz y, a que se ha reportado que algunas flavoproteínas con dominios PAS como NifL y Aer tienen la capacidad de detectar cambios en el estado redox celular [6, 54, 60], se sugiere la hipótesis de que VVD y en general los dominios LOV puedan, además de la luz azul, detectar potenciales redox. Es por ello que un primer paso para probar dicha hipótesis es determinar el valor del potencial redox estándar de FAD en el contexto del dominio LOV de VVD. Con ello sería posible saber si el valor del

potencial redox de la proteína se encuentra dentro de los parámetros fisiológicos del hongo y si podría tener alguna función biológica.

Hasta la fecha, uno de los métodos más utilizados para estimar el potencial redox estándar de algunas flavoproteínas es el método de reducción xantina-xantina oxidasa (xantina-XO) desarrollado por Massey [40]. Así, el objetivo de este trabajo es estandarizar el método de reducción xantina-XO de tal manera que nos permita obtener el valor del potencial redox estándar de la flavina en el contexto del dominio LOV de la proteína VVD.

1.1. Los dominios PAS

Los dominios PAS son importantes módulos de señalización que participan en interacciones proteína-proteína y actúan como receptores internos de luz, oxígeno y potencial redox en los tres dominios de la vida: *Bacteria*, *Archaea*, y *Eucarya*. El acrónimo PAS se originó de los nombres de las proteínas *Per* (*Period*) y *Sim* (*Single-minded*) de *Drosophila*, y el traslocador de receptor nuclear ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), las primeras tres proteínas identificadas con dominios PAS por homología de secuencia [69, 63, 43].

Estructuralmente, los dominios PAS comprenden regiones de aproximadamente 100-120 aminoácidos y muestran una baja identidad de secuencia (menor al 20%), sin embargo, conservan el mismo plegamiento tridimensional. Dicho plegamiento incluye una hélice alfa-giro-hélice alfa (C α /D α), cinco hebras β antiparalelas (A β , B β , G β , H β y I β) que conforman el andamio β , una hélice central E α y una hélice alfa conectora F α , una región clave que varía en las estructuras de los dominios PAS [51, 43] (**Figura 1.1**). Además, algunos dominios PAS unen cofactores tales como flavinas, metabolitos, iones o grupos hemo, pero para la mayoría de ellos no se han identificado cofactores [63].

1.2. Los dominios LOV

Los dominios LOV (*Light-Oxygen-Voltage*) constituyen una subclase de la superfamilia de dominios PAS (Per-ARNT-Sim) que se restringe a un subconjunto particular de fotorreceptores PAS que unen nucleótidos de flavina y forman un aducto fotosensible [69].

Los dominios LOV fueron identificados por primera vez en un fotorreceptor Ser/Thr cinasa de *Arabidopsis thaliana* (NPH1) conocido como fototropina [9,30] y actualmente se sabe que los dominios LOV sirven como fotoreceptores en bacterias, plantas, arqueas y hongos [34]. En general, los dominios LOV en respuesta a la luz azul experimentan cambios conformacionales después de los cuales se activan diversos dominios efectores, entre los que se encuentran, cinasas [30], fosfodiesterasas [50], dominios STAS [3], dominios F-box [45, 62] y dedos de zinc [26]. Las proteínas con dominios LOV presentan una gran diversidad en cuanto a la estructura, ya que se pueden encontrar proteínas pequeñas con un solo dominio hasta proteínas con multidominios que contienen cerca de 2000 amino ácidos y, en la mayoría de estas proteínas, los dominios LOV se encuentran localizados cerca del extremo amino terminal [12].

En cuanto a estructura, los dominios LOV son pequeños dominios de aproximadamente 100-110 aminoácidos que unen, de manera no covalente, un cofactor de flavina mononucleótido (FMN) o una flavina adenina dinucleótido (FAD) sensible a la luz azul. Una de las primeras estructuras resueltas fue el dominio LOV2 de la fototropina PHY3 de *Adiantum capillus veneris*, la cual reveló una estructura característica de los dominios PAS que incluye cinco hélices alfa ($C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$ $F\alpha$), y cinco hebras β antiparalelas ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$ y $I\beta$) que conforman el andamio β (**Fig. 1.1**). Dentro de la hélice $E\alpha$, se encuentra un residuo conservado de cisteína esencial para la formación del aducto cisteína-flavina en respuesta a la exposición a la luz. El residuo de cisteína está a una distancia de aproximadamente 4 Å del anillo de isoaloxazina de la flavina y es el cuarto residuo en el motivo consenso GXNCRFLQG [34]. En el interior

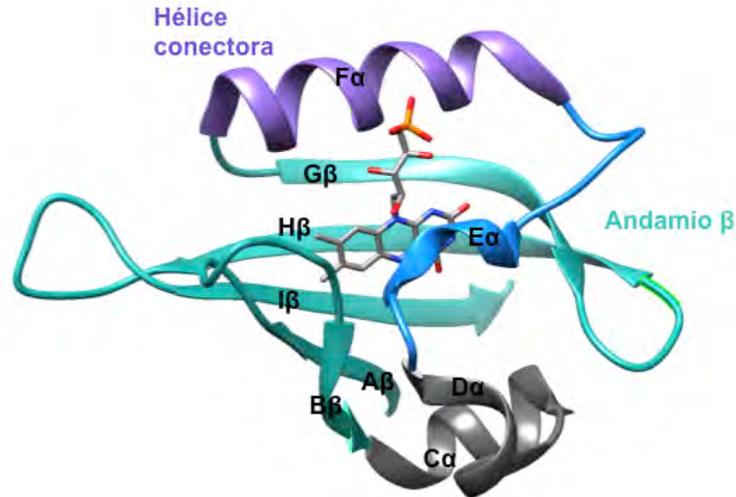


Figura 1.1 Estructura secundaria del dominio LOV2 de la fototropina PHY3 de *Adiantum capillus veneris*

La estructura tridimensional del dominio LOV2 de PHY3 muestra un plegamiento canónico observado en los dominios PAS que incluye dos hélices alfa Cα y Dα (gris), cinco hebras beta antiparalelas (Aβ, Bβ, Gβ, Hβ y Iβ) que conforman el andamio β central (cyan), una hélice alfa conectora Fα (morado) y una hélice alfa central Eα (azul). El cofactor FMN se muestra en el sitio de unión al cromóforo, el cual está coloreado por elementos: carbono, gris; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo; y fósforo, naranja. (La estructura se realizó con el programa USCF Chimera 1.8.1, PDB ID 1G28).

del dominio LOV el cofactor de flavina se mantiene unido a través de interacciones electrostáticas, interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Los residuos de la hélice F α y las hebras G β , H β y I β tienen el principal contacto con la flavina [11].

En estudios iniciales se pensaba que las fototropinas eran detectores de potenciales redox debido a su alta similitud en secuencia con las proteínas NifL de *Azotobacter vinelandii* y Aer de *Escherichia coli* (*E. coli*), dos proteínas con dominios PAS que unen FAD [30]. Sin embargo, solo se demostró mediante estudios fotoquímicos y análisis mutacional que los dominios LOV detectan luz vía el cromóforo de flavina. Al ser expuestas a la luz, las fototropinas son capaces de formar un aducto reversible entre la cisteína conservada y el átomo de carbono C4a [55]. La formación del aducto induce cambios conformacionales en las proteínas fotorreceptoras en el proceso de fotoactivación [25], identificándose dos estados: un estado activo (en luz) y un estado inactivo (en oscuridad). Dependiendo de la proteína LOV, el aducto decae de su estado activo a su estado inactivo en un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) que va desde segundos, como es el caso del dominio LOV2 de la fototropina1 de *Avena sativa* ($t_{1/2} \sim 30$ s) [2], hasta horas como la proteína VVD de *N. crassa* ($t_{1/2} \sim 10\,000$ s) [72].

De acuerdo a lo anterior, los dominios LOV se restringen a un grupo de proteínas que deben poseer las siguientes tres características: i) tener un plegamiento tipo PAS, ii) unir una flavina como cofactor y iii) formar un aducto fotosensible. Sin embargo, se sabe que hay otros dominios PAS que unen flavinas pero no sensan luz, tal es el caso de los receptores de potenciales redox NifL y Aer.

1.2.1. Mecanismos estructurales de señalización

Los dominios LOV regulan una diversidad de funciones tales como el fototropismo [30], la transcripción de genes [19], las propiedades adhesivas de la célula [53], entre otras. En el proceso de fotorrecepción, la forma en que se propaga la señal desde el dominio LOV puede ocurrir de diferentes maneras.

En las fototropinas, el mecanismo estructural de señalización se puede ejemplificar con el dominio LOV2 de phot1 de *Avena sativa*, cuya estructura es caracterizada por una hélice α anfipática, denominada J α , en su extremo C-terminal. En la oscuridad, J α interactúa con el andamio β mientras que cuando es excitado con luz azul, J α se desplaza del andamio β resultando en la activación del dominio efector [25].

Otro mecanismo que se conoce es el del dominio LOV de YtvA (*Bacillus subtilis*). Se ha reportado que el dominio LOV de YtvA es dimérico y difiere de los dominios LOV de las fototropinas en la estructura cuaternaria y en la orientación del motivo J α . En esta proteína, el motivo J α se encuentra de manera extendida lejos del núcleo PAS del dímero. Bajo iluminación con luz azul, el dímero experimenta un movimiento rotacional que permite la activación del dominio efector [42].

En *N. crassa*, estudios estructurales de la proteína VVD revelaron que cuando es expuesta a la luz, se produce un cambio conformacional en su región N-terminal, activándose así la proteína [72]. Debido a su importancia para nuestros estudios, de este proceso se hablará con mayor detalle más adelante.

Finalmente, un estudio reciente de la proteína EL222 LOV-HTH (Helix-Turn-Helix) de *Erythrobacter litoralis* mostró un mecanismo de regulación con características similares a las de las fototropinas y a las de VVD. EL222 es una proteína de unión a ADN regulada por luz. En la oscuridad, la proteína es monomérica y el dominio HTH está empaquetado contra el andamio β del

dominio LOV, mientras que la estructura J α conecta ambos dominios. Cuando la proteína se activa con luz, se rompe la interacción entre el dominio LOV y el dominio HTH. El cambio estructural lleva a la formación de un dímero sobre el ADN, el estado requerido para que el dominio HTH interactúe con el ADN [44].

1.3. La proteína VVD

VVD es una proteína con un único dominio LOV que posee una molécula de FAD y una extensión N-terminal de 70 amino ácidos. El nombre de Vivid proviene de “coloración vívida” debido a que las cepas Δvvd mutantes de *N. crassa* son de color naranja brillante en consecuencia de una acumulación de carotenoides bajo constante iluminación, lo que refleja un defecto en la biosíntesis de carotenoides y otras vías influenciadas por luz [28, 57].

1.3.1. El proceso de fotoadaptación

En *N. crassa*, la fotoadaptación es la capacidad de atenuar las respuestas a la luz bajo iluminación constante manteniendo la sensibilidad a cambios de intensidades de luz [27, 38, 57].

Hasta la fecha, se ha mostrado que la fotoadaptación en *N. crassa* requiere tanto del complejo WCC como de la proteína VVD. Al ser activado por luz, el complejo WCC dimeriza vía la interacción de los dominios LOV de WC-1. El homodímero WCC-WCC se une transitoriamente al promotor de secuencias consenso definidas de genes tempranos regulados por luz, incluyendo *vvd* y *wc-1*, activando su transcripción [27, 38]. La inducción por luz de la expresión génica de VVD es robusta y rápida, presentando un pico de expresión de ARNm y de proteína después de aproximadamente 15 min y 30 min respectivamente, de la exposición a la luz [57]. Una vez activado por la luz azul, VVD interactúa con el complejo WCC activado por luz a través de WC-1 inhibiendo su actividad transcripcional. Debido a que el dímero WCC unido a

ADN es inestable, este es degradado. Por otro lado, la proteína VVD se acumula e interactúa con el complejo WCC, por lo que compite con la homodimerización del complejo WCC [38]. Después de una exposición prolongada de luz, la expresión de los genes tempranos y genes tardíos vuelven a su nivel basal después de 1-4 h bajo luz constante [8]. El heterodímero WCC-VVD se acumula gradualmente y se equilibra con VVD y el complejo WCC en su estado de oscuridad. El equilibrio es establecido por la activación por luz del WCC y por el decaimiento independiente de luz del fotoaducto del WCC, produciéndose así una población del complejo WCC en su estado de oscuridad capaz de evocar un segundo pico de transcripción al incrementar la intensidad de la luz [38].

1.3.2. Estructura

La proteína VVD tiene un peso molecular de 21 kDa y una longitud de 186 aminoácidos [57]. Zoltowski y colaboradores obtuvieron las primeras estructuras cristalográficas de una forma trunca de VVD (VVD-36) tanto en el estado activo como en el estado inactivo de la proteína. Ambas estructuras revelaron un único dominio LOV con un plegamiento PAS canónico (núcleo). Estas estructuras también mostraron dos componentes estructurales que la distinguen de otras proteínas LOV: i) una región N-terminal que contiene dos motivos denominados hélice α y hebra β (*N-cap*) y ii) un *loop* de 11 residuos entre la hebra α E y la hélice conectora α F que acomoda el motivo de adenosina de FAD en la superficie de la proteína (**Fig. 1.2 A**). En VVD, el residuo conservado de cisteína corresponde a la C108 y se encuentra directamente arriba del átomo de carbono C4a de FAD en el estado inactivo [72].

1.3.3. Fotoquímica de la formación del aducto

El FAD es un cofactor que consiste en un heterociclo nitrogenado de tres anillos y dos grupos oxo denominado isoaloxazina (flavina) unido a un grupo fosfato de un compuesto de adenosin difosfato (ADP) (**Fig. 1.2 B**). El motivo flavina de

FAD es capaz de someterse a reacciones de óxido-reducción y puede aceptar un electrón (semiquinona) en un proceso de dos pasos o dos electrones en un solo paso (hidroquinona) [46].

La activación por luz ocurre cuando la flavina completamente oxidada (quinona) absorbe un fotón que excita el cromóforo a un estado singulete, es decir, un electrón es promovido con la misma orientación de spin que el estado basal (estado apareado). A continuación, el estado singulete se relaja al estado basal y a través de un sistema de entrecruzamiento se convierte en un estado excitado triplete (un electrón es promovido con una orientación contraria de spin que el estado basal). En el estado triplete, la flavina forma un enlace covalente metaestable entre su átomo de carbono C4a y el tiol de la cisteína conservada C108 (aducto). El átomo N5 de la flavina es reducido, uniéndose un átomo de hidrógeno que se piensa que proviene de la cisteína activa. El aducto resultante decae espontáneamente dependiendo del ambiente de la proteína (**Fig. 1.2 C**). La tasa de decaimiento es controlada por la desprotonación del átomo N5, regresando así el cromóforo a su estado de oscuridad [66].

Debido a la fotoquímica de la formación del aducto, las proteínas LOV presentan cambios de absorbancia característicos inducidos por luz. En el caso de VVD, los espectros de absorbancia muestran dos picos máximos a 380 nm y a 450 nm, y dos picos menores a 428 nm y a 478 nm cuando la flavina del cofactor FAD se encuentra completamente oxidada (estado de oscuridad); mientras que cuando la flavina se reduce (estado de luz), la absorción a 450 nm, 428 nm y 478 nm se blanquea produciéndose un solo pico a 390 nm. Durante la cinética de decaimiento del aducto, aparecen tres puntos isosbéticos a 330 nm, 385 nm y 413 nm [72] (**Fig. 1.3**).

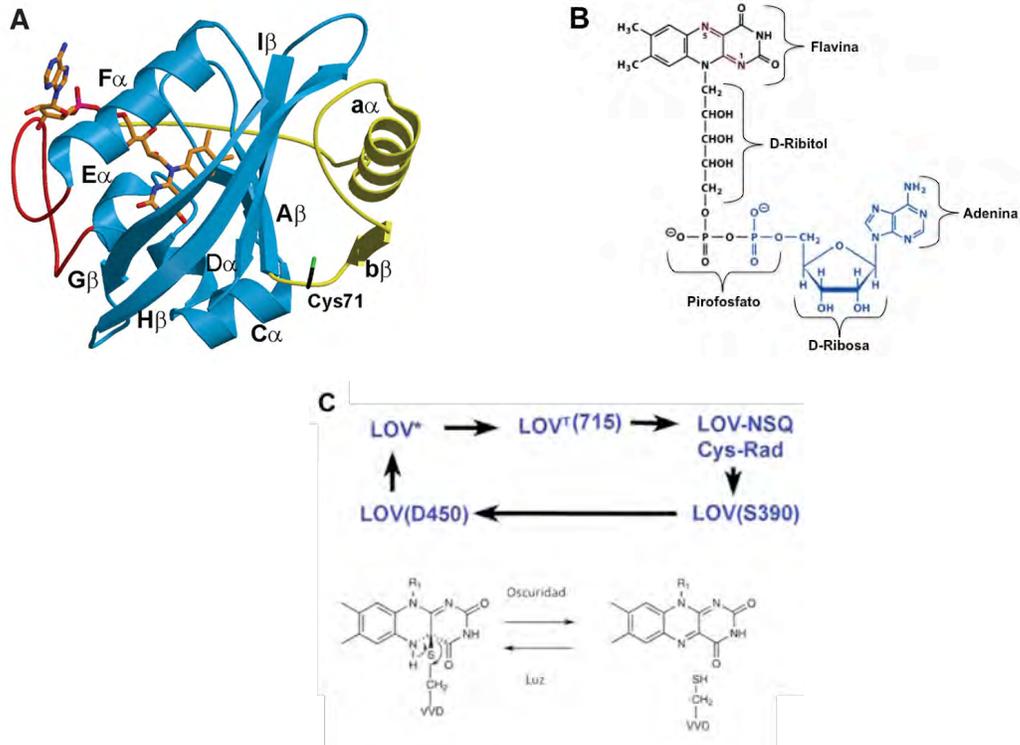


Figura 1.2 Estructura secundaria de la proteína VVD-36 y la fotoquímica de la formación del aducto

(A) Estructura secundaria de VVD-36. La proteína VVD incluye la estructura característica de los dominios PAS (azul), una región N-cap (amarillo) y un *loop* de 11 residuos que acomoda a FAD en la superficie de la proteína (rojo) [72]. **(B)** Estructura de FAD. FAD está compuesto de dos partes principales: Una riboflavina y un compuesto de ADP. La riboflavina está formada por un compuesto tricíclico denominado isoaloxazina y una molécula de ribitol. Por su parte, el ADP se forma por la unión de una adenina, un azúcar del tipo pentosa que es la ribosa y dos radicales de fosfato unidos entre sí. **(C)** Mecanismo general de la formación del aducto. La luz azul promueve el estado excitado singulete (LOV^*) en LOV (D450) que rápidamente, a través de un sistema de entrecruzamiento, se convierte en un estado excitado triplete (LOV^\dagger). La flavina en el estado triplete causa la transferencia electrónica entre la flavina y la cisteína activa del dominio LOV, lo que genera un radical semiquinona neutral (NSQ) y un radical cisteína (Cys-Rad). La recombinación de los radicales conlleva a la formación de un enlace covalente entre el átomo carbono C4a de la flavina y el tior de la cisteína conservada, que es definido por un solo pico de absorción a 390 nm (S390). Modificada de la referencia [52].

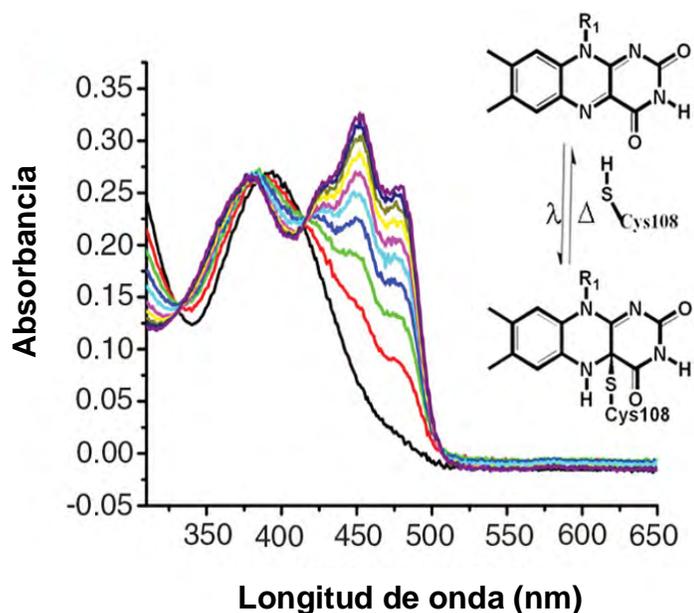


Figura 1.3 Espectro de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36

En su estado activo (estado de luz), la formación del aducto cisteína-flavina muestra un solo pico a 390 nm. En su estado inactivo (estado de oscuridad), VVD muestra dos picos máximos a 380 nm y a 450 nm, y dos picos menores a 428 nm y 478 nm. Durante la cinética de decaimiento del aducto, aparecen tres puntos isobélicos a 330 nm, 385 nm y 413 nm. Las trazas intermedias representan el perfil de recuperación de la proteína del estado activo al estado inactivo a diferentes tiempos. Modificada de la Referencia [72].

El aducto resultante es térmicamente reversible en la oscuridad, decayendo al estado basal. Modificada de la referencia [52].

1.3.4. Cambio conformacional de VVD

Bajo la luz azul, VVD forma un aducto entre el tiol de la Cys108 y el átomo de carbono C4a de la flavina. La formación del enlace tioéter reduce el anillo isoaloxazina de FAD y protona al átomo N5 de la flavina, lo que conduce a un giro de la amida del residuo Gln182 para mantener un puente de hidrógeno con el N5 protonado. En el estado de oscuridad, el carbonilo de la cadena lateral de la Gln182 hace contacto con el carbonilo del residuo Ala72. En el estado de luz, el giro de la Gln182 reemplaza este contacto potencialmente desfavorable con un puente de hidrógeno entre el carbonilo de la Ala72 y el nitrógeno de la amida de la Gln182. El giro de la Gln182 altera orientaciones dipolares y tal vez estabiliza la Ala72 contra el motivo $\beta\beta$. Por su parte, la Cys71 localizada en la región bisagra entre el motivo $\beta\beta$ y el núcleo PAS forma puentes de hidrógeno críticos que unen el N-cap y el núcleo PAS en el estado de oscuridad. Bajo excitación con luz azul, estos puentes de hidrógeno son debilitados y la Cys71 rota e interactúa con la Asp68. Esta interacción correlaciona con un desplazamiento del motivo $\beta\beta$ del núcleo PAS de 2.0 Å (**Fig. 1.4**). El desplazamiento del motivo $\beta\beta$ rompe interacciones hechas por Met55 y Arg57 que de otro modo estabilizan el empaquetamiento de la región N-terminal contra el andamio β del núcleo PAS [72].

Experimentos de filtración en gel complementaria y de dispersión de rayos X de ángulo pequeño, sugieren que VVD se expande significativamente cuando se ilumina en solución debido a un desorden de la región N-terminal. Por otro lado, estudios de cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), dispersión de luz y ultracentrifugación mostraron que estos cambios conformacionales generan una transición de monómero a dímero de intercambio rápido [70]. Con respecto al aducto, se ha reportado que en VVD el tiempo de vida media es de $\sim 10\ 000$ s a temperatura ambiente, sin embargo, el aducto puede ser modificado por un

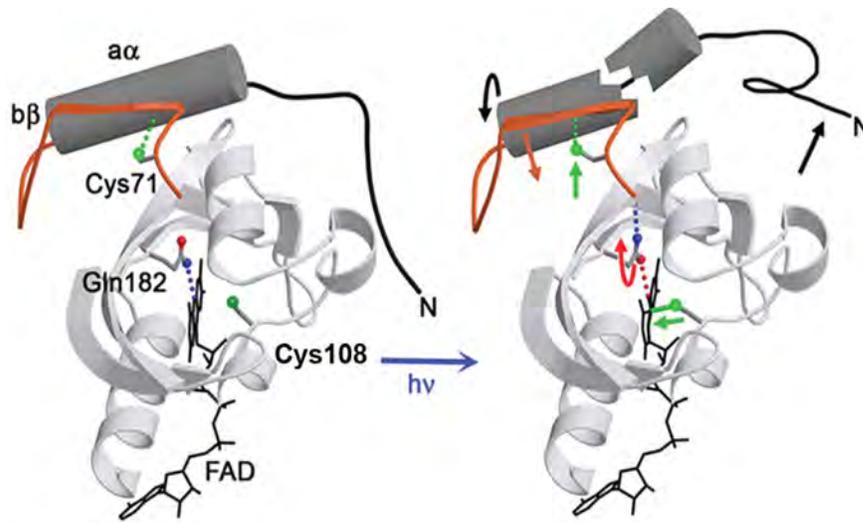


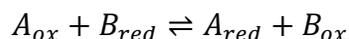
Figura 1.4 Cambio conformacional de la proteína VVD

Bajo la luz azul, VVD forma un aducto entre el tiol de la Cys108 y el átomo de carbono C4a de la flavina. La formación del aducto conduce a un giro de la amida del residuo Gln182 para mantener un puente de hidrógeno con el átomo N5 protonado. Por su parte, la Cys71 localizada en la región bisagra entre el motivo β b y el núcleo PAS, rota e interactúa con la Asp68. De esta manera la región N-cap se disocia del núcleo PAS a través de una región bisagra conservada [72].

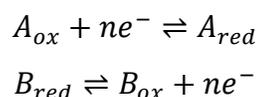
número de factores entre los que figuran la modificación del ambiente y la accesibilidad del solvente a la flavina [71].

1.4. El potencial redox

Una reacción química de oxidación-reducción (redox) es aquella donde los procesos de oxidación y reducción toman lugar al mismo tiempo, es decir, es la transferencia de electrones entre dos especies químicas. De esta manera, una reacción redox se representa como:



la cual puede ser dividida en dos semirreacciones:



En donde una semirreacción muestra la pérdida de electrones (oxidación) causado por el oxidante o agente oxidante, mientras que la otra semirreacción muestra la ganancia de electrones (reducción) causado por el reductante o agente reductor. Una manera para inferir si una sustancia es un agente oxidante fuerte o un agente reductor fuerte, es mediante el llamado potencial redox [10, 64].

El potencial redox, mejor denominado potencial de reducción, es la tendencia de un compuesto a adquirir electrones y por consiguiente ser reducido. Debido a que el movimiento de electrones genera una separación de carga, la afinidad de un compuesto por los electrones puede ser medido por instrumentos que detecten voltaje [32]. Para una semirreacción, lo que se mide es el potencial redox relativo al potencial redox de una semirreacción estándar. Esta semirreacción es usualmente la semirreacción de hidrógeno ($\frac{1}{2}H_2 \rightleftharpoons H^+ + e^{-}$), en la cual una solución 1M de H^+ es equilibrada con gas hidrógeno a 1 atm de presión y cuyo valor asignado del potencial redox es 0.0 V. Debido a la

naturaleza de la medición y de las reacciones, el potencial redox se determina mediante el uso de la ecuación de Nerst:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[a_{ox}]}{[a_{red}]}$$

En donde

E es el potencial redox bajo condiciones no estándar

E° es el potencial redox bajo condiciones estándar (1 M de reactantes, 298 K y 1 atm)

F es la constante de Faraday (96 485 C/mol)

n es el número de electrones transferidos en la reacción

R es la constante de los gases ideales (8.314 J/K mol)

T es la temperatura en K

$\frac{[a_{ox}]}{[a_{red}]}$ es el cociente de las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas

A una temperatura de 298.15 K, el término $\frac{RT}{F}$ se simplifica y se cambia a \log_{10} , con lo que la expresión anterior se escribe como:

$$E = E^{\circ} + \frac{59 \text{ mV}}{n} \log \frac{[a_{ox}]}{[a_{red}]}$$

[15, 4, 53].

1.4.1. El Potencial redox celular

El potencial redox intracelular es una medida de que tan oxidante es el medio ambiente dentro de una célula. Es un equilibrio entre una serie de especies activas redox que incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS), enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (Gpx) y, pares redox como el tripéptido glutatión (GSH) y su forma oxidada (GSSG) [39, 37].

En las células eucariotas, el potencial redox es distinto en cada compartimento, lo que les permite que tengan procesos específicos en cada uno de ellos [5]. Por mencionar algunos, la mitocondria tiene el potencial redox más negativo, ya que tiene las mayores tasas de transferencia de electrones. El núcleo y el citosol también tienen un ambiente reductor pero son relativamente resistentes a la oxidación [21]. Por el contrario, el retículo endoplasmático [31] y el espacio intermembrana mitocondrial mantienen un ambiente más oxidante [29]. Si el potencial redox subcelular es alterado, diversos procesos celulares pueden resultar afectados incluyendo la transducción de señales, el ARN, el ADN, la síntesis de proteínas [41, 67, 68] y la regulación del ciclo celular [7]. Como resultado, la regulación del potencial redox en una célula es críticamente importante para mantener su integridad y por lo tanto su funcionamiento. Es por ello que existen en la célula moléculas capaces de detectar el estado redox interno y externo de una célula, denominados receptores.

En bacterias, por ejemplo, se han descrito diversos sistemas responsables de detectar y regular las respuestas a cambios redox. Entre ellos se encuentran los receptores basados en cisteínas, los cuales utilizan los diferentes estados redox de los tioles para detectar alteraciones redox. Otro tipo de receptores son los que utilizan cofactores sensibles a condiciones redox, tales como NifL [60] y Aer que contienen FAD [54]. Los receptores basados en grupos Fe-S son otro grupo de receptores redox que juegan un papel importante en la regulación transcripcional y post-transcripcional en bacterias. Ejemplos de estos receptores son FnR, SoxR, aconitasa e IcsR [22].

1.4.2. Medición del potencial redox estándar de flavinas unidas a una proteína

Un primer paso para saber si una flavoproteína es un receptor, es determinar el potencial redox de su cofactor en condiciones fisiológicas para después compararlo con el potencial redox intracelular. Un ejemplo de esta estrategia es

la proteína histidina cinasa-LOV de la bacteria *Caulobacter crescentus*, cuyo cofactor tiene un potencial redox (E_m) de -258 mV, un valor muy cercano al potencial redox del citoplasma de las bacterias gram-negativas durante el crecimiento logarítmico ($E_m \sim -260$ mV a -280 m). De esta manera, una fracción de LovK en el citosol puede encontrarse en el estado reducido bajo condiciones de crecimiento típicas [53].

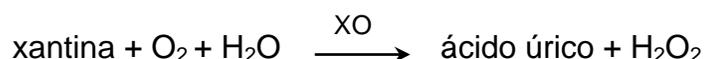
En el laboratorio existen diferentes técnicas electroquímicas y espectrofotométricas para obtener el potencial redox de una flavina.

En los métodos electroquímicos, el estado de oxidación de la flavina de estudio es cambiado electroquímicamente por la adición o remoción de electrones en un electrodo, mientras se mide el cambio en alguna propiedad de la flavina en respuesta a su estado redox. El estado redox puede ser monitoreado por espectroscopia de absorción, dicroísmo circular, voltamperometría cíclica o resonancia de spin electrónica. Sin embargo, como los estados redox de las flavinas en una proteína tienen diferentes propiedades espectrales, la espectroscopia de absorción es la más utilizada [59].

En los métodos espectrofotométricos, el equilibrio entre la flavoproteína de estudio parcialmente reducida y un colorante de referencia son analizadas ópticamente. En esta técnica solo se requiere de: i) un procedimiento para introducir equivalentes reductores dentro de una solución, ii) un sistema para mantener la solución en condiciones anaeróbicas y iii) un espectrofotómetro. Algunos de los métodos más utilizados para introducir equivalentes reductores es mediante la reducción química por ditionito de sodio, la fotoreducción con 5-deazaflavina y con xantina utilizando el sistema xantina-XO, el cual se describirá más adelante debido a la importancia de este estudio [59].

1.4.3. Principio del método de reducción xantina-XO

La xantina oxidasa es una enzima homodimérica que contiene cuatro centros redox comprendidos por una molécula de molibdopterina con un átomo de molibdeno (Mo) como cofactor, dos centros ferro-sulfurados (Fe₂-S₂) y una molécula de FAD en cada subunidad. En cuanto su función, la enzima cataliza la oxidación de xantina a ácido úrico con la subsecuente reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno, como se muestra en la siguiente reacción química:



Sin embargo, la XO puede usar, además del O₂, algunos colorantes con potenciales redox conocidos (colorantes de referencia) tales como la fenosafranina ($E_m = -289 \text{ mV}$ a pH 7.0) y la safranina T ($E_m = -293 \text{ mV}$ a pH 7.0) como aceptores de electrones. Estos colorantes a su vez pueden reaccionar con otros aceptores de electrones y con la mayoría de las flavoproteínas, utilizando benzil viológeno ($E_m = -259 \text{ mV}$ a pH 7.0) o metil viológeno ($E_m = -449 \text{ mV}$ a pH 7.0) como mediadores [59], los cuales permiten acelerar la transferencia de electrones entre el donador primario y el aceptor final de electrones.

Por lo tanto, el ensayo consiste en reducir de manera simultánea el colorante de referencia y la flavoproteína de estudio con el sistema xantina-XO en condiciones anaeróbicas. Así, la mezcla de reacción estará formada por: i) la flavoproteína de estudio a la misma concentración que el colorante de referencia, ii) la xantina, iii) un colorante que funcione como mediador y iv) la enzima xantina oxidasa. Para asegurar el equilibrio entre las especies oxidadas y las especies reducidas, la reducción debe ser lo suficientemente lenta, la cual puede ser regulada por la concentración de xantina oxidasa. Una vez que se inició la reacción de reducción, se registran los espectros de absorción a diferentes tiempos para así obtener los cocientes de concentración de las

especies reducidas y oxidadas del colorante de referencia y de la proteína de estudio [53, 4]. La concentración de cada componente se calcula con la ley de Lambert-Beer, utilizando el coeficiente molar de extinción (ϵ) de FAD a 450 nm ($11\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para VVD y el ϵ de la safranina T ($38\,615\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 519 nm [18]. Finalmente, cuando las especies oxidadas y reducidas de la proteína de interés han alcanzado la misma concentración, se calcula el potencial redox del punto medio (E_m) a partir de la ecuación de Nernst [53, 4; ver sección 5.4]:

$$E_{m_{proteína}} = E_{m_{colorante}} + \frac{59\text{ mV}}{n_{colorante}} \log \frac{[colorante_{ox}]}{[colorante_{red}]}$$

En donde

$n_{colorante}$ es el número de electrones involucrados en la transición redox. En este caso, la safranina T tiene un valor de $n = 1$

$E_{m_{proteína}}$ es el potencial redox al cual las especies reducidas y oxidadas de la proteína alcanzan la misma concentración

$E_{m_{colorante}}$ es el potencial redox al cual las especies reducidas y oxidadas del colorante alcanzan la misma concentración [59].

Los criterios para elegir el colorante de referencia son dos:

- i) Sobrelapamiento mínimo de los espectros de absorción de la flavoproteína y del colorante de referencia
- ii) El potencial redox estándar del colorante de referencia debe ser muy cercano al valor de la proteína de estudio [4].

En este trabajo se seleccionó como colorante de referencia a la safranina T, ya que en estudios previos se han reportado que los dominios LOV tienen valores muy negativos de potenciales redox. Estos potenciales oscilan entre -290 mV (dominio LOV1 de la fototropina de *Chlamydomonas reinhardtii*) [46] y -308 mV (dominio LOV2 de la fototropina 1 de *A. sativa*) [4], es decir, un valor muy cercano al de la safranina T ($E_m = -293\text{ mV}$ a pH 7.0).

Capítulo 2

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales para la estandarización del método de reducción xantina-xantina-XO

La xantina (X, 0626), la xantina oxidasa (XO, X 4376), el benzil viológeno (271845), la glucosa oxidasa (GOx, G 6125), la safranina T (31031), el fosfato de potasio dibásico trihidratado (P9666), el fosfato de potasio monobásico (P9791), la catalasa (C3515) y los reactivos en general se obtuvieron de Sigma Aldrich. La beta D-glucosa (100953) fue suministrada por MP biomedical.

2.2. Cepa bacteriana y vector de expresión

Se utilizó como vector de expresión el plásmido pET28-a (proporcionado por el Dr. Brian Crane de la Universidad de Cornell), el cual contiene el gen que codifica la proteína VVD deletada en los primeros 36 aminoácidos (VVD-36), una etiqueta 6xHis en el dominio N-terminal del gen y un marcador de selección que le confiere resistencia a kanamicina.

La cepa bacteriana utilizada fue la cepa BL21(DE3) de *E. coli* previamente transformada con la construcción ya antes descrita, la cual tiene el promotor de expresión T7.

2.3. Sobreexpresión y purificación de la proteína VVD-36

2.3.1. Sobreexpresión de proteínas

En medio Luria Bertani (LB; 10 g/L de triptona, 5 g/L de NaCl, 5 g/L de extracto de levadura) fresco, suplementado con 50 µg/ml de kanamicina, se inocularon células de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con el plásmido que codifica la proteína VVD-36. El inóculo se incubó a 37°C/180 rpm y a

continuación se hizo una dilución 1:100 en medio LB fresco. El cultivo se mantuvo en constante agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.4-0.6 e inmediatamente después se incubó por 30 min a 18°C. Se indujo la sobreexpresión de proteína con 100 μ M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 22 h a 18°C/180 rpm y bajo constante iluminación. Las células se colectaron por centrifugación a 4°C y se almacenaron a -80°C.

2.3.2. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a níquel

Las células se resuspendieron en amortiguador de lisis (NaCl 300 mM, HEPES 50 mM, glicerol 10%, tritón X-100 1%; pH 7.0) que contenía coctel inhibidor de proteasas libre de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y se lisaron por sonicación (10 ciclos de 20 s con intervalos de 1 min a una amplitud del 40%). El lisado celular se centrifugó a 27 000 g a 4°C por 30 min. El lisado clarificado se pasó dos veces por una columna de gravedad con resina de agarosa cargada con níquel (Ni-NTA) de aproximadamente 2 ml. La resina de Ni-NTA se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de lisis y 10 volúmenes de amortiguador de lavado (NaCl 300 mM, HEPES 50 mM, glicerol 10%, imidazol 10 mM; pH 7.0). Finalmente se liberó la proteína con cuatro volúmenes de amortiguador de elución (NaCl 300 mM, HEPES 50 mM, glicerol 10%, imidazol 200 mM; pH 7.0) colectando fracciones de 1 ml. Debido a que los experimentos posteriores se realizaron en un amortiguador de KH_2PO_4/K_2HPO_4 50 mM, pH 7.0; se hizo un intercambio de amortiguador por filtración en gel mediante una columna PD-10 (GE HealthCare). Todo el procedimiento se llevó a cabo a una temperatura de 4°C.

2.3.3. Electroforesis SDS-PAGE

Durante el proceso de purificación de la proteína se tomaron muestras de aproximadamente 10 μ l. A las muestras se les añadió 10 μ l de amortiguador de carga 2X (Bio Rad) y se calentaron durante 5 min a 95°C. En un gel pre hecho de 4-20% (Bio Rad) se cargaron 20 μ l de cada una de las muestras y 3 μ l de

marcador de peso molecular (Invitrogen). El gel se montó en el sistema de electroforesis, se sumergió en amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3; Bio Rad) y se corrió a 120 V durante aproximadamente 1 h. El gel resultante se tiñió con solución azul de Coomassie (Azul Brillante de Coomassie R-250 0.1%, metanol 50%, ácido acético glacial 10%).

2.4. Cuantificación de proteínas

2.4.1. Espectroscopía por absorción de FAD

La estimación de la proteína total se realizó midiendo la absorbancia de VVD en su estado de oscuridad a una longitud de onda de 450 nm.

La concentración se calculó con la ley de Lambert-Beer ($A = c \cdot \varepsilon \cdot l$) de la siguiente manera:

$$c = \frac{A_{450}}{11\,300\, M^{-1}cm^{-1} \cdot 0.69\, cm}$$

En donde

c es la concentración molar

A_{450} es la absorción a 450 nm

$11\,300\, M^{-1}cm^{-1}$ es el coeficiente molar de extinción de FAD a 450 nm [14]

$0.69\, cm$ es el recorrido de la luz en un volumen de 250 μ l en una placa UV-Vis greiner de 96 pozos

2.4.2. Ensayo de Bradford

Se generó una curva estándar con muestras de proteína albúmina sérica bovina (BSA), cuya concentración varió de 0 a 7.5 μ g/ml. Para ello se mezcló 1 ml de reactivo de Bradford con 100 μ l de muestra de concentración conocida de BSA. A continuación, las muestras se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm. Se hizo lo mismo para las muestras de VVD

de concentración desconocida y se calculó la concentración a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar.

2.4.3. Espectroscopia por absorción UV-Visible

Los espectros de absorción se midieron en la región UV-Vis (200 a 800 nm) en un espectrofotómetro multi-volumen Epoch y en un espectrofotómetro UV-Vis NIR. En el Epoch, la medición se realizó en una placa UV greiner de 96 pozos añadiendo aceite mineral a las muestras para evitar la evaporación; mientras que en el espectrofotómetro UV-Vis NIR, las mediciones se hicieron en celdas de cuarzo de 4 ml que se pueden cerrar con taparrosas con septa para controlar la atmósfera de la reacción. Las gráficas se realizaron con el programa Igor Pro 6.03A.

2.4.4. Cinética de decaimiento del aducto

La proteína recién purificada se mantuvo en oscuridad durante 48 h a 4 °C (10%, 20% y 30% de glicerol) o a -20 °C (40% y 50% de glicerol). A continuación, se tomó el espectro de VVD en su estado de oscuridad e inmediatamente después fue fotoexcitada con un led azul durante 5 min. Posterior a la fotoexcitación, se tomaron espectros en intervalos de 20 min durante 5 h. El tiempo de vida media del aducto se calculó al ajustar los datos obtenidos de la cinética de absorción a 450 nm a diferentes tiempos, a una función exponencial en el programa IGOR Pro 6.03A.

2.4.5. Estandarización del sistema de reducción xantina-XO

El ensayo que se estandarizó para medir el potencial redox estándar de VVD se adaptó del método xantina-XO desarrollado por Massey [40].

2.4.5.1. Actividad enzimática del sistema xantina-XO

En una celda de cuarzo de 4 ml o en una placa UV-greiner de 96 pozos se añadió la mezcla de reacción que consiste en amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7.0, EDTA 0.1 mM y xantina a diferentes concentraciones (100 μM , 200 μM , 300 μM). Para iniciar la oxidación de la xantina se añadió XO a una concentración final de 75 $\mu\text{g/ml}$. Inmediatamente después se midió el espectro de absorción de 200-400 nm. También se obtuvo la actividad enzimática de la xantina-XO en un amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH 7.0 con 10% y 20% de glicerol.

2.4.5.2. Cuantificación de la xantina y del ácido úrico

La estimación de las concentraciones de la xantina y del ácido úrico se realizó a partir de los espectros de absorción de la actividad enzimática de la xantina oxidasa. Para ello se utilizó la ley de Lambert-Beer:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

En donde

c es la concentración molar

A es la absorción a 269 nm y 291 nm, longitudes de onda máximas de la xantina y del ácido úrico respectivamente

ε es el coeficiente molar de extinción de la xantina ($9\,480\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [1] y del ácido úrico ($11\,950\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [58]

l es el recorrido de la luz. Se utilizó 1 cm para la celda de cuarzo de 4 ml y 0.69 cm para la placa UV-Vis greiner de 96 pozos con un volumen de 250 μl .

2.4.5.3. Evaluación del sistema xantina-XO en condiciones anaeróbicas

Se utilizaron dos métodos para mantener el sistema en condiciones anaeróbicas. El primero de ellos consistió en burbujear gas N_2 durante 40 minutos a la mezcla de reacción (amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM pH

7.0, EDTA 0.1 mM y XO 75 µg/ml) contenida en una celda de cuarzo de 4 ml cerrada con una taparrosca con septa, mientras estaba en agitación. De igual manera, se mantuvo en gas N₂ a una solución de xantina 20 mM, la cual se añadió posteriormente a la mezcla de reacción vía una jeringa de insulina a través de la septa para tener una concentración final de 100 µM. Inmediatamente después se registraron los espectros de absorción de 200-400 nm durante 2 h con intervalos de 2 min. Bajo las mismas condiciones de gas N₂, se hicieron algunas pruebas añadiendo la combinación glucosa-glucosa oxidasa (GOx), ya que no fue posible quitar por completo el oxígeno molecular dentro de la celda. Una vez que trascurrieron las 2 h, se destapó la celda con la mezcla de reacción.

El segundo método se llevó a cabo en condiciones aeróbicas utilizando el sistema glucosa-GOx/catalasa a diferentes concentraciones. Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro multi-volumen Epoch.

2.4.5.4. Reducción del colorante safranina T en condiciones anaeróbicas

La reducción de 5 µM de safranina T se llevó a cabo en aire con la combinación de 9 U/ml de GOx, 10 mM de glucosa y 200 U/ml de catalasa con 100 µM de xantina y 75 µg/ml de XO.

2.4.6. Caracterización de VVD en condiciones anaeróbicas

En una placa UV greiner de 96 pozos se depositaron mezclas de VVD-36 6 µM con diferentes concentraciones de la combinación glucosa-GOx/catalasa en amortiguador de KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM pH 7.0 con 10% o 20% de glicerol. Una vez que la proteína se encontraba en su estado de luz, se registraron los espectros de absorción de 200-600 nm durante 5 h con intervalos de 20 min.

Capítulo 3

3. Resultados y discusión

3.1. Expresión y purificación de la proteína VVD-36

Durante el procedimiento de purificación y tras la elución, se observó que la muestra con la proteína VVD-36 suspendida era de un color amarillo intenso (**Fig. 3.1 B**), color característico de FAD en solución. Este resultado nos indicó que la proteína VVD-36 se logró purificar mediante cromatografía de afinidad a Ni-NTA bajo condiciones nativas.

Para evaluar la pureza y verificar la expresión de la proteína se realizó un ensayo de electroforesis SDS-PAGE. En el gel de poliacrilamida resultante (**Fig. 3.1 A**) se puede observar que la banda que corresponde a la elución de VVD-36 es del peso molecular esperado (17 kDa) y además se encuentra lo suficientemente pura para continuar con los experimentos.

3.2. Cinética de decaimiento del aducto de la proteína VVD-36 bajo diferentes concentraciones de glicerol

Para probar que la proteína VVD obtenida era funcional, medimos la cinética de decaimiento del aducto por absorbancia de luz. Al realizar el experimento nos encontramos con un problema. El espectro de absorción UV-Vis de VVD purificada con el protocolo ya descrito, y previamente reportado por Zoltowski y colaboradores, muestra un corrimiento de absorción inesperado (**Fig. 3.2 A**). Este corrimiento se vio agravado con concentraciones de proteína superiores a 1 mg/ml, donde se observó incluso proteína precipitada, por lo que el corrimiento de absorción se asoció a la agregación de la proteína. Se utilizaron entonces concentraciones inferiores a 1 mg/ml, sin embargo, el corrimiento siguió presente. Por tal motivo, se probaron diferentes condiciones durante la purificación. Entre ellas se encuentran las siguientes:

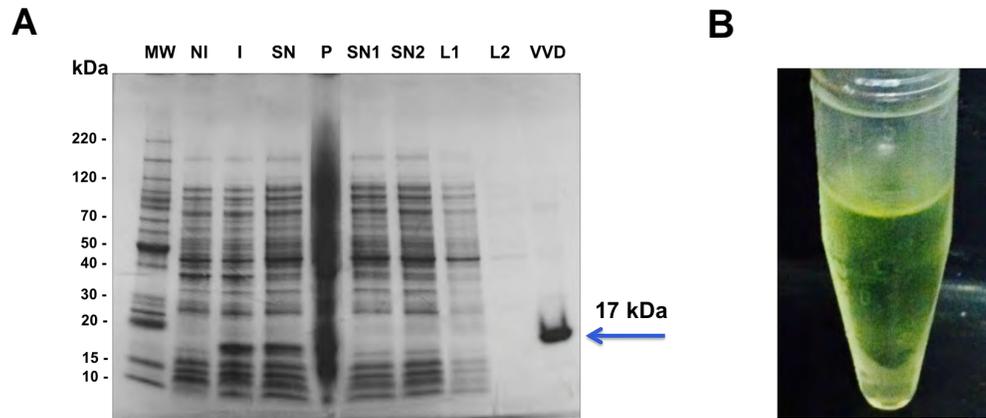


Figura 3.1 Gel de poliacrilamida con SDS de la expresión y purificación de la proteína VVD-36

(A) Marcador de peso molecular (MW), No inducido (NI), Inducido (I), Sobrenadante después de sonicar (SN), Pastilla después de centrifugar el lisado clarificado (P), Sobrenadante después de pasar por la columna de níquel (SN1 y SN2), Primer lavado (L1), Segundo lavado (L2), Elución de la proteína VVD-36 (VVD) **(B)** Elución de proteínas.

- a. Después de la purificación, el amortiguador de elución se cambió a un amortiguador libre de imidazol (50 mM HEPES, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 8).
- b. En lugar de añadir al amortiguador de lisis NaCl 300 mM, se utilizó NaCl 150 mM.
- c. Al amortiguador de lisis se añadió dicloro difenil tricloroetano (DTT) 1 mM y glutatión 10 mM para mantener el estado reducido de la proteína.
- d. Se utilizó tris 50 mM en lugar de 50 mM de HEPES, ya que se ha reportado que HEPES es fototóxico cuando es expuesto a la luz ambiental [35]

Bajo las condiciones anteriores el corrimiento en los espectros de absorción no se vio disminuido. Finalmente, decidimos almacenar la proteína a 50% de glicerol y tomar las cinéticas de recuperación de VVD a concentraciones superiores a 10% de glicerol (20%, 30%, 40% y 50%). Encontramos que a concentraciones de 40% y 50% de glicerol la proteína muestra los espectros característicos de VVD (**Fig. 3.2 D y 3.2 E**).

En la **Fig. 3.2 F** se muestra la cinética de decaimiento del aducto de VVD con 50% de glicerol, donde se observa que el valor de $t_{1/2}$ que se obtuvo fue de ~4095 s, poco menos de la mitad del valor reportado ($t_{1/2} = 10\ 000$ s) (45). Algunos de los posibles factores que contribuyen a esta diferencia son: la temperatura a la que se tomaron los espectros, la concentración de imidazol presente en la muestra y la tasa de adquisición de datos, la cual afecta la repoblación de la proteína en su estado activo debido a la fuente de luz.

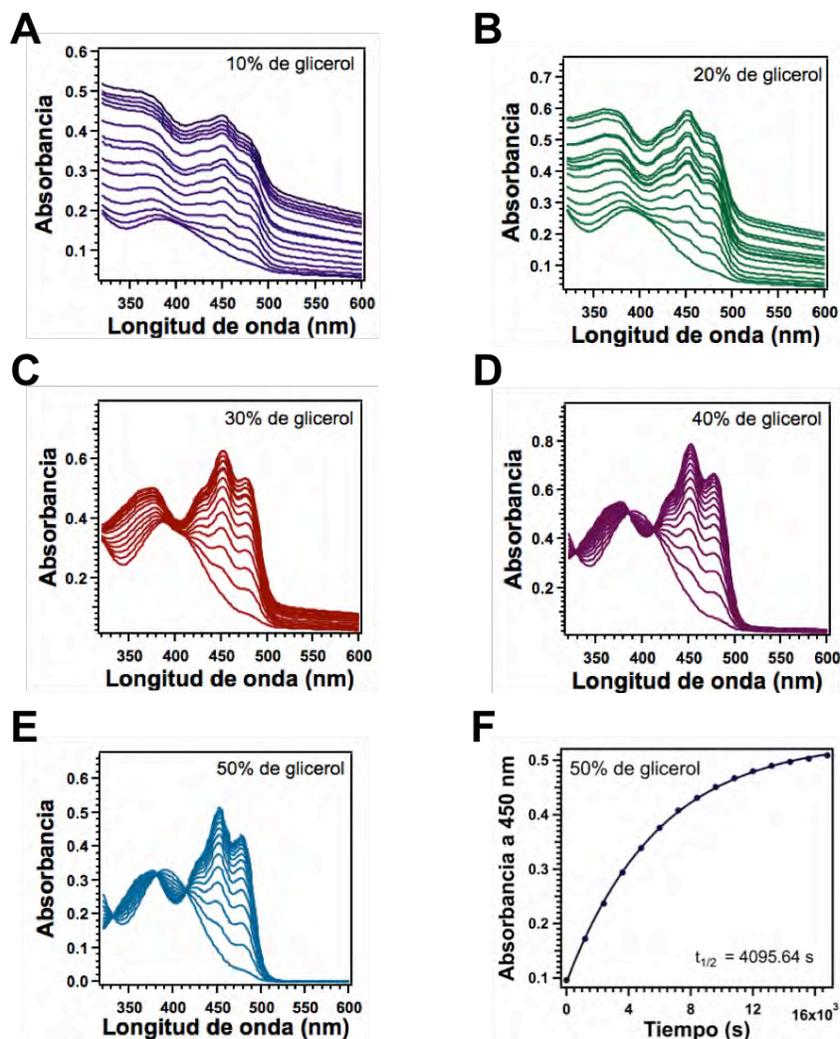


Figura 3.2 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 a diferentes concentraciones de glicerol y tiempo de vida medio del aducto

(A), (B), (C), (D) y (E) Muestran los espectros de VVD en diferentes concentraciones de glicerol en su estado de luz, donde la formación del aducto muestra un solo pico a 390 nm. En su estado de oscuridad, VVD presenta un pico máximo a 450 nm y dos picos menores a 428 y 478 nm. Durante la cinética de decaimiento del aducto, aparecieron los tres puntos isobésticos a 328 nm, 383 nm y 413 nm, valores muy cercanos a los ya reportados. Las trazas intermedias representan el perfil de recuperación de la proteína del estado de luz al estado de oscuridad a diferentes tiempos. (F) Tiempo de vida media del aducto de VVD a una concentración de 50% de glicerol. Los puntos negros representan los datos obtenidos a diferentes tiempos de la cinética de decaimiento del aducto, mientras que la línea continua es el ajuste a una función exponencial.

3.3. Estandarización del sistema de reducción xantina-XO

Para medir el potencial redox estándar de VVD se eligió el sistema de reducción xantina-XO desarrollado por Massey (40), ya que es un método relativamente sencillo y ya se ha utilizado en estudios previos de diversas flavoproteínas, incluso de proteínas con dominios LOV. Por lo tanto, el primer paso fue comparar diversos protocolos para establecer las condiciones y las concentraciones que se probarían como punto de partida (**Tabla 3.1**)

3.3.1. Actividad enzimática del sistema xantina-XO bajo diferentes concentraciones de xantina

Se verificó que la enzima xantina oxidasa era capaz de oxidar la xantina a ácido úrico. Para ello se registraron espectros de absorción a diferentes tiempos de la actividad enzimática de la xantina oxidasa, ya que la xantina y el ácido úrico absorben a una longitud de onda muy cercana a 269 nm y 291 nm respectivamente. Las concentraciones que se probaron en primer instancia fueron 75 µg/ml de xantina oxidasa y 400 µM de xantina, sin embargo la reacción fue inhibida (**Fig. 3.3 E**). Por tal motivo se decidió probar con concentraciones menores de xantina (100 µM y 200 µM) manteniendo la misma concentración de enzima (**Fig. 3.3 A y 3.3 C**).

Cuando la reacción enzimática se llevó a cabo con 100 µM y 200 µM de xantina, la reacción ocurrió en su totalidad. De esta manera se obtuvieron los espectros característicos tanto de la xantina como del ácido úrico, con los cuales se calcularon las concentraciones a diferentes tiempos y por consiguiente los tiempos de vida media de cada una de las especies. Así, a una concentración de 100 µM de xantina, el tiempo de vida media de ambos componentes fue de ~12 min (**Fig. 3.3 B**), aproximadamente la mitad del valor que se obtuvo a una concentración de 200 µM (**Fig. 3.3 D**).

Proteína (μM)	NifL	BLUF	LovK	VAO	Proteínas en general	Proteínas hemo 3-4
	24	20	20	2-12	8-10	
xantina (μM)	500	400 ¹	200	400	400	300
Xantina oxidasa	Cantidad catalítica	75 μg/ml ¹	0.2-0.5 nM	-----	0.5-2 μg/ml	50 nM
Glucosa (mM)	-----	10 ¹	-----	-----	-----	5 ¹
Glucosa oxidasa	-----	50 μg/ml / 0.865 U/ml ¹	-----	-----	-----	50 μg/ml
Catalasa	-----	-----	-----	-----	-----	5 μg/ml / 47.3 U/ml ¹
Colorante	Antraquinona -2,6-disulfonato 46 μM	Safranina O Fenosafraña Antraquinona -2-sulfonato 20 μM	Fenosafraña Safranina-T ¹	Azul de metileno indigo disulfonato 2-10 μM	8-10 μM	-----
Mediador	Benzil viológeno 2 mM	Metil viológeno 2 μM	Benzil viológeno 1 μM	Benzil viológeno 2 μM ¹	Benzil o metil viológeno 2.5 μM	-----
Amortiguador	Tris 50 mM, EDTA 0.1 mM; pH 8 a 25 °C	Tris-HCl 50 mM; pH 8.0, EDTA 1 mM a 25 °C	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 100 mM, pH 7.0	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7.5		K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 50 mM, pH 7.0 ¹
Referencias	[36]	[4]	[53]	[17]	[59]	[16]

Tabla 3.1 Condiciones reportadas en la literatura bajo las que se ha llevado a cabo el método de reducción xantina-XO

¹Condiciones y concentraciones que se probaron por primera vez para la estandarización del método de reducción xantina-XO.

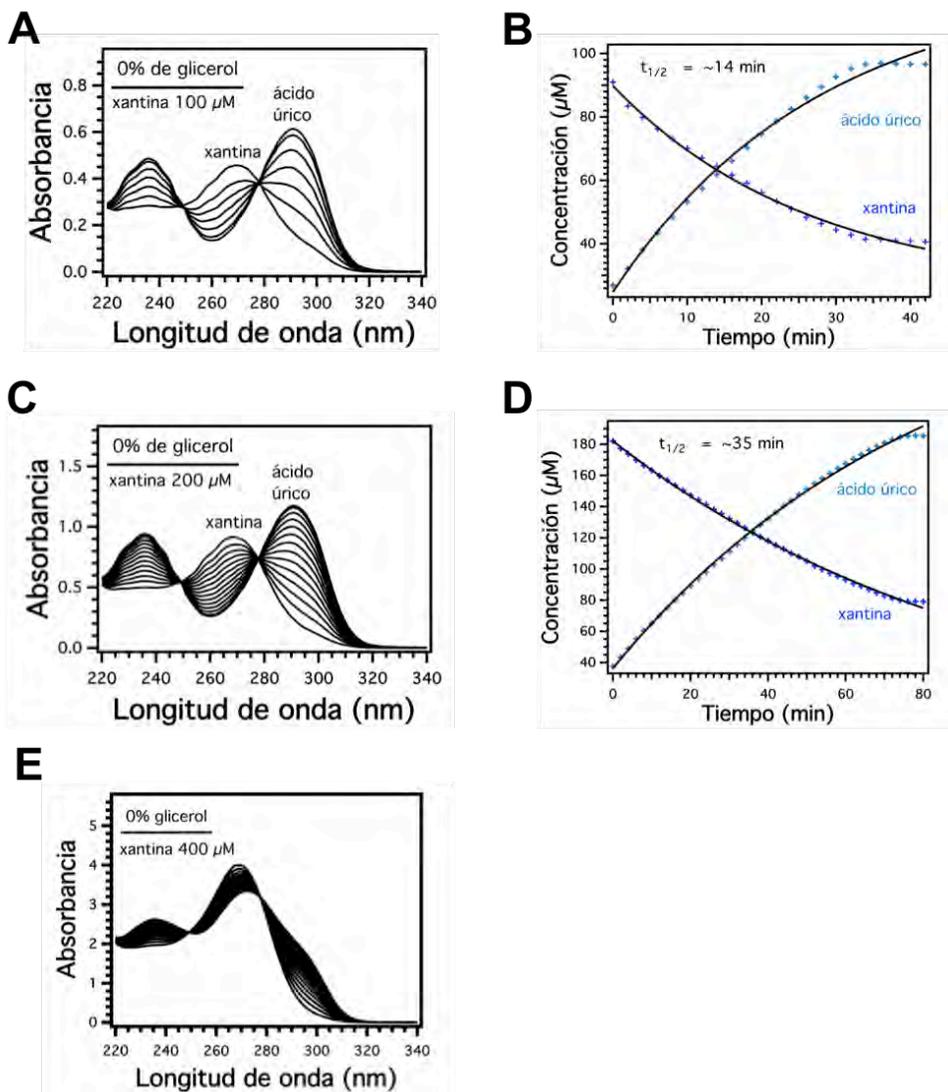


Figura 3.3 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones aeróbicas
Espectros de absorción de la actividad enzimática del sistema xantina-XO en un amortiguador de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.0 con una concentración final de xantina de **(A)** 100 μM **(B)** 200 μM y **(C)** 400 μM . Las trazas se registraron **(A)** cada minuto durante 90 min y **(B)**, **(C)** cada 2 min durante 120 min. Sin embargo, sólo se muestra 1 de cada 5 trazas. **(D)** y **(E)** Tiempos de vida media de la xantina y del ácido úrico de las figuras **(A)** y **(B)** respectivamente. Los asteriscos representan los datos obtenidos a diferentes tiempos de la actividad enzimática de la xantina y del ácido úrico, mientras que las líneas continuas son el ajuste a una función exponencial.

Debido al objetivo de este trabajo, era importante que la reacción ocurriera entre 1.5 a 2 h para asegurar el equilibrio entre las especies oxidadas y las especies reducidas. Dicha condición se cumplió cuando la reacción ocurrió con 75 $\mu\text{g/ml}$ de xantina oxidasa y 200 μM de xantina. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que el sistema debe estar en las condiciones en las que la proteína no se agregue, es decir, entre 40% y 50% de glicerol. Por lo que se eligió como concentración final de xantina 100 μM , ya que, como se esperaba, la xantina se oxida más lentamente mientras más concentración de glicerol (**Fig. 3.4**), como se describe a continuación.

Caracterizamos el sistema xantina-XO con 40% de glicerol (**Fig. 3.4 D**), donde se observó que la reacción enzimática no se inhibió en 2 h, pero tampoco ocurrió por completo, aunque el tiempo fue suficiente para que aproximadamente 70 μM de xantina se oxidara a ácido úrico (**Fig. 3.4 E**).

3.3.2. Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones anaeróbicas

Una vez que se establecieron las concentraciones óptimas de xantina y xantina oxidasa, se prosiguió a comprobar que las condiciones anaeróbicas fueran las adecuadas. Para este fin, se registraron los espectros de absorción a diferentes tiempos de la actividad enzimática de la xantina oxidasa en una atmósfera de gas N_2 o en presencia del sistema glucosa-GOx/catalasa, esperando que la reacción fuera inhibida ya que no había ninguna molécula que fungiera como aceptora de electrones.

Bajo una atmósfera de gas N_2 , aproximadamente el 90% de la reacción fue inhibida durante 2 h. Además, la reacción fue reversible cinco minutos después de que se abrió la celda (**Fig. 3.5 A**). Para mejorar las condiciones anaeróbicas se decidió añadir a la mezcla de reacción el sistema glucosa-GOx. De esta

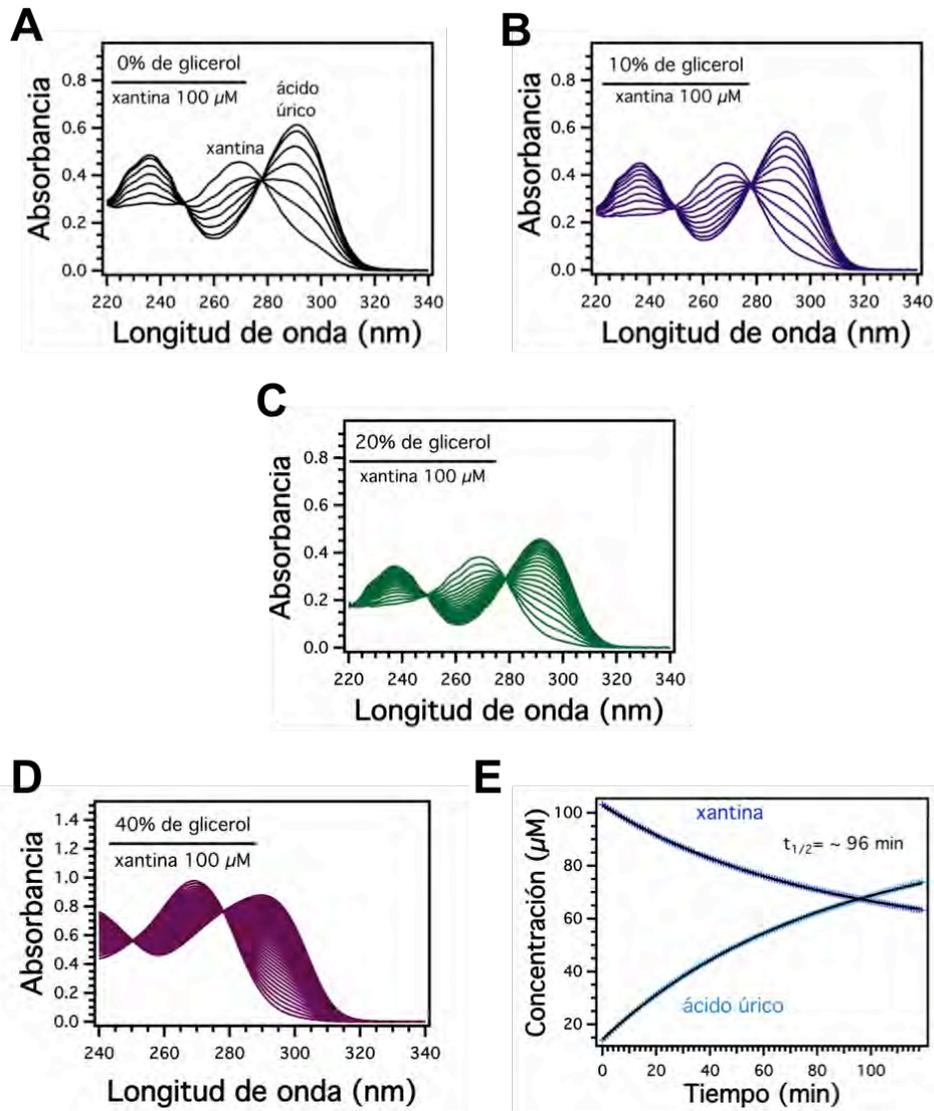


Figura 3.4 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en condiciones aeróbicas a diferentes concentraciones de glicerol

Espectros de absorción de la actividad enzimática del sistema xantina-XO en un amortiguador de K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 con **(A)** 0%, **(B)** 10%, **(C)** 20% y **(D)** 40% de glicerol. Las concentraciones de xantina y XO fueron 100 μ M y 75 μ g/ml respectivamente. Las trazas se registraron cada minuto durante 2 h, pero solo se muestran las trazas que se registraron cada 3 min. **(E)** Tiempo de vida media de la xantina y del ácido úrico de la figura **(D)**. Los asteriscos representan los datos obtenidos a diferentes tiempos de la actividad enzimática de la xantina y del ácido úrico, mientras que las líneas continuas son el ajuste a una función exponencial.

manera la reacción se inhibió de un 3.6% (**Fig. 3.5 B**) a un 3% (**Fig. 3.5 C**), sin embargo no se logró inhibir por completo.

A pesar de que la reacción se inhibe de manera considerable con las condiciones antes descritas (indicando condiciones anaeróbicas apropiadas), el sistema presenta dos desventajas principales: i) se requiere de volúmenes muy grandes de reactivos (del orden de varios mililitros) y ii) sólo se puede realizar un experimento a la vez, lo que limita el número de pruebas y hace lento el proceso de optimizar condiciones en un experimento con muchas variables. Como alternativa, el sistema xantina-XO se probó bajo diferentes concentraciones de la combinación glucosa-GOx/catalasa en aire (para intentar imponer las condiciones anaeróbicas) y se utilizó un espectrofotómetro multi-volumen Epoch para disminuir los volúmenes de las mezclas de reacción y probar más de una condición a la vez.

A una concentración de 0.865 U/ml de GOx, 10 mM de glucosa y 43.7 U/ml de catalasa, la reacción xantina-XO ocurrió por completo en aproximadamente 65 minutos (**Fig. 3.6 B**), el doble de tiempo que le llevó convertir la xantina a ácido úrico sin la combinación glucosa-GOx/catalasa (**Fig. 3.6 A**). Al aumentar la concentración de catalasa y de glucosa/catalasa no se vio un cambio significativo con respecto a las primeras condiciones que se probaron (**Fig. 3.6 C y 3.6 D**), por lo que también se aumentó la concentración de GOx a 2 U/ml. Bajo esta condición aproximadamente el 60% de la reacción ocurrió en 70 min (**Fig. 3.6 E**).

El mayor efecto en inhibir la reacción enzimática de la xantina-XO fue cuando se aumentó la concentración de la GOx, por lo que se decidió aumentar la concentración hasta 9 U/ml. A dicha concentración aproximadamente el 96% de la reacción se inhibió después de un tiempo de 2 h (**Fig. 3.6 F**), comparable a lo que se obtuvo cuando la reacción se llevó a cabo en una atmósfera de gas N₂ con la combinación GOx-glucosa

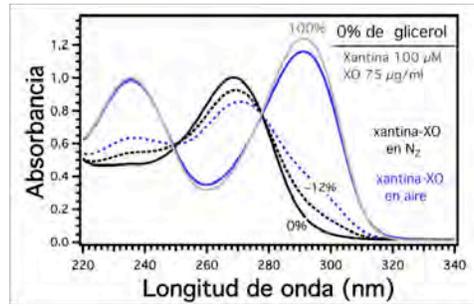
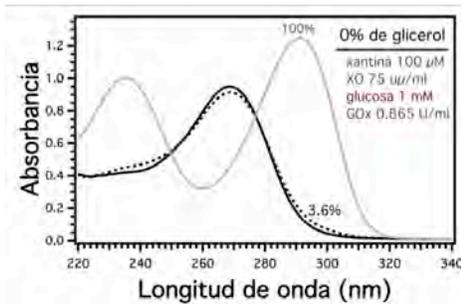
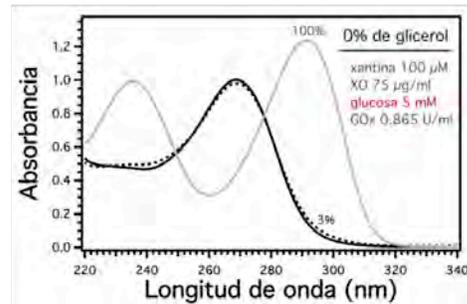
A**B****C**

Figura 3.5 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en gas N₂

Espectros de absorción de la actividad enzimática del sistema xantina-XO en un amortiguador de K₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, pH 7.0 bajo una atmósfera de gas N₂ (trazas negras) **(A)** sin el sistema glucosa-GOx y en aire cinco minutos después de abrir la celda (trazas azules), **(B)** con 1 mM de glucosa y **(C)** con 5 mM de glucosa. Las trazas grises representan el 100% de ácido úrico si la reacción xantina-XO se lleva a cabo en condiciones aeróbicas.

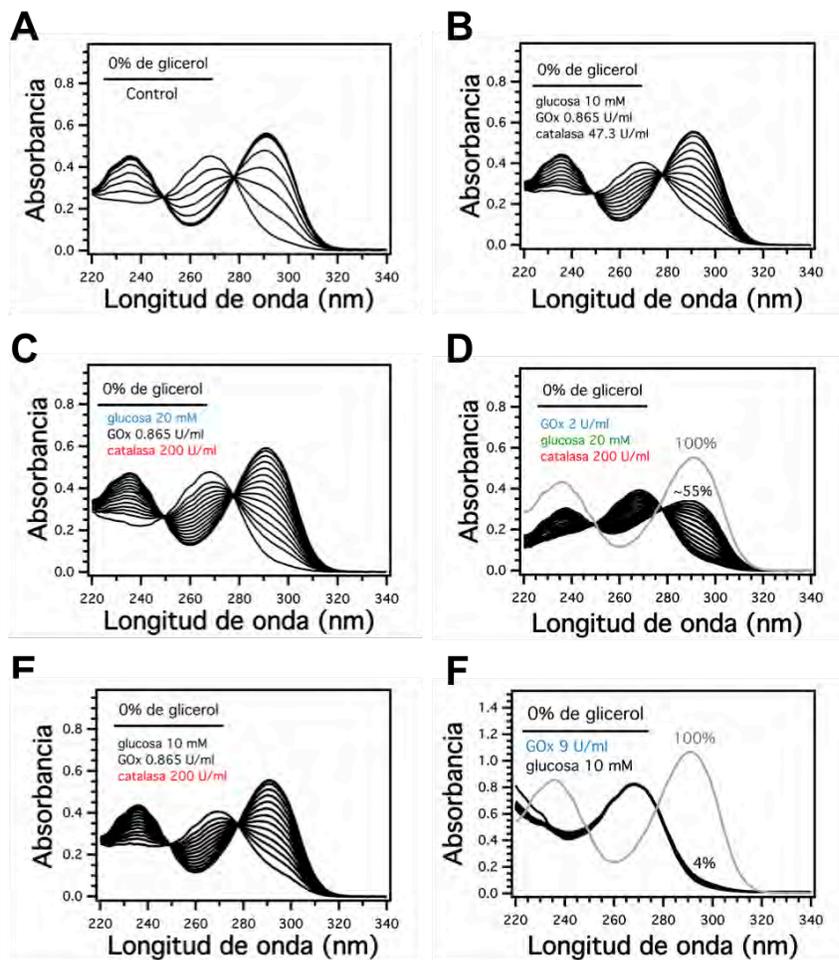


Figura 3.6 Actividad enzimática del sistema xantina-XO en presencia de la combinación GOx-glucosa/catalasa

Espectros de absorción de la actividad enzimática del sistema xantina-XO en un amortiguador de K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 **(A)** en condiciones ambientales (control); con **(B)** 10 mM de glucosa, 0.865 U/ml de GOx y 47.3 U/ml de catalasa; **(C)** 20 mM de glucosa, 0.865 U/ml de GOx y 200 U/ml de catalasa; **(D)** 20 mM de glucosa, 2 U/ml de GOx y 200 U/ml de catalasa, **(E)** 10 mM de glucosa, 0.865 U/ml de GOx y 200 U/ml de catalasa y **(F)** 10 mM de glucosa y 9 U/ml de GO. En **(D)** y **(F)** las trazas grises representan el 100% de ácido úrico si la reacción xantina-XO se lleva a cabo en aire.

3.3.3. Caracterización de la proteína VVD-36 en condiciones anaeróbicas

Se caracterizó la cinética de decaimiento del aducto de la proteína VVD-36 en presencia del sistema GOx-glucosa/catalasa y en un buffer de K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 para conocer el comportamiento de la proteína en las condiciones en las que se realizará la medición del potencial redox estándar de de VVD. Tanto el pH del amortiguador como una atmósfera libre de oxígeno son parámetros que podrían modificar el tiempo de vida medio del aducto ya que durante el tiempo de vida del aducto la flavina se encuentra en un estado reducido. En cuanto a la concentración de proteína, se mantuvo la razón 1:20 de proteína-xantina reportado en el protocolo descrito por Arents y colaboradores (4).

Cuando la proteína se mantuvo en una atmósfera anaeróbica a las concentraciones del sistema GOx-glucosa/catalasa ya previamente descritas, se encontró que a 10% de glicerol, la proteína no se agregó en un intervalo de 60 min (**Fig. 3.7 E**) a 80 min (**Fig. 3.7 E**), mientras que a una concentración de 20% de glicerol la agregación ocurrió después de las 2.5 h (**Fig. 3.8 B y 3.8 E**) o 5.5 h (**Fig. 3.8 C y 3.8 F**). Estos resultados nos indican que dicho sistema reduce el problema de agregación permitiéndonos trabajar en concentraciones de glicerol menores. Además, se sugiere que la formación de agregados puede ser ocasionada por la oxidación de la proteína.

Para evaluar cuál de las dos enzimas, GOx o catalasa, tiene mayor efecto inhibiendo el corrimiento de los espectros de absorción, se midieron los espectros de absorción a diferentes tiempos de VVD en presencia de la GOx y catalasa de manera independiente.

En un ambiente anaeróbico con producción de H_2O_2 por la acción de la GOx, tanto a una concentración de glicerol de 10% como de 20%, las trazas de absorción mostraron un corrimiento comparable al corrimiento que ocurre cuando VVD se encuentra en condiciones aeróbicas. Asimismo, se perdieron

los dos picos menores de absorción a 428 nm y 478 nm de los espectros en su estado de oscuridad (**Fig. 3.7 C y 3.8 D**). Lo anterior nos sugiere que VVD se agrega en presencia de especies reactivas de oxígeno perdiendo la molécula de FAD.

Por otro lado, cuando el sistema se mantuvo libre de peróxido de hidrógeno por la acción de la catalasa, el corrimiento de las trazas de absorción se observaron ligeramente disminuidos en comparación al espectro de absorción de la **Fig. 3.7 B**, aunque el efecto fue aún más notable con 20% de glicerol (**Fig. 3.8 C**). Así, los resultados nos indican que tanto el O₂ como el H₂O₂ afectan la estabilidad de la proteína, aunque el H₂O₂ lo hace en mayor medida.

Nuestra observación de una posible relación entre la dinámica de agregación con el estado de oxidación de una proteína es importante en el contexto de la estabilidad de proteínas en general, por lo que será explorada con mayor detalle por nuestro grupo de trabajo.

3.3.4. Reducción del colorante safranina T con el sistema xantina-XO

La etapa final del proceso de estandarización del protocolo para medir el potencial redox de VVD consistió en comprobar que el colorante de referencia safranina T se reducía bajo las condiciones y concentraciones que se encontraron como las óptimas, a excepción de la concentración de glicerol.

Cabe mencionar que la safranina T presenta un espectro de absorción característico con un pico máximo a 519 nm en la región visible en su estado oxidado (**Figura 3.9 A**), mientras que en su estado reducido no presenta espectro de absorción, por lo que es posible determinar si el colorante está reducido u oxidado por medio espectroscopía UV-Vis.

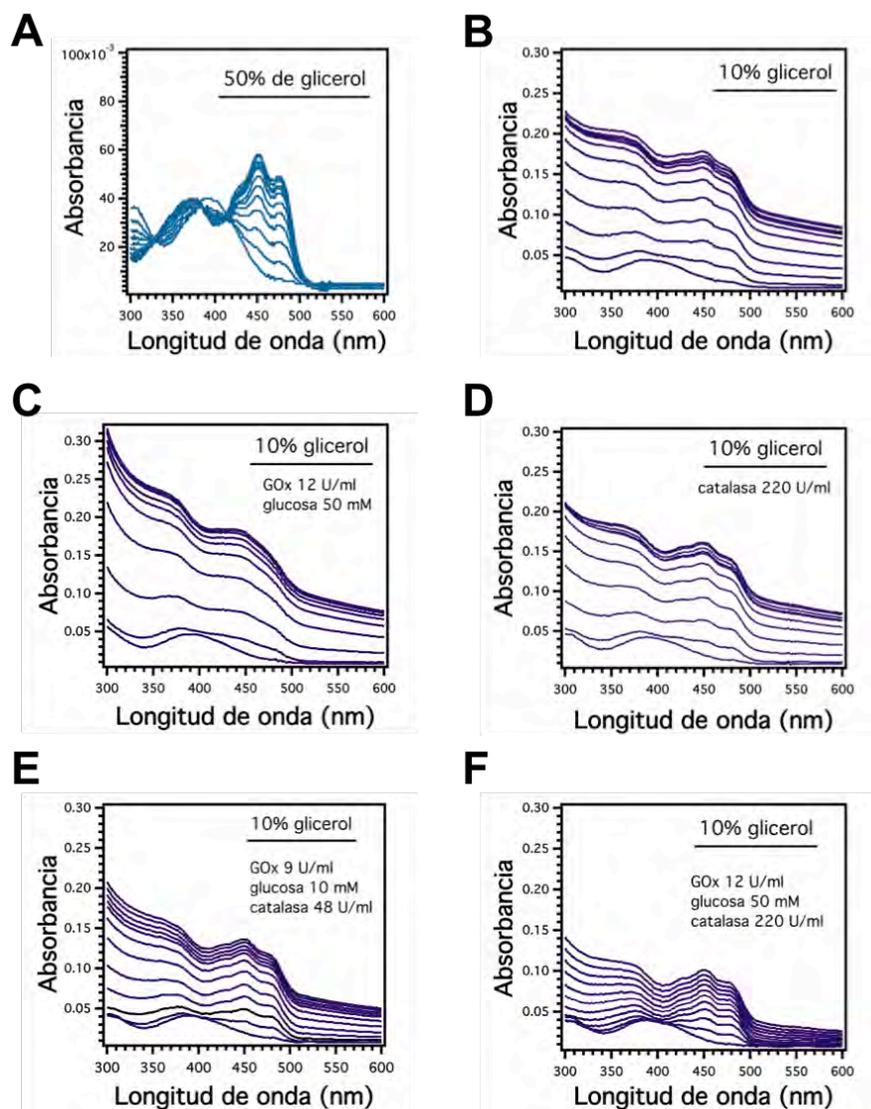


Figura 3.7 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 con 10% de glicerol en presencia del sistema glucosa-GOx/catalasa

Cinética de decaimiento del aducto de 5 μM de VVD-36 en un amortiguador de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.0 **(A)** con 50% de glicerol, con **(B)** 10% de glicerol, **(C)** con 10% de glicerol más 12 U/ml de glucosa oxidasa y 50 mM de glucosa, **(D)** con 10% de glicerol más 220 U/ml de catalasa, **(E)** con 10% de glicerol más 9 U/ml de glucosa oxidasa, 10 mM de glucosa y 48 U/ml de catalasa y **(F)** con 10% de glicerol más 12 U/ml de glucosa oxidasa, 50 mM de glucosa y 220 U/ml de catalasa. La trazas se registraron cada 20 minutos durante 6 h, pero sólo se muestran las trazas que se tomaron cada 30 min.

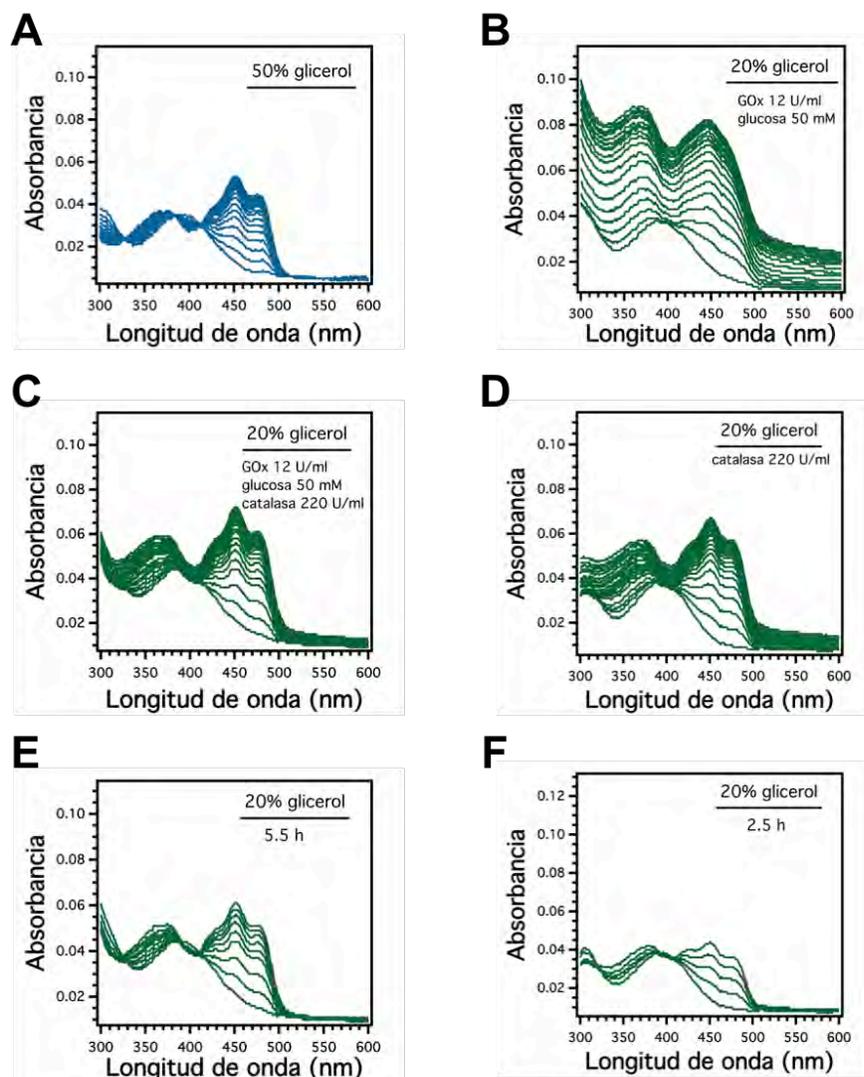


Figura 3.8 Espectros de absorción UV-Vis de la proteína VVD-36 con 20% de glicerol en presencia del sistema glucosa-GOx/catalasa

Cinética de decaimiento del aducto de VVD-36 en un amortiguador de K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, pH 7.0 **(A)** con 50% de glicerol como control, con **(B)** 20% de glicerol más 12 U/ml de glucosa oxidasa, 50 mM de glucosa y 220 U/ml de catalasa, **(C)** con 20% de glicerol más 220 U/ml y **(D)** con 20% de glicerol más 12 U/ml de glucosa oxidasa y 50 mM de glucosa. **(E)**, **(F)** Espectros de absorción antes de que haya un corrimiento en las trazas de las figuras **(B)** y **(C)** respectivamente. La trazas se registraron cada 20 minutos durante 6 h, pero sólo se muestran las trazas que se tomaron cada 30 min.

Una vez que se realizó el experimento de reducción del colorante, se observó que la absorción a 519 nm disminuyó en un tiempo de aproximadamente 30 min, es decir, que el colorante se redujo parcialmente (**Fig. 3.9 B**). Sin embargo, inmediatamente después de ese tiempo la safranina T se oxidó debido a la entrada de O₂ a la muestra (**Fig. 3.9 C**). Lo anterior pudo haber ocurrido porque i) el sistema glucosa-GOx perdió eficiencia ó ii) por la imperfección del arreglo experimental que permitió la entrada de oxígeno al sistema.

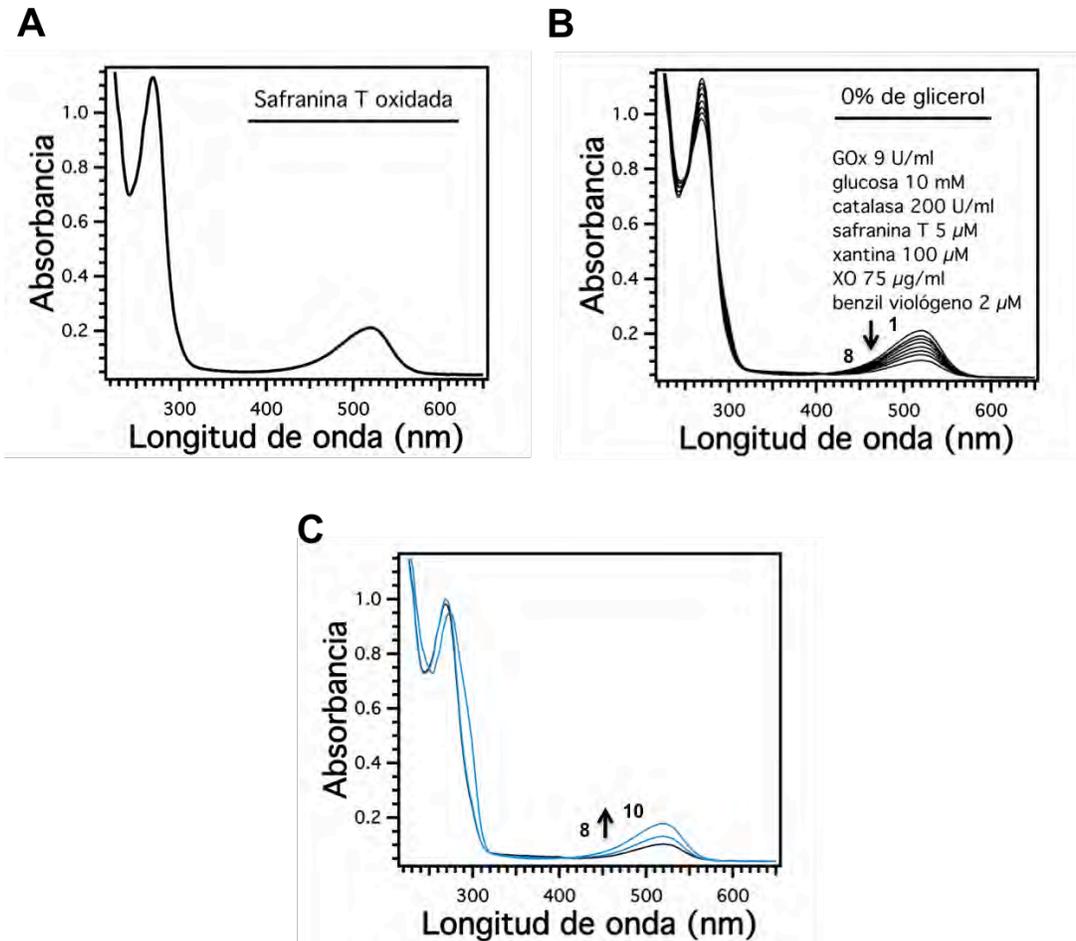


Figura 3.9 Reducción del colorante de referencia safranina T en condiciones anaeróbicas

(A) La safranina T en su estado oxidado presenta un espectro característico en la región visible con un pico máximo a 519 nm. **(B) y (C)** Muestran los espectros de absorción del colorante en presencia del sistema de reducción xantina-XO con la combinación glucosa-GOx/catalasa, utilizando como mediador 2 μ M de benzil viológeno. Las flechas indican el sentido en el que se registraron las trazas a diferentes tiempos, mientras que los números 1,8 y 8,10 son la traza inicial,final de cada figura.

Capítulo 4

4. Conclusiones

La proteína VVD-36 se logró purificar mediante el protocolo ya antes descrito por Zoltowsky y colaboradores. Además, se encontró que la proteína es funcional a una concentración de entre 40% y 50% de glicerol, aunque experimentos posteriores nos mostraron que la proteína en presencia de la combinación glucosa-GOx/catalasa a concentraciones de 10% y 20% de glicerol también es funcional. En estudios previos se ha reportado que el sistema glucosa-GOx/catalasa funciona como “scavenger” de oxígeno, lo que nos sugiere que VVD se agrega bajo condiciones oxidantes, sin embargo el mecanismo no es aún entendido.

Por otro lado, se desarrolló un protocolo experimental para determinar el potencial redox estándar de la proteína VVD con el sistema xantina-XO. En particular, mediante la variación sistemática de parámetros, logramos obtener las condiciones y concentraciones de los reactantes bajo las cuales se llevarán a cabo las mediciones con la proteína de estudio VVD. Como primera prueba, ya se demostró que el sistema xantina-XO, bajo las condiciones ya descritas, es capaz de reducir la safranina T en condiciones anaeróbicas durante un tiempo de 30 minutos. Sin embargo, la reacción no se llevó a cabo en un amortiguador con glicerol, lo que podría hacer más lenta la reacción o incluso inhibirla.

Finalmente, para llevar a cabo la medición del potencial redox de VVD, resta probar el sistema desarrollado con la proteína y efectuar un ciclo final de optimización de parámetros que cumplan con dos condiciones: i) mantener la integridad de VVD y ii) observar la reducción completa de la safranina T, para así poder identificar el punto medio de la transición de óxido-reducción de nuestra proteína de interés.

Referencias

1. Affum A. O. 2007. Determination of xanthine and uric acid in xanthinuric urine and extracellular fluid of porcine endothelial cells of the pulmonary artery by high performance liquid chromatography. A thesis presented to the graduate school of the university of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science.
2. Alexandre, M. T., J. C. Arents, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, J. T. Kennis. 2007. A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the *Avena sativa* phototropin-1 LOV2 domain. *Biochemistry* 46: 3129-3137.
3. Aravind, L., E.V. Koonin. 2000. The STAS domain — a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr. Biol.* 10: R53-R55.
4. Arents, J. C., M. A. Perez, J. Hendriks, y K. J. Hellingwerf. 2011. On the midpoint potential of the FAD chromophore in a BLUF-domain containing photoreceptor protein. *FEBS Letters* 585: 167-172.
5. Ayer, A., J. Sanwald, B. A. Pillay, A. J. Meyer, G. G. Perrone. I. W. Dawes. 2013. Distinct Redox Regulation in Sub-Cellular Compartments in Response to Various Stress Conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 8: e65240.
6. Bibikov, S. I., R. Byran, K. E. Rudd, y J. S. Parkinson. 1997. A Signal Transducer for Aerotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 179: 4075–4079.
7. Burhans, W. C., N. H. Heintz. 2009. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 1282–1293.
8. Chen, H. C., C. S. Ringelberg, R. H. Gross, J. C. Dunlap, J. J. Loros. 2009. Genome-wide analysis of inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.* 28: 1029–1042.
9. Christie, J. M., P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. Raibekas, E. Liscum, W. R. Briggs. 1998. Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282: 1698–1701.
10. Clugston, M,R. Flemming. *Advanced Chemistry*. 2000. Oxford University Press.

11. Crosson, S. y K. Moffat. 2001. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2995–3000.
12. Crosson, S., S. Rajagopal y K. Moffat. 2003. The LOV Domain Family: Photoresponsive Signaling Modules Coupled to Diverse Output Domains. *Biochemistry* 42: 2–9.
13. Degli, I. F., U. Pohl y V. E. A. Russo. 1983. Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light. *Photochem. Photobiol.* 37: 49-51.
14. Dorn M., M. Jurk, A. Wartenberg, A. Hahn, P. Schmieder. 2013. LOV Takes a Pick: Thermodynamic and Structural Aspects of the Flavin-LOV-Interaction of the Blue-Light Sensitive Photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*.
15. Dutton P. L. 1978. Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York. LIV:411-435.
16. Efimov, I., G. Parkin, E. S. Millett, J. Glenday, C. K. Chan, H. Weedon, H. Randhawa, J. Basran, E. L. Ravena. 2014. A simple method for the determination of reduction potentials in heme proteins. *FEBS Lett.* 588: 701–704.
17. Fraaije, M. W., R. H. H. van den Heuvel, W. J. H. van Berkel y A. Mattevi. 1999. Covalent Flavinylation Is Essential for Efficient Redox Catalysis in Vanillyl-alcohol Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 35514-35520.
18. Fradj, A.B., R. Lafi, S. B. Hamouda, L. Gzara, A. H. Hamzaoui, A. Hafiane. 2014. Investigation on the interaction of Safranin T with anionic polyelectrolytes by spectrophotometric method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 131: 169–176.
19. Froehlich, A. C., Y. Liu, J. J. Loros, y J. C. Dunlap. 2002. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297: 815–819.
20. Gessler, N. N., A. A. Aver'yanov, y T. A. Belozerskaya. 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry.* 72: 1091–1109.

21. Go Y.-M. y D P. Jones. 2008. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. 2008. *Biochim Biophys Acta*. 1780: 1273–1290.
22. Green, J., y M. S. Paget. 2004. Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 954-966.
23. Harding, R. W., y R. V. Turner. 1981. Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and White collar mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 68: 745–749.
24. Harding, R. W., y S. Melles. 1984. Genetic analysis of phototropism of *Neurospora crassa* perithecial beaks using white collar and albino mutants. *Plant Physiol. (Bethesda)* 72: 996-1000.
25. Harper, S. M., L. C. Neil, y K. H. Gardner. 2003. Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301: 1541–1544.
26. He, Q. Y., P. Cheng, Y. H. Yang, L. X. Wang, K. H. Gardner, Y. Liu. 2002. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light receptor. *Science* 297: 840-843.
27. He, Q. Y. y Y. Liu. 2005. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: From light induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev.* 19: 2888–2899.
28. Heintzen, C., J. J. Loros, y J. C. Dunlap. 2001. The PAS Protein VIVID Defines a Clock-Associated Feedback Loop that Represses Light Input, Modulates Gating, and Regulates Clock Resetting. *Cell*. 104: 453–464.
29. Hu, J., L. Dong, C. E. Outten. 2008. The redox environment in the mitochondrial intermembrane space is maintained separately from the cytosol and matrix. *J Biol Chem* 283: 29126–29134.
30. Huala, E., P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen, W. R. Briggs. 1997. *Arabidopsis* NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain. *Science* 278: 2120–2123.
31. Hwang, C., A. J. Sinskey, H. F. Lodish. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496–1502.
32. Karp, G. 2009. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. 6th edition. John Wiley and Sons.
33. Kasahara, M., Swartz T. E., Olney M. A., Onodera A., Mochizuki N., Fukuzawa H., Asamizu E., Tabata S., Kanegae H., Takano M., Christie J. M., Nagatani A., y R. B. Winslow. (2002). Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from

- Arabidopsis, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 129: 762-773.
34. Krauss U., Q. Minh, A. Losi, W. Gärtner, T. Eggert, A. von Haeseler, K. E. Jaeger. 2009. Distribution and Phylogeny of Light-Oxygen-Voltage-Blue-Light-Signaling Proteins in the Three Kingdoms of Life. *J Bacteriol.* 19: 7234–7242.
 35. Lepe-Zuniga, J. L., J. S. Zigler, I. Gery. 1987. Toxicity of light-exposed Hepes medi. *J. Immunol. Methods.* 103:145.
 36. Macheroux P., S. Hill, S. Austin, T. Eydmann, T. Jones, S.-O. Kim, R. Poole, R. Dixon. 1998. Electron donation to the flavoprotein NifL, a redox-sensing transcriptional regulator. *Biochem. J.* 332: 413–419.
 37. Mallikarjun V., D. J. Clarke y C. J. Campbell. 2012. Cellular redox potential and the biomolecular electrochemical series: A systems hypothesis. *Free Radical Biol. Med.* 53: 280–288.
 38. Malzahn, E., S. Ciprianidis, K. Ka'ldi, y T. Schafmeier, M. Brunner. 2010. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell* 142: 762–772.
 39. Martinovich, G. G., S. N. Cherenkevich, H. Sauer. 2005. Intracellular redox state: towards quantitative description. *Eur Biophys J* 34: 937–942.
 40. Massey V. 1991. A simple method for the determination of redox potentials in: *Flavins and Flavoproteins 1990* (Curti, B. R. S. y Zanetti G., Eds.). 59-66. Walter de Gruyter and Co, Berlin.
 41. Matthews, J. R., N. Wakasugi, J. L. Virelizier, J. Yodoi, R. T. Hay. 1992. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20: 3821–3830.
 42. Möglich, A., y K. Moffat. 2007. Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photoreceptor YtvA. *J. Mol. Biol.* 373: 112–126.
 43. Möglich, A., R. A. Ayers y K. Moffat. 2011. Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *J. Mol. Biol.* 7: 1282–1294.
 44. Nash, A. I., R. McNulty, M. E. Shillito, T. E. Swartz, R. A. Bogomolni, H. Luecker, K. H. Gardner. 2011. Structural basis of photosensitivity in a

- bacterial light-oxygen-voltage/helix-turn helix (LOV-HTH) DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 108: 9449–9454.
45. Nelson, D. C., J. Lasswell, L. E. Rogg, M. A. Cohen, B. Bartel. 2000. *FKF1*, a Clock-controlled Gene that Regulates the Transition to Flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101: 331-340.
 46. Nöll, G., G. Hauska, P. Hegemann, K. Lanzl, T. Nöll, M. Sanden-Flohe, B. Dick. 2007. Redox Properties of LOV Domains: Chemical versus Photochemical Reduction, and Influence on the Photocycle. *Chem Bio Chem* 8: 2256 – 2264.
 47. Oda, K. y, K. Hasunuma. 1997. Genetic analysis of signal transduction through light-induced protein phosphorylation in *Neurospora crassa* perithecia. *Mol. Gen. Genet.* 2: 593–601.
 48. Olmedo, M., C. Ruger-Herreros, E. M. Luque, L. M. Corrochano. 2013. Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology? *Fungal Biology Reviews* 27:10-18.
 49. Osiewacs, H. D. 2002. *Molecular Biology of fungal development*. Marcel Dekker: New York.
 50. Pei, J. M., y N. V. Grishin. 2001. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* 42: 210-216.
 51. Pellequer, J. L., K. A. Wager Smith, S. A. Kay, E. D. Getzoff. 1998. Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95: 5884–5890.
 52. Pudasaini A., K. K. El-Arab y B. Zoltowsky. 2015. LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling. *Front. Mol. Biosci.* 2:18.
 53. Purcell, E. B., C. A. McDonald, B. A. Palfey, S. Crosson. 2010. An Analysis of the Solution Structure and Signaling Mechanism of LovK, a Receptor Histidine Kinase Integrating Light and Redox Signals. *Biochemistry* 49: 6761–6770.
 54. Rebbapragada, A., M. S. Johnson, G. P. Harding, A. J. Zuccarelli, H. M. Fletcher, I. B. Zhulin, B. L. Taylor. 1997. The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *J. Biol. Chem.* 272: 10541–10546.

55. Salomon, M., J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, W. R. Briggs. 2000. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39: 9401–9410.
56. Sargent, M.L. y, Briggs W. R. 1967. The effects of blue light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora*. *Plant Physiol.* 42: 1504–1510.
57. Schwerdtfeger, C., y H. Linden. 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* 22: 4846–4855.
58. Seidel A., H. Parker, F. Turner, N. Dickerhof, I. S. Khalilova, S. M. Wilbanks, A. J. Kettle, y G. N. L. Jameson. 2014. Uric Acid and Thiocyanate as Competing Substrates of Lactoperoxidase. *The journal of Biological Chemistry.* 289: 21937–21949.
59. Sen, C. K., y L. Packer. 2002. *Methods in Enzymology. Redox Cell Biology and Genetics, Part B:* 353. Academic Press.
60. Söderbäck, E., F. Reyes-Ramírez, T. Eydmann, S. Austin, S. Hill, R. Dixon. 1998. The redox- and fixed nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from *Azotobacter vinelandii* comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. *Molecular Microbiology.* 28: 179–192. 2
61. Sokolovsky, V. Y., y T. A. Belozerskaya. 2000. Effect of stress factors on differential gene expression in the course of differentiation of *Neurospora crassa*. *Uspekhi biologicheskoi khimii (Ruso).* 40: 85–152.
62. Somers, D. E., T. F. Schultz, M. Milnamow y, S. A. Kay. 2000. *ZEITLUPE* Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101: 319-329. 1
63. Taylor, B. T. y I. B. Zhulin. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63:479–506.
64. Voet D. y J.G. Voet. 1995. *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons. Inc. New York.
65. Yoshida, Y., y K. Hasunuma. 2003. Reactive Oxygen Species Affect Photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 279: 6986-6993. 1
66. Zayner, J. P., y T. R. Sosnick. 2014. Factors That Control the Chemistry of the LOV Domain Photocycle. *PLoS ONE* 9: 1-9. 1

67. Zehavi-Willner, T. 1973. The possible role of glutathione in protein biosynthesis. *Isr J Med Sci* 9: 129–135.
68. Zehavi-Willner, T., E. M. Kosower, T. Hunt, N. S. Kosower. 1971. Glutathione. V. The effects of the thiol-oxidizing agent diamide on initiation and translation in rabbit reticulocytes. *Biochim Biophys Acta* 228: 245–251.
69. Zhulin, I. B., B. L. Taylor, y R. Dixon. 1997. PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and receptors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22: 331–333.
70. Zoltowski, B. D., y B. R. Crane. 2008. Light Activation of the LOV Protein Vivid Generates a Rapidly Exchanging Dimer. *Biochemistry* 47: 7012–7019.
71. Zoltowski, B. D., B. Vaccaro, y B. R. Crane. 2009. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nat. Chem. Biol.* 5: 827–834.
72. Zoltowski, B. D., C. Schwerdtfeger, J. Widom, J. J. Loros, A. M. Bilwes, J. C. Dunlap, B. R. Crane. 2007. Conformational Switching in the Fungal Light Receptor Vivid. *Science* 316: 1054 – 1057.

Anexos

5.1. Preparación de soluciones

5.1.1. Expresión y purificación de proteínas

Medio LB (1L)

Pesar los siguientes componentes:

Triptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada

Esterilizar en autoclave a 15 psi, de 121-124 °C por 15 minutos

Kanamicina (50 mg/ml)

- Pesar 0.5 gr de kanamicina
- En un tubo de 15 ml añadir la kanamicina y 10 ml de agua mili Q
- Mezclar bien y hacer alícuotas de 1 ml.
- Almacenar las alícuotas a -20 °C

Amortiguador de lisis (200 ml)

- Pesar los siguientes componentes:

300 mM de NaCl	3.5 g
50 mM de HEPES	2.4 g
10% de glicerol	20 ml

- Disolver en 180 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 M
- Aforar el volumen a 200 ml
- Filtrar y degasificar con una bomba de vacío

Amortiguador de lavado (50 ml)

a. Pesar los siguientes componentes:

300 mM de NaCl	0.88 g
50 mM de HEPES	0.60 g
10 mM de Imidazol	0.03 g
10% de glicerol	5 ml

- b. Disolver en 40 ml de agua destilada
- c. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 M
- d. Aforar el volumen a 50 ml
- e. Filtrar y degasificar con una bomba de vacío

Amortiguador de elución (20 ml)

a. Pesar los siguientes componentes:

300 mM de NaCl	0.35 g
50 mM de HEPES	0.24 g
200 mM de imidazol	0.27 g
10% de glicerol	2 ml

- b. Disolver en 15 ml de agua destilada
- c. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 M
- d. Aforar el volumen a 20 ml
- e. Filtrar y degasificar con una bomba de vacío

Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7.0 (500 ml)

a. Pesar los siguientes componentes:

30.1 mM de KH_2PO_4	3.4 g
19.9 mM de K_2HPO_4	1.35 g

- b. Disolver en 480 ml de agua destilada
- c. Ajustar el pH a 7.0 con KOH 5 M
- d. Aforar el volumen a 500 ml
- e. Filtrar y degasificar con una bomba de vacío

Nota. Para un amortiguador con 50% de glicerol, añadir 250 ml de glicerol

5.1.2. Ensayo de Bradford

Solución madre (300 ml)

Mezclar en un frasco ambar los siguientes reactivos:

Etanol al 95%	100 ml
Ácido fosfórico al 88%	200 ml
Serva Blue G	350 mg

Solución de trabajo (500 ml)

a. Mezclar en un frasco ambar los siguientes reactivos:

Etanol al 95%	15 ml
Ácido fosfórico al 88%	30 ml
Agua destilada	425 ml
Solución madre	15 ml

b. Filtrar con papel Whatmann

5.1.3. Estandarización del sistema de reducción xantina- xantina oxidasa

Xantina 20 mM (2 ml)

- En un microtubo de 2 ml pesar 6 mg de xantina
- Añadir 2 ml de de NaOH 25 mM
- Mezclar la solución en una placa de agitación durante 30 min

Xantina oxidasa de leche bovina 0.5 mg/ml (2 ml)

- En un microtubo de 2 ml pesar 1 mg de xantina oxidasa
- Añadir 2 ml de amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7.0 frío
- Mezclar bien y mantener en hielo

Nota. Preparar en el momento de usar

Safranina T 10 mM (1 ml)

- a. En un microtubo de 1.5 ml pesar 3.5 mg de safranina T
- b. Añadir 1 ml de amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7.0
- c. Mezclar bien

Benzil viológeno 1 mM (5 ml)

- a. En un vial de vidrio de 5 ml pesar 2 mg de benzil viológeno
- b. Añadir 5 ml de amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7.0 frío
- c. Mezclar bien

5.1.4. Sistema glucosa-GOx/catalasa

Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* tipo II, 50 mg/ml (2 ml)

- a. En un microtubo de 2 ml pesar 100 mg de glucosa oxidasa
- b. Añadir aproximadamente 2 ml de acetato de sodio 50 mM, pH 5.1
- c. Mezclar bien y hacer alícuotas de 25 μl . Almacenarlas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

β -D glucosa 2.6 M (1 ml)

- a. En un microtubo de 2 ml pesar 460 mg de β -D glucosa
- b. Añadir 690 μl de agua mili Q
- c. Mezclar bien y hacer alícuotas de 25 μl . Almacenarlas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Catalasa de *Aspergillus niger*, 47.3 U/ml (20 μl)

- a. En un microtubo de PCR mezclar 18.95 μl de amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, pH 7.0 frío y 1.05 μl de catalasa
- b. Mantener en frío

Nota. Preparar en el momento previo a utilizar

5.2. Reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa

La glucosa oxidasa es una enzima óxido-reductasa que cataliza la oxidación de β -D glucosa a D-Glucono-1,5-Lactona con la subsecuente reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno, como se muestra en la siguiente reacción química:



5.3. Reacción catalizada por la enzima catalasa

La catalasa es una enzima perteneciente a la categoría de las óxido-reductasas que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en O_2 y en agua, como se muestra en la siguiente reacción química:



5.4. La ecuación de Nernst en el sistema de reducción xantina-XO

El potencial redox se determina mediante la ecuación de Nernst:

$$E = E_m + \frac{59 \text{ mV}}{n} \log \frac{[a_{ox}]}{[a_{red}]}$$

En el sistema de reducción xantina-xantina oxidasa, la oxidación enzimática de la xantina permite reducir tanto un colorante, con un E_m conocido, como una proteína de interés en solución. Por lo tanto, cada componente tendrá su propia ecuación de Nernst:

$$E_{\text{proteína}} = E_{m_{\text{proteína}}} + \frac{59 \text{ mV}}{n_{\text{proteína}}} \log \frac{[\text{proteína}_{ox}]}{[\text{proteína}_{red}]}$$
$$E_{\text{colorante}} = E_{m_{\text{colorante}}} + \frac{59 \text{ mV}}{n_{\text{colorante}}} \log \frac{[\text{colorante}_{ox}]}{[\text{colorante}_{red}]}$$

Cuando ambos potenciales están en equilibrio, es decir $E_{proteína} = E_{colorante}$, es posible escribir la siguiente expresión:

$$E_{m_{proteína}} + \frac{59 \text{ mV}}{n_{proteína}} \log \frac{[proteína_{ox}]}{[proteína_{red}]} = E_{m_{colorante}} + \frac{59 \text{ mV}}{n_{colorante}} \log \frac{[colorante_{ox}]}{[colorante_{red}]}$$

Al despejar $E_{m_{proteína}}$, obtenemos:

$$E_{m_{proteína}} = E_{m_{colorante}} + \frac{59 \text{ mV}}{n_{colorante}} \log \frac{[colorante_{ox}]}{[colorante_{red}]} - \frac{59 \text{ mV}}{n_{proteína}} \log \frac{[proteína_{ox}]}{[proteína_{red}]}$$

Sí $[colorante_{ox}] = [colorante_{red}]$ entonces:

$$E_{m_{proteína}} = E_{m_{colorante}} - \frac{59 \text{ mV}}{n_{colorante}} \log \frac{[proteína_{ox}]}{[proteína_{red}]}$$

5.5. Espectro de fluorescencia de la proteína VVD-36

En estudios anteriores se ha observado que los dominios LOV muestran espectros característicos de fluorescencia debido a que tienen unido un cofactor, tal es el caso del dominio LOV2 de la phot1 de *Arabidopsis thaliana* (33). Sin embargo, no se ha obtenido el espectro de fluorescencia de la proteína VVD.

En el presente estudio, como parte de la caracterización de VVD, se obtuvieron los espectros de fluorescencia en el estado de luz y oscuridad de la proteína. Para ello se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia con los siguientes parámetros:

Barrido: 460 nm-650 nm
 Excitación: 450 nm
 Velocidad de scan (nm/min): 500
 Concentración de la muestra: ~1 mg/ml

Amortiguador: Amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM; pH 7.0

La proteína en su estado de oscuridad fue excitada a una longitud de onda de 450 nm mientras se mantenía en agitación y simultáneamente se midió su espectro de emisión. A continuación, la proteína fue irradiada con un led azul durante 15 min mientras se mantenía en agitación, una vez transcurrido el tiempo se midió su espectro de emisión.

En los espectros resultantes (**Fig. S1**) se puede observar que VVD en su estado de oscuridad presenta un pico máximo de fluorescencia alrededor de 500 nm, lo cual concuerda con datos ya reportados para el dominio LOV2 de la phot1 de *A. thaliana* [33]. Sin embargo, aunque si se vio disminuida la fluorescencia de VVD en su estado de luz, la fluorescencia no se perdió casi en su totalidad como se esperaba.

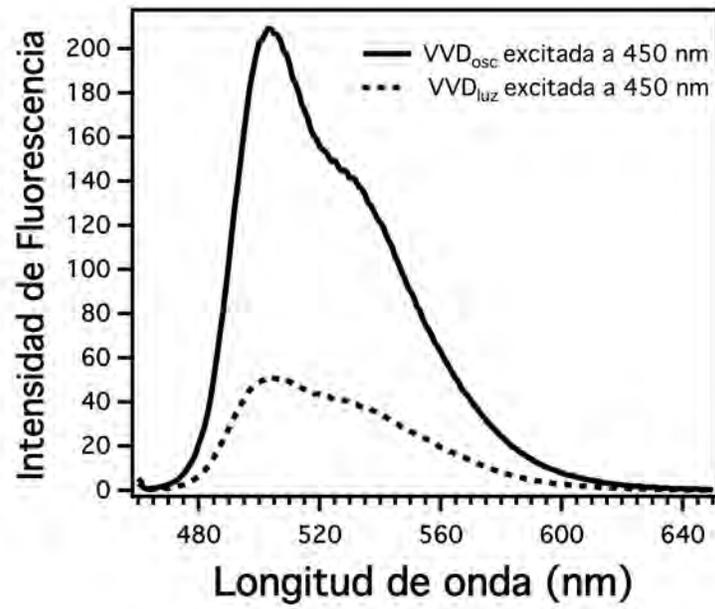


Figura S1. Espectro de fluorescencia de la proteína VVD-36

Espectro de emisión de la proteína VVD-36 antes (línea continua) y después (línea punteada) de ser irradiada con luz azul durante 15 minutos.