



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**La expresión de la forma monomérica de la “proteína de unión a odorantes” (OBP) de bovino confiere resistencia al estrés oxidativo ocasionado por agentes químicos en *Escherichia coli*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Alain Macedo Márquez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Diego González Halphen  
Instituto de Fisiología Celular UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Sobeida Sánchez Nieto      Facultad de Química UNAM

Dra. Xochitl Pérez Martínez      Instituto de Fisiología Celular UNAM

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**La expresión de la forma monomérica de la "proteína de unión a odorantes" (OBP) de bovino confiere resistencia al estrés oxidativo ocasionado por agentes químicos en *Escherichia coli*.**

**M. en C. Alain Macedo Márquez**

**Director de tesis Dr. Diego González Halphen**

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	8
ABSTRACT	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
ANEXO 1	54
ANEXO 2	71
ANEXO 3	87
ANEXO 4	93
REFERENCIAS	94

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Diego González Halphen, en el laboratorio 324 norte del departamento de Genética Molecular de la División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se agradece el apoyo técnico que proporcionó en la realización de este trabajo la Q.B.P. Miriam Vázquez Acevedo

El financiamiento para realizar este trabajo se obtuvo de los donativos del CONACyT con número 128110 y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) con número IN203311-3.

Durante mis estudios de Doctorado conté con el apoyo económico del CONACyT (número de becario 176940)

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un espacio en donde se puede pensar y expresar libremente, en especial al Instituto de Fisiología Celular y al posgrado en Ciencias Bioquímicas por brindarme los espacios necesarios para mi formación

A los miembros del honorable Jurado por la revisión del manuscrito y por sus valiosas sugerencias: Dra. Erika Patricia Rondón Huerta, Dr. Heliodoro Celis Sandoval, Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz, Dr. Dimitris Georgellis y Dr. Alejandro Sosa Peinado.

A los investigadores que formaron parte de mi comité tutor durante mis estudios de Doctorado: Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dra. Xochitl Pérez Martínez y Dr. Diego González Halphen, por todos los consejos y observaciones durante el desarrollo de este proyecto.

Quiero agradecer especialmente:

A mi madre la comunista Elsa Mirian Márquez Sarmiento por todo lo que hiciste, haces y harás por mi. Por darme la vida, por ser mamá y papá, por todo tú amor, dedicación, regaños, consentimiento, comprensión y consejos: Por ser un ejemplo de lucha y de admiración. Gracias por todo ¡TE QUIERO MUCHO!

Pinpilinpausa aunque te amo, estas bien loca!; y todo este tiempo ha sido una prueba para descubrirnos y desarrollarnos como personas y como pareja. No sueltes mi mano, caminemos mirando siempre de frente y sin miedo al futuro, porque juntos seguiremos construyendo esta relación: entre nosotros, por

nosotros y para nosotros; eres parte de mi mente y de mi corazón. Claudia, ¡TE AMO!

Al Dr. Diego González Halphen por abrirme las puertas del laboratorio, por todo lo que aprendí de él en todo este tiempo que convivimos. Por motivarme a enfrentar y resolver los problemas. Gracias, muchas gracias.

A Héctor Vicente Miranda Astudillo, colaborar contigo fue una experiencia que dio como fruto el artículo publicado en Free Radical Research, además de que hizo más estrecha y cordial nuestra amistad. Gracias amigo!

Al Sr. Alfredo Octaviano García por su apoyo y su disposición para ayudar en todo momento.

Al Dr. Héctor Malagón (IFC, UNAM), por la ayuda brindada en el manejo de los conejos para la obtención de anticuerpo anti-bOBP.

A mis compañeros del laboratorio y vecinos: Alexa, Alejandra, Claudia, Edgar, Héctor, Lilí, Lorenzo, Luís Pablo, Moni, Paola, por su amistad, sus consejos y apoyo, y por que cada día a su lado fue una experiencia placentera, gracias.

Al Dr. Sven Nellen Hummel, otra vez, gracias por devolverme la vida.

Al Dr. Noé Rogelio Méndez Martínez, por ser un gran amigo desde hace muchos años, pero sobre todo por resolver mi problema cuando nadie sabía que hacer; me devolviste la vida. Siempre estaré agradecido!

Ciudad Universitaria, México

Junio 2014

Alain Macedo Márquez

***Niemand ist mehr sklave, als der sich für frei hält, ohne es zu sein.***

**ABREVIATURAS**

BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
GCCbOBP	Proteína de unión a odorantes de bovino, con tres sustituciones a semejanza de porcino, los detalles se muestran en el texto.
6HGCCbOBP	Proteína de unión a odorantes de bovino, que presenta seis histidinas en el extremo amino terminal y tres sustituciones a semejanza de porcino, los detalles se muestran en el texto.
HNE	4-Hidroxi-2-Nonenal
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
NBT	Nitroazul de tetrazolio
OBP	Proteína de unión a odorantes (Odorant Binding Protein)
tBuOOH	<i>tert</i> -Butilhidroperóxido

## ABSTRACT

Mammalian Odorant binding proteins (OBP) are soluble lipocalins produced in the nasal mucosa and in other epithelial tissues of several animal species, where they are believed to serve as scavengers for small structurally unrelated hydrophobic molecules. These would include odorants and toxic aldehydes like 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), which are end products of lipid peroxidation; therefore OBP might physiologically contribute to preserve the integrity of epithelial tissues under oxidative stress conditions by removing toxic compounds from the environment and, eventually, driving them to the appropriate degradative pathways. With the aim of developing a biological model based on a living organism for the investigation of the antioxidant properties of OBP, we asked whether the overexpression of the protein could confer protection from chemical-induced oxidative stress in *Escherichia coli*. To this end, plasmids overexpressing either GCC-bOBP, a redesigned monomeric mutant of bovine OBP, or its amino-terminal 6-histidine-tagged version 6H-GCC-bOBP were constructed and transformed into *E. coli* BL21 DE3 cells. After inducing overexpression for four or six hours, bacterial cells were diluted in fresh culture media, and their growth curves were followed in the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH), two reactive oxygen species whose toxicity is mainly due to lipid peroxidation, and menadione, a redox-cycling drug producing the superoxide ion. GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were found to protect bacterial cells from the insulting agents  $H_2O_2$  and tBuOOH but not from menadione. The obtained data led us to hypothesize that the presence of overexpressed OBP may protect bacterial cells against oxidative stress, probably by sequestering locally produced during the first replication cycles, toxic compounds by lipid peroxidation, before bacteria activate their appropriate enzyme-based antioxidative mechanisms.

## RESUMEN

Las proteínas de unión a odorantes de mamíferos (OBP) son lipocalinas solubles producidas en la mucosa nasal, así como en otros tejidos epiteliales de varias especies animales, en los que se cree que pueden servir como captadores de pequeñas moléculas hidrofóbicas de estructuras diversas. Éstas incluyen odorantes y aldehídos tóxicos como el 4-hidroxy-2-nonenal (HNE), que es el producto final de la peroxidación de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la OBP podría contribuir fisiológicamente a preservar la integridad de los tejidos epiteliales en condiciones de estrés oxidativo mediante la eliminación de compuestos tóxicos del entorno, llevándolos hacia las rutas de degradación apropiadas. Con el objetivo de desarrollar un modelo biológico basado en un organismo vivo para la investigación de las propiedades antioxidantes de la OBP, aquí nos preguntamos si la sobre-expresión de la proteína podría conferir protección a *Escherichia coli* del estrés oxidativo inducido por productos químicos. Con este objetivo, las bacterias se emplearon para sobre-expresar la GCC-bOBP, una mutante monomérica rediseñada de la OBP de bovino, y su correspondiente versión con una etiqueta de 6 histidinas en el amino terminal denominada 6H-GCC-bOBP. Después de inducir la sobre-expresión durante cuatro o seis horas, las curvas de crecimiento bacteriano se siguieron en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y *tert*-butil hidroperóxido (t-BuOOH), dos especies reactivas de oxígeno cuya toxicidad principalmente se debe a la peroxidación de lípidos, y menadiona, un productor del ión superóxido. Se probaron estos agentes químicos como inductores de especies reactivas de oxígeno. GCC-bOBP y 6H-GCC-bOBP se expresaron *in vivo* y protegieron a las células bacterianas de los agentes estresantes como  $H_2O_2$  y t-BuOOH, pero no de la menadiona. Los datos obtenidos permiten hipotetizar que la presencia de OBP sobre-expresada puede contribuir a proteger a las células bacterianas del estrés oxidativo, posiblemente mediante el secuestro de compuestos tóxicos producidos localmente por la peroxidación de lípidos, durante los primeros ciclos de replicación de la bacteria,

antes de que se activen los mecanismos antioxidantes apropiados que son catalizados por enzimas.

## INTRODUCCIÓN

### Lipocalinas

Las lipocalinas son un grupo de proteínas heterogéneas que se expresan en una gran variedad de organismos, desde las bacterias hasta los mamíferos pasando por las plantas. Tienen diferentes masas moleculares de aproximadamente 18-20 kDa y se caracterizan por su propiedad de reconocer una variedad amplia de sustratos lipofílicos. Por lo tanto, muy apropiadamente, su nombre une las dos palabras griegas lipo (grasa) y kalyx (cáliz), haciendo referencia a su capacidad de unir pequeñas (150-300 Da) moléculas hidrofóbicas que no se solubilizan tan fácilmente en los ambientes acuosos de los fluidos biológicos. Las lipocalinas presentan poca conservación a nivel de estructura primaria (menos del 20% de similitud), pero una marcada similitud en su estructura secundaria y terciaria (Flower D. R. 1996) (Figura 1). Esta estructura conservada, que se denomina plegamiento tipo lipocalina (lipocalin folding), consta de la disposición estructural de dos dominios: un barril (kalyx) que está constituido por 8 láminas beta plegada antiparalelas formadas por el 70-80% del total de los residuos de aminoácidos a partir del extremo amino-terminal, y un extremo C-terminal que presenta una estructura de  $\alpha$ -hélice.

Los dos dominios están conectados por una secuencia de 5-6 residuos de secuencia de bisagra (hinge sequence), que tiene una glicina (G 121 en la OBP porcina) que permite el plegado de la  $\alpha$ -hélice C-terminal sobre la superficie exterior del barril. En el plegamiento tipo lipocalina, la posición recíproca de los dos dominios se estabiliza mediante un puente disulfuro formado entre dos residuos de cisteína (C 65 y 155 en la OBP porcina) muy conservados (Flower D. R. *et al.* 2000).



estar presentes en la mucosa nasal, donde unen moléculas volátiles (Pelosi P. 2001; Briand L. *et al.* 2002).

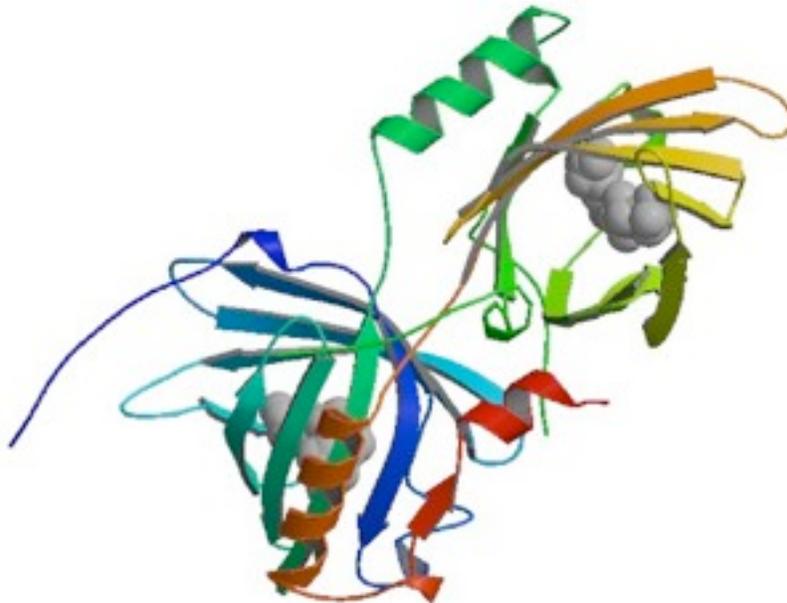


Figura 2. Estructura terciaria de la proteína bOBP obtenida por difracción de rayos X. La proteína forma dímeros a pH 7.0. La estructura fue obtenida a una resolución de 2 Å y su número de acceso en el Protein Data Bank (PDB) es **1OBP**.

La OBP de bovino (bOBP, bovine Odorant Binding Protein), que ha sido la primera proteína de esta clase caracterizada estructural y funcionalmente, se caracteriza por la ausencia de cisteínas y por lo mismo, del puente disulfuro entre los dos dominios que forman el plegado tipo lipocalina. También carece de un residuo de glicina (Tegoni M. *et al.* 2000). De hecho, entre las OBP, la forma bovina (bOBP) es atípica, ya que es un homodímero estabilizado por intercambio de dominios, donde cada una de las dos unidades del plegado tipo lipocalina que constituyen su estructura tridimensional, se forma por la  $\alpha$ -hélice de una subunidad y el barril- $\beta$  de la otra (Figura 2). Esta estructura, que se encuentra en varias proteínas oligoméricas, toma el nombre de intercambio de dominios (Domain swapping) (Bennett *et al.* 1995). El ligando natural de la OBP es el 1-octeno-3-ol; dicha molécula, que es sintetizada por la microflora del rumen, está presente en la fosa nasal de los bovinos, desde donde se transporta en el aire expirado y es un atrayente para muchas especies de insectos, incluyendo los vectores de numerosas parasitosis. Por este motivo se ha sugerido que la OBP, al

secuestrar estas moléculas, tiene un papel protector contra el parasitismo (Ramoni R. *et al.* 2001). También se ha observado que las OBP presentan una afinidad típica de las lipocalinas (en el rango  $\mu\text{M}$ ) por el 4-hidroxi-2-nonenal y por otros aldehídos reactivos que son el producto final de la peroxidación de lípidos insaturados bajo condiciones de estrés oxidativo (Grolli S. *et al.* 2006). Esta afinidad por el 4-hidroxi-2-nonenal sugiere que la OBP podría tener un papel protector del efecto dañino de los radicales libres. Otros estudios de mutagénesis sitio-específica se han enfocado en la estructura de la proteína, con el fin de obtener información sobre el camino evolutivo que, en el caso de OBP bovina, ha determinado la formación de un dímero que presenta 'Domain swapping'. Tal es el caso de la forma mutante denominada GCC-bOBP, la cual presenta mutaciones en tres residuos, (una inserción de una glicina en la posición 122, y dos reemplazos de aminoácidos en la posición 64 (W) y 155 (H), ambas por cisteínas (C) que en las lipocalinas monoméricas son responsables, respectivamente, de la formación (glicina en la secuencia bisagra) y estabilización (cisteínas que forman el puente disulfuro después del barril y la  $\alpha$ -hélice) del plegamiento tipo lipocalina. Estas mutaciones (una inserción de una glicina en la posición 122, y dos reemplazos de aminoácidos en la posición 64 (W) y 155 (H), ambas por cisteínas) se hicieron con base en un alineamiento de la proteína bovina con la secuencia de la OBP de porcino. Como resultado de este análisis se diseñó una nueva proteína monomérica de bovino capaz de unir olores y otros ligandos, como el producto final de la lipoperoxidación, el 4-hidroxi-2-nonenal, tal como lo hace la proteína dimerica en su forma nativa (Figura 3)(Ramoni R. *et al.* 2008 y Grolli *et al.* manuscrito en preparación).

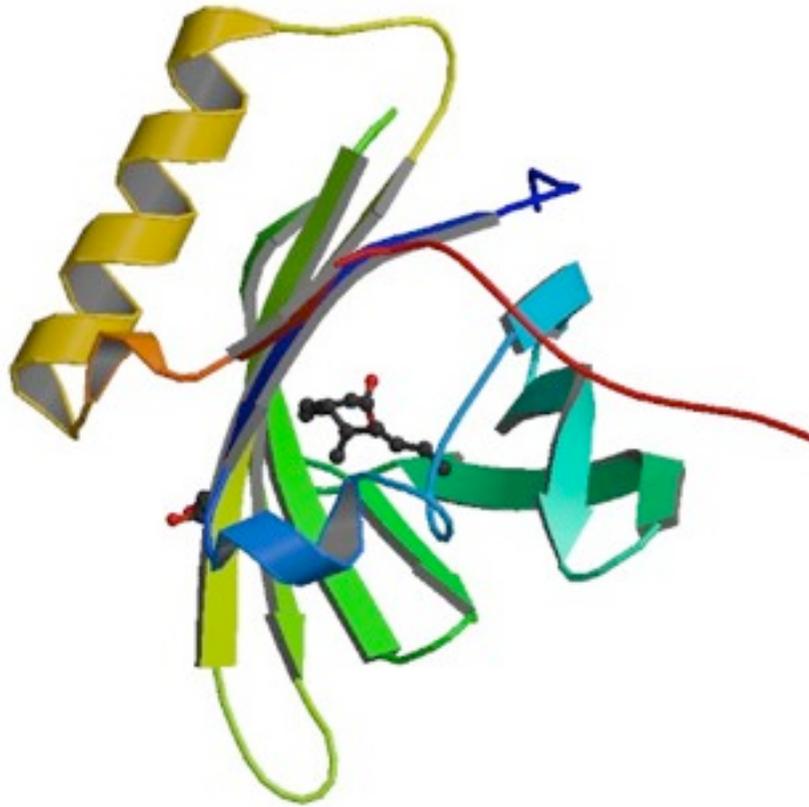


Figura 3. Estructura cristalográfica obtenida por difracción de rayos X de la proteína GCC-bOBP, que no forma dímeros. La estructura tiene una resolución de 1.65 Å y su número de acceso en el PDB es **2HLV**.

## **Estrés oxidativo**

El oxígeno es una molécula altamente reactiva y puede ser parcialmente reducida para formar agentes químicos reactivos. A éstos se les conoce como especies reactivas de oxígeno (EROs) y un ejemplo de ellos es el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Halliwell *et al.* 2006 y Miwa *et al.* 2008). Estas formas de oxígeno son altamente dañinas para los constituyentes celulares como el ADN, lípidos y proteínas. Además de estas moléculas altamente reactivas, el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) pueden promover la producción de más especies reactivas, en particular cuando hay presencia de iones metálicos, por lo que también se les considera EROs. Las EROs son generadas endógenamente en muchas células como consecuencia de los procesos metabólicos naturales (Jamieson D. J. 1998).

En el caso particular de las bacterias, el radical superóxido se produce cuando los cofactores flavina, como los encontrados en la NADH deshidrogenasa II ubicada en la cadena respiratoria, se auto oxida y reacciona con el O<sub>2</sub>. Por su parte el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), cuando reacciona con hierro en estado ferroso forma el grupo hidroxilo (HO•), que es altamente reactivo. El óxido nítrico, un compuesto intermediario en la desnitrificación, es otro ejemplo de una especie reactiva que es común en las bacterias (Chiang S. M. and Schellhorn E. H. 2012). El daño ocasionado a los lípidos se conoce como lipoperoxidación, es el proceso en el cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos (Imlay J. A. 2008). Este fenómeno se propaga con la adición y/o remoción de un grupo peroxil en las insaturaciones de los ácidos grasos, lo que sucede principalmente en los ácidos grasos poliinsaturados (Imlay J. A. 2013). Sin embargo, como ha sido recientemente descubierto en *Escherichia coli*, también puede ocurrir con los ácidos grasos monoinsaturados (Pradenas *et al.* 2013). Como producto final se produce mayoritariamente el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE o HNE), un hidroxi-alqueno extremadamente reactivo (Uchida K. 2003). Podemos concluir que todos los organismos con crecimiento aeróbico están continuamente expuestos a agentes oxidantes, y que el estrés oxidativo ocurre cuando la concentración de EROs rebasa los límites en los cuales los mecanismos protectores de las células pueden contender con ellos.

### **Mecanismos naturales de protección contra las EROs**

La bacteria *E. coli* contiene tres superóxido dismutasas, dos citosólicas, una de las cuales une como cofactor al hierro (Fe SOD) y otra que une manganeso (Mn SOD). La tercera se encuentra en el periplasma y su cofactor es de cobre-zinc (Cu-Zn SOD) (Imlay J. A. 2013). El anión superóxido no puede cruzar las membranas, y es por ello que debe de existir una enzima en cada compartimento. La enzima Cu-Zn SOD sólo se expresa cuando las bacterias se encuentran en la fase estacionaria (Korshunov S. & Imlay J. A. 2006.); esto no significa que no se produzca superóxido en la fase exponencial de crecimiento,

pero parece que las cantidades producidas no son suficientes como para afectar el crecimiento (Benov L. T. & Fridovich I. 1994). Las superóxido dismutasas del citosol son abundantes y capaces de mantener el estado estacionario del ión superóxido en concentraciones sub-nanomolares (Imlay J. A. & Fridovich I. 1991). Diversos estudios han demostrado que la actividad de superóxido dismutasa es necesaria para evitar el daño enzimático y asegurar un crecimiento vigoroso (Cort A. S. & Imlay I. 1998). Las dos enzimas están coordinadas y reguladas por los niveles de Fe disponible (Tardat B. & Touati D. 1991).

*E. coli* también expresa a tres enzimas bien estudiadas para degradar el  $H_2O_2$ , la alquil-hidroperóxido reductasa (Ahp), la catalasa G (KatG) y la catalasa E (KatE) (Saever L. C. & Imlay J. A. 2001). Ahp es un sistema de dos componentes (AhpC-AhpF) basado en un grupo tiol peroxidasa que transfiere electrones del NADH al  $H_2O_2$ , reduciéndolo a  $H_2O$ . KatG pertenece a la familia de las catalasas-peroxidasas y es débilmente expresada en células que se encuentran en crecimiento exponencial. KatE solamente se expresa fuertemente en células que se encuentran en fase estacionaria, y se induce por el sistema RpoS, un factor  $\sigma$  (sigma), que se expresa en muchas condiciones de estrés e inhibe el crecimiento de las bacterias (Schellhorn H. E. & Hassan H. M. 1988).

Para enfrentar los efectos del peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, la bacteria *E. coli* cuenta con dos regulones que controlan diferentes genes que combaten los posibles daños que ocasionan estas dos especies reactivas de oxígeno. El sistema OxyR, es un activador transcripcional que induce fuertemente tanto a AhpCF como a KatG cuando las células se ven agobiadas por el  $H_2O_2$  exógeno (Christman M. F. S. & Ames B. N. 1989); contiene un sitio activo de cisteínas, el cual reacciona rápidamente con el  $H_2O_2$ . OxyR esta normalmente inactivo, en una concentración  $\sim 50$  nM. Sin embargo, cuando aumenta a  $\sim 200$  nM es suficiente para adquirir una conformación estabilizada por un puente disulfuro, la cual promueve la activación de la transcripción de docenas de operones alrededor del cromosoma bacteriano (Aslund F. *et al.* 1999.; Chol H. *et al.* 2001.; Zheng M. *et al.* 2001.). El sistema SoxRS se encuentra inactivo en condiciones normales de crecimiento, y se activa fuertemente cuando las células

se exponen a una gran variedad de compuestos redox-cíclicos (Greeberg J. T. *et al.* 1990.; Tsaneva I. R. and Weiss B. 1990). SoxR es una proteína regulatoria homodimérica que contiene un centro fierro-azufre (2Fe-2S) por unidad. Durante la exposición a drogas redox, el centro se oxida. Cuando presenta un centro oxidado y uno reducido transcribe al gen *soxS*, pero solo la forma oxidada estimula la transcripción. La proteína SoxS actúa como un factor de transcripción secundario, acrecentando la expresión dispersa de muchos genes alrededor de cromosoma (Pomposiello P. J. *et al.* 2001.)

### **La bacteria *Escherichia coli***

Existen varias características que tienden a establecer a *E. coli* como un modelo para elucidar los efectos del estrés oxidativo. Entre otros, esta bacteria puede perder regulones sin perder su viabilidad, las condiciones de crecimiento puede ser manipulada por catabolitos y rutas biosintéticas, y la ausencia de organelos permite tomar muestras o calcular las concentraciones de los metabolitos y los oxidantes. También, permite evaluar las reacciones que se realizan *in vitro* y compararlas con lo que sucede *in vivo*. Asimismo, tiene la capacidad de crecer anaeróbicamente (Imlay J. A. 2008).

La composición de fosfolípidos de *E. coli* que se crece a una temperatura de 37 °C, es de fosfatidiletanolamida (79%), fosfatidilglicerol (17%) y difosfatidilglicerol (4%), y alrededor de cincuenta por ciento de ácidos grasos son saturados y cincuenta por ciento ácidos grasos monoinsaturados; del total de ácidos grasos insaturados se encuentran los siguientes: ácido palmitoleico (18:1c11)(32.4%), *cis*-vaccénico (16:1c9)(67%) y en menor proporción el ácido miristoleico (14:1c7)(0.6%) (Morein S. *et al.* 1996). Por todas estas propiedades, es posible tomar a esta bacteria como un modelo para explorar el efecto protector de la bOBP modificada sobre la lipoperoxidación.

## **HIPÓTESIS**

La bOBP modificada (GCC-bOBP) puede unir la molécula 4-hidroxi-2-nonenal y otros aldehídos reactivos como lo hace la OBP bovina nativa, por lo que su sobre-expresión en la bacteria *E. coli* puede conferir resistencia al estrés oxidativo en cultivos expuestos a agentes químicos que promueven la generación de radicales libres, secuestrando los productos originados por la peroxidación de los ácidos grasos insaturados. Este proyecto podría traer la primera evidencia experimental de que una proteína secuestradora (scavenger), que no tiene actividad enzimática, podría antagonizar algunos de los efectos del estrés oxidativo.

## **OBJETIVO**

Explorar en *E. coli* el papel de la proteína GCC-bOBP como un posible agente protector proteico no enzimático del estrés oxidativo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

a) Generar anticuerpos policlonales en conejo dirigidos contra la proteína recombinante GCC-bOBP para poder evidenciar su expresión heteróloga en *E. coli*.

b) Expresar la GCC-bOBP y la 6HGCC-bOBP en *E. coli* (BL21 DE3 Codon Plus), y medir la capacidad de crecimiento de las transformantes resultantes en medios de cultivo que presente agentes que promuevan estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, tertbutil-hidroperóxido y menadiona).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Expresión de la proteína bOBP mediante la inducción con IPTG

En colaboración con el Dr. Roberto Ramoni (Universidad de Parma, Italia) se nos proporcionó el plásmido pT7-7 y las construcciones que contienen los cDNAs de la GCC-bOBP y de la 6HGCC-bOBP. Esta última presenta una etiqueta de 6 histidinas en el amino terminal, lo cual facilita su purificación mediante columnas de afinidad con metales. Con dichas construcciones se transformaron las cepas de *E. coli*, BL21 (DE3) y BL21 CodonPlus (las cuales tiene en su genoma la RNA polimerasa del bacteriófago T7), por medio de choque térmico. La selección se hizo evaluando la resistencia de las transformantes a dos antibióticos (100 µg/ml de ampicilina y 170 µg/ml de cloranfenicol). El sistema de expresión de este vector se encuentra bajo el control del promotor T7, por lo que la expresión de la proteína se lleva a cabo de manera constitutiva. Por su parte, la sobre-expresión se llevó a cabo utilizando como inductor al IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido (Studier and Moffat. 1986).

A partir de una colonia seleccionada, se prepararon cultivos en tubos Falcon (50 ml) que contenían 3 ml de medio LB y se indujeron mediante la adición de IPTG a dos concentraciones diferentes (0.1 mM y 1 mM). Se ensayaron dos tiempos de inducción (3 y 6 horas) y se tomaron alícuotas de 200 µl de cultivo de las diferentes cepas. Las bacterias se recuperaron por centrifugación (a 18,440 xg por un minuto utilizando una microcentrífuga Eppendorf 5424), se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 µl de solución digestora. Las muestras se cargaron a geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

## **Geles desnaturalizantes de poliacrilamida y determinación de la concentración de proteína**

Para resolver las proteínas de un extracto total de bacterias se realizaron geles desnaturalizantes al 12.5 % de acrilamida de acuerdo al protocolo propuesto por Schägger *et al.* (1986), utilizando una cámara de electroforesis Mini-Protean (BIO-RAD). Los geles se corrieron a 100 V durante un lapso de tres horas y media. La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante la modificación del método de Lowry (Markwell M. A. *et al.* 1978).

## **Inmunorrélicas tipo Western**

Por medio del procedimiento descrito por Towbin *et al.* (1979), se transfirió el patrón polipeptídico del gel a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot (BIO-RAD) que mantenía las mismas dimensiones que el gel, mediante una cámara semi-seca de transferencia Hoefer TE 70 (Amersham Biosciences), por un lapso de dos horas. La corriente utilizada (en miliAmperes) se calculó multiplicando el largo por el ancho de la membrana (cm), de tal manera que se mantuviera una corriente de un miliAmper por centímetro cuadrado (mA/cm<sup>2</sup>). La membrana se bloqueó con 3 % de gelatina en TBS (20 mM Tris-HCl y 0.5 M NaCl. pH 7.5) toda la noche y al día siguiente se lavó dos veces con TBST (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl y 0.05% Tween 20. pH 7.5) por 5 minutos. Posteriormente se incubó (4 horas) con el anticuerpo primario generado en el laboratorio (anti-bOBP) a una dilución de 1:10,000 resuspendido en TBS con 1.0 % de gelatina. La membrana se lavó dos veces con TBST por 5 minutos y se incubó en presencia del anticuerpo secundario (anti IgG de conejo de Invitrogen durante dos horas) a una dilución de 1:3,000 en TBST con 1 % de gelatina. La membrana se lavó dos veces con TBST por 5 minutos. Finalmente, la réplica tipo Western se reveló según lo descrito por Hawkes *et al.* (1982), utilizando 20 ml de la solución reveladora con 200 µl de NBT (nitroazul de tetrazolio) y 200 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), como se describe en el apartado "soluciones para revelar y teñir la membrana de nitrocelulosa."

## Curvas de crecimiento

Las bacterias transformadas con el plásmido pT7-7 y las dos construcciones que permiten la expresión de la GCCbOBP y la 6HGCCbOBP se sembraron en cajas de Petri que contenían medio sólido de LB con ampicilina (100 µg/ml). Con una octava parte del asa de siembra, se inocularon tres matraces de 50 ml c/u que contenían 10 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) con cada una de las clonas y se dejaron crecer toda la noche (aproximadamente 14 horas a 37 °C y 250 rpm). A la mañana siguiente, se inocularon tres matraces de 50 ml con 300 µl del pre cultivo que contenían 10 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y 0.1 mM de IPTG. Dos horas después, se inocularon con 700 µl del pre cultivo otros tres matraces que contenían ampicilina (100 µg/ml) y 0.1 mM de IPTG. Los seis matraces crecieron a 37 °C con una agitación de 250 rpm, de tal manera que todos cumplieron al unísono el tiempo de pre-inducción. Se prepararon siete tubos Falcon de 15 ml que contenían 9.2 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml). Cada tubo se etiquetó con el nombre de la clona y el tiempo de pre-inducción y se aforó con 0.8 ml del cultivo de bacterias que habían sido inducidas por 4 ó 6 horas. Las bacterias control (solo en medio con ampicilina) se tomaron directamente del tubo Falcon. Posteriormente, se etiquetaron ocho tubos Eppendorf con las diferentes concentraciones de los diferentes agentes estresantes de la siguiente manera: primero se colocaron las mezclas de LB que contenía las bacterias más ampicilina y se aforaron a 1 ml con los diferentes volúmenes de la solución madre de los agentes para llegar a las concentraciones deseadas. La placa para medir el crecimiento en el aparato Bioscreen C, denominada "honeycomb", contiene cien pozos y en cada pozo se cargaron 300 µl de muestra. Así, el mililitro preparado con anterioridad se repartió en tres pozos para poder obtener un triplicado de cada muestra. Las condiciones utilizadas en el aparato fueron las siguientes: la temperatura fue de 37 °C, agitación media y la toma de la lectura de la densidad óptica de las muestras se realizó a 600 nm cada 40 minutos, por un lapso de tiempo de alrededor de 20 horas. Los datos

obtenidos se graficaron en una computadora en una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Office 2004).

### **Análisis de las fracciones**

Después de sobre-expresar la clona BL21 CodonPlus que contiene el plásmido pT7-7 con 6HGCC-bOBP, a la concentración de IPTG (0.1 mM) y a la temperatura (37 °C) óptima (Figura 5), se procedió a detectar la acumulación de la proteína recombinante en los extractos bacterianos. Con este fin, se inoculó un volumen de 20 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml), se crecieron las bacterias, se recuperaron, se rompieron las células a 4 °C con un sonicador marca Branson-450 (con las siguientes condiciones: 5 watts y 50 % de potencia y 6 pulsos de un minuto seguido de un minuto de descanso entre cada pulso) y se realizó el análisis de las fracciones obtenidas. De las células rotas se tomaron 200 µl y se centrifugaron a 9,408 xg (Eppendorf 5424) durante diez minutos para separar el botón de la fracción soluble, en esta última fracción se precipitaron las proteínas presentes mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Se agregaron 400 µl de MeOH y se agitó en vórtex
- 2) Se agregaron 100 µl de CHCl<sub>3</sub> y se agitó en vórtex
- 3) Se agregaron 300 µl de H<sub>2</sub>O y se agito en vórtex
- 4) Se centrifugó a 18,440 xg (Eppendorf 5424) durante 5 min
- 5) Se retiró la fase acuosa y orgánica con mucho cuidado (las proteínas precipitadas se encontraron en la interfase)
- 6) Se agregaron 300 µl MeOH y se agitó en vórtex
- 7) Se centrifugó a 18,440 xg (Eppendorf 5424) durante 5 min
- 8) Se retiró el MeOH
- 9) Se dejó secar al aire

A cada una de las fracciones (botón y soluble) de la muestra se le agregaron 20 µl de solución digestora y se resolvió en un gel desnaturalizante al 12.5 % de acrilamida.

## **Purificación de la proteína recombinante**

La mitad de la proteína recombinante se acumuló en la fracción soluble, por lo que se decidió trabajar con dicha fracción. Se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml que contenía 20 ml de medio LB con ampicilina (100µg/ml) con aproximadamente 10 µl del glicerol de las bacterias (BL21 CodonPlus) transformadas con la construcción 6HGCC-bOBP. El cultivo se incubó a 37 °C a 250 rpm, por un lapso de 14 horas. Después de este tiempo, se utilizó todo el volumen para inocular 4 matraces de 2 lt, cada uno contenía 500 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) e IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Estos nuevos cultivos se incubaron en las condiciones mencionadas anteriormente durante 6 horas, para después realizar el siguiente procedimiento:

- 1) Se centrifugó el cultivo a 6371 xg (rotor Beckman JA 10) durante 10 minutos.
- 2) El botón se resuspendió en 15 ml de PBS.
- 3) Las células se rompieron por sonicación mediante el procedimiento previamente descrito.
- 4) Se centrifugó a 12,096 xg (rotor Beckman JA 25.50) durante diez minutos
- 5) Se recolectó la fracción soluble de la muestra.
- 6) Se adicionó imidazol a una concentración final de 10 mM.
- 7) La muestra se cargó en una columna Histrap FF (VC = 15 ml).
- 8) Se lavó con PBS con una concentración de 30 mM de imidazol (2VC).
- 9) Se eluyó la columna con un gradiente lineal de 0 a 500 mM de imidazol (20VC).
- 10) Las fracciones enriquecidas con la proteína se mezclaron y se dializaron contra 2L de solución 50 mM de Tris en agitación toda la noche a 4 °C.
- 11) La muestra dializada se cargó a una columna de intercambio aniónico Source 15Q 10/100 GL (VC = 8 ml).
- 12) Se aplicó a la columna un gradiente lineal 0 a 500 mM de NaCl (20VC).

13) La proteína 6H-GCCbOBP se eluyó aproximadamente a una concentración de 250 mM de NaCl.

14) Las fracciones con la proteína purificada se mezclaron, se alicuotaron y almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **Producción de anticuerpos policlonales en conejo**

Las bandas presentes en el gel con azul (SERVA blue G), se cortaron y con ayuda de un mortero se molieron en 4 ml de TBS. Se prepararon alícuotas de 500 µl y se guardaron a -20 °C hasta su uso. Se inmunizaron intramuscularmente dos conejos hembras de 1.5 Kg de peso, con una mezcla del gel/proteína con adyuvante completo de Freund (1:1), seguida de tres refuerzos de la mezcla del gel/proteína con 800 µl de adyuvante incompleto de Freund, esperando intervalos de tres semanas entre cada una de las aplicaciones.

Se tomó una muestra de sangre en la doceava semana por punción en la oreja del conejo. Se permitió que se formara el coágulo a 4 °C y posteriormente se centrifugó a 18,440 xg (Eppendorf 5424) durante 30 min. La presencia del anticuerpo contra la proteína recombinante en el suero fue corroborada mediante inmunorrélicas tipo western. Con este fin, se utilizó proteína purificada mediante columnas de afinidad y se incubó con el anti-suero a distintas diluciones (1:200, 1:500, 1:1000 y 1:5000). Una vez corroborada la presencia de anticuerpos en el suero, se obtuvo la sangre por punción cardiaca de ambos conejos, se separó el suero como se describió anteriormente y el sobrenadante se precipitó en presencia de 40% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  con el fin de obtener la fracción de IgG. Se tituló el anticuerpo en inmunorrélicas tipo western a diluciones más altas (1:10,000, 1:20,000, 1:50,000, 1:100,000, 1:200.000, 1:500,000 y 1:1x10<sup>6</sup>). Finalmente, se prepararon alícuotas del anticuerpo de 200 µl y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

## **Amortiguadores, soluciones y medio de cultivo**

\* NOTA: Todas las soluciones porcentuales corresponden a una relación peso/volumen, excepto si se trata de un líquido, el cual sería volumen/volumen.

-Medio Luria-Bertani (LB) líquido

1% Triptona

1% NaCl

0.5% Extracto de levadura

-Medio Luria-Bertani (LB) sólido

1% Triptona

1% NaCl

0.5% Extracto de levadura

2% Agar

-Ampicilina (100 µg/µl)

Solución madre 100 mg/ml de agua estéril.

-IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido)

Solución madre 1 M (0.238 g/ml)

-Solución madre de menadiona 100 mM, disolver 0.0172 g en 1 ml de etanol al 100 %

-Solución madre de tBuOOH 1 M, 200 µl de tBuOOH (5 M) y aforar a 1 ml con 800 µl de H<sub>2</sub>O

-Solución madre de peróxido de hidrógeno 100 mM, en 9.8 ml de H<sub>2</sub>O aforar a 10 ml con 200 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## **Geles de poliacrilamida**

-Solución digestora

10% SDS (dodecilsulfato sódico)

30% glicerol

100 mM Tris-HCl

0.3% azul de bromofenol

4% 2-mercaptoetanol

pH 6.8

-Solución madre de acrilamida

30% Acrilamida

0.98% Bis-acrilamida

-Amortiguador electroforético

3 M Tris

1 N HCl

0.3% SDS

-Amortiguador cátodo

0.1 M Tris

0.1 M Tricina

0.1% SDS

-Amortiguador cátodo con azul de Coomassie SERVA

0.1 M Tris

0.1 M Tricina

0.05% SDS

0.025% Azul de Coomassie (SERVA Blue G)

-Amortiguador ánodo

0.2 M Tris-HCl

pH 8.9

-Solución teñidora

50% EtOH

10% Ácido acético

0.1% Azul de Coomassie G

-Solución desteñidora

10% de ácido acético en agua destilada

-Solución teñidora de rojo de Ponceau (para membranas de nitrocelulosa)

0.1% de rojo de Ponceau en 5 % de ácido acético.

### **Purificación de la proteína recombinante**

-Amortiguador de fosfatos pH 7.8 (PBS)

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300 mM NaCl

pH 7.8

-Imidazol 1 M

6.8 gr/100ml de agua destilada

-Resina utilizada para la purificación por cromatografía de afinidad

HisTrap FF crude 5 ml (General Electric)

Intercambio aniónico

Source 15Q 10/100 GL (VC = 8mL).

### **Inmunorrélicas tipo western (Western Blot)**

-Amortiguador (-) de transferencia para cámara semi-seca

300 mM de ácido ε-amino-n-caproico

-Amortiguador (+) de transferencia para cámara semi-seca

150 mM Tris

50 mM Tricina

20% Metanol

- Amortiguador TBS

20 mM Tris-HCl

0.5 M NaCl

pH 7.5

- Amortiguador TBST

20 mM Tris-HCl

0.5 M NaCl

0.05% Tween 20

pH 7.5

-Soluciones para revelar y teñir la membrana de nitrocelulosa

Para revelar:

0.1 mM NaHCO<sub>3</sub>

1 mM MgCl<sub>2</sub>

pH 9.8

Se utilizan 20 ml para revelar

Para teñir:

NBT (nitroazul de tetrazolio) 60 mg en 2.8 ml de DMF (dimetilformamida) y 1.2 ml de H<sub>2</sub>O

BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) 30 mg en 4 ml DMF

Sólo se utilizan 200 µl de cada uno (NBT y BCIP) para teñir

## RESULTADOS

### Inducción, purificación y análisis de la 6HGCCbOBP

Inicialmente se probaron las condiciones de sobre-expresión de la construcción pT7-7-6HGCCbOBP en dos cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y BL21 CodonPlus. Por medio de la inducción con IPTG se logró la sobre-expresión de la proteína de interés, después de probar dos concentraciones de la molécula inductora (0.1 y 1 mM) y dos tiempos de inducción (3 y 6 h). En ambas cepas se llevó a cabo la sobre-expresión a la misma temperatura (37 °C), y con una agitación de 250 rpm. Las Figuras 4 y 5 muestran geles desnaturalizantes de extractos totales de los cultivos bacterianos en distintas condiciones.

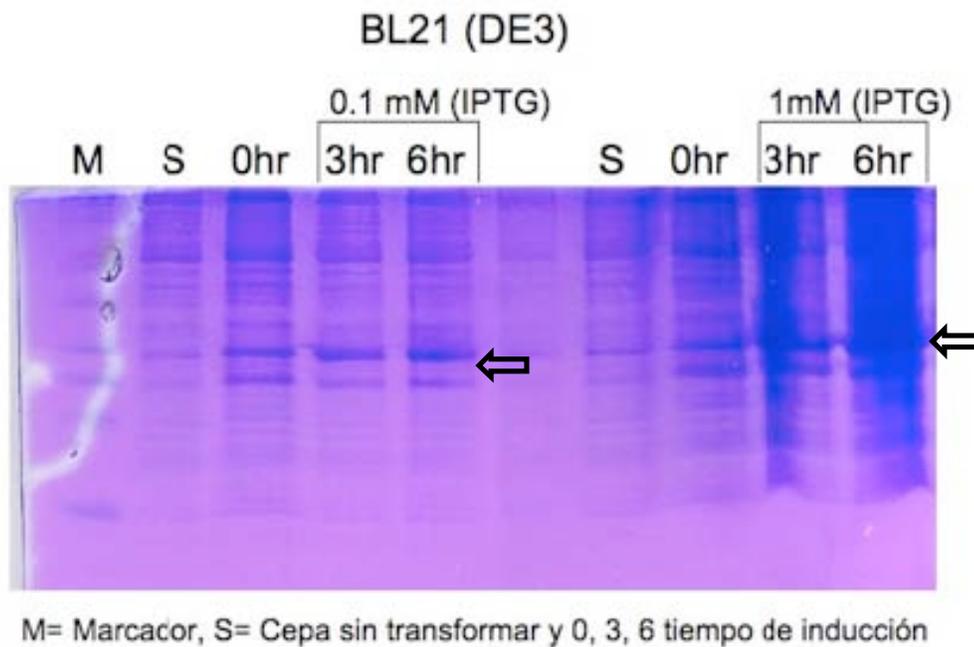


Figura 4. Inducción de la sobre expresión en la cepa BL21 (DE3), en cada carril se resolvieron 75  $\mu$ g de proteína del extracto bacteriano. Se probaron diferentes concentraciones (mM) de IPTG y diferentes tiempos de inducción (3 y 6 Hrs), y al mismo tiempo se comparó con las proteínas de la bacteria sin transformar (S).

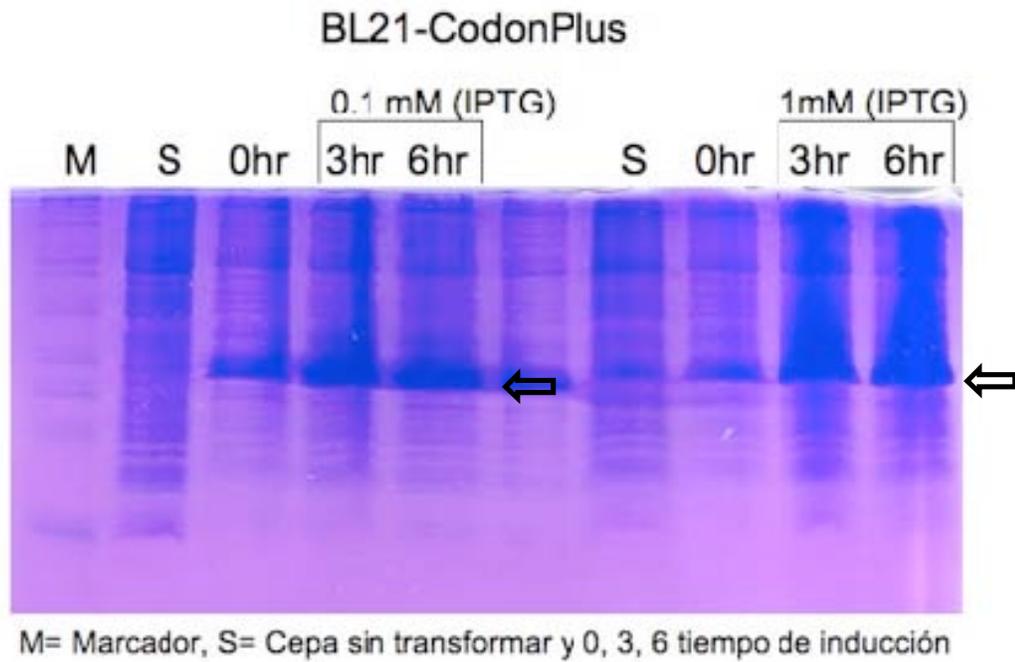


Figura 5. Inducción de la sobre expresión en la cepa BL21 CodonPlus, en cada carril se resolvieron 75 µg de proteína. Se probaron diferentes concentraciones (mM) de IPTG y diferentes tiempos de inducción (3 y 6 Hrs), y al mismo tiempo se comparó con la bacteria sin transformar (S). De esta figura se partió para sobre expresar la proteína y generar el anticuerpo, ver el texto.

En los geles mostrados se cargaron los extractos celulares con solución digestora. Como se puede observar en la figura 5, la cepa de *E. coli* BL21 CodonPlus fue la que presentó la mayor sobre-expresión de la 6HGCCbOBP. El tiempo óptimo de sobre-expresión fue de 6 horas y la concentración óptima de inductor fue 0.1 mM de IPTG.

Después de conocer las condiciones para obtener la proteína recombinante, fue necesario saber si la proteína se encontraba en la fracción soluble o precipitada en cuerpos de inclusión. Para esto se preparó un cultivo que se detalla en la parte "Análisis de fracciones" de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se pueden observar en la figura 6.

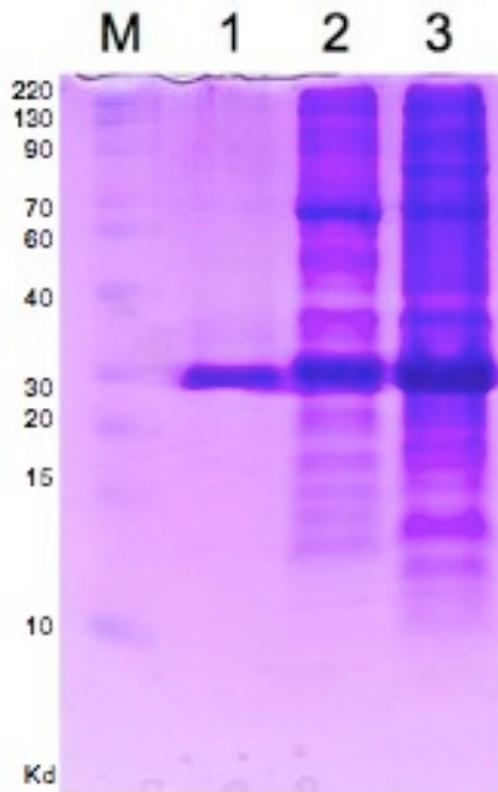


Figura 6. Gel desnaturalizante al 12.5 % de acrilamida. M) Marcador de peso molecular (Kd), 1) 6HbOBP recombinante purificada mediante una columna de afinidad de Ni, a partir de fracción soluble, 2) fracción soluble y 3) fracción del botón

Una vez conociendo en que fracción se encontraba enriquecida la bOBP con seis histidinas, se aumentó el volumen del cultivo para obtener rendimientos a mayor escala. Los detalles se encuentran en el apartado "Purificación de la proteína recombinante".

Se llevó a cabo una electroforesis con azul de Coomassie (Serva blue) en el amortiguador del cátodo, de tal manera que todo el gel se tiñó de azul. Esto permitió distinguir la banda de la proteína sobre-expresada sin necesidad de fijar y teñir el gel, ya que retenía más azul que otras bandas y presentaba una masa molecular alrededor de 20 kDa.

La banda señalada en la figura 7 se cortó del gel y fue utilizada para inocular conejos y generar anticuerpos policlonales.

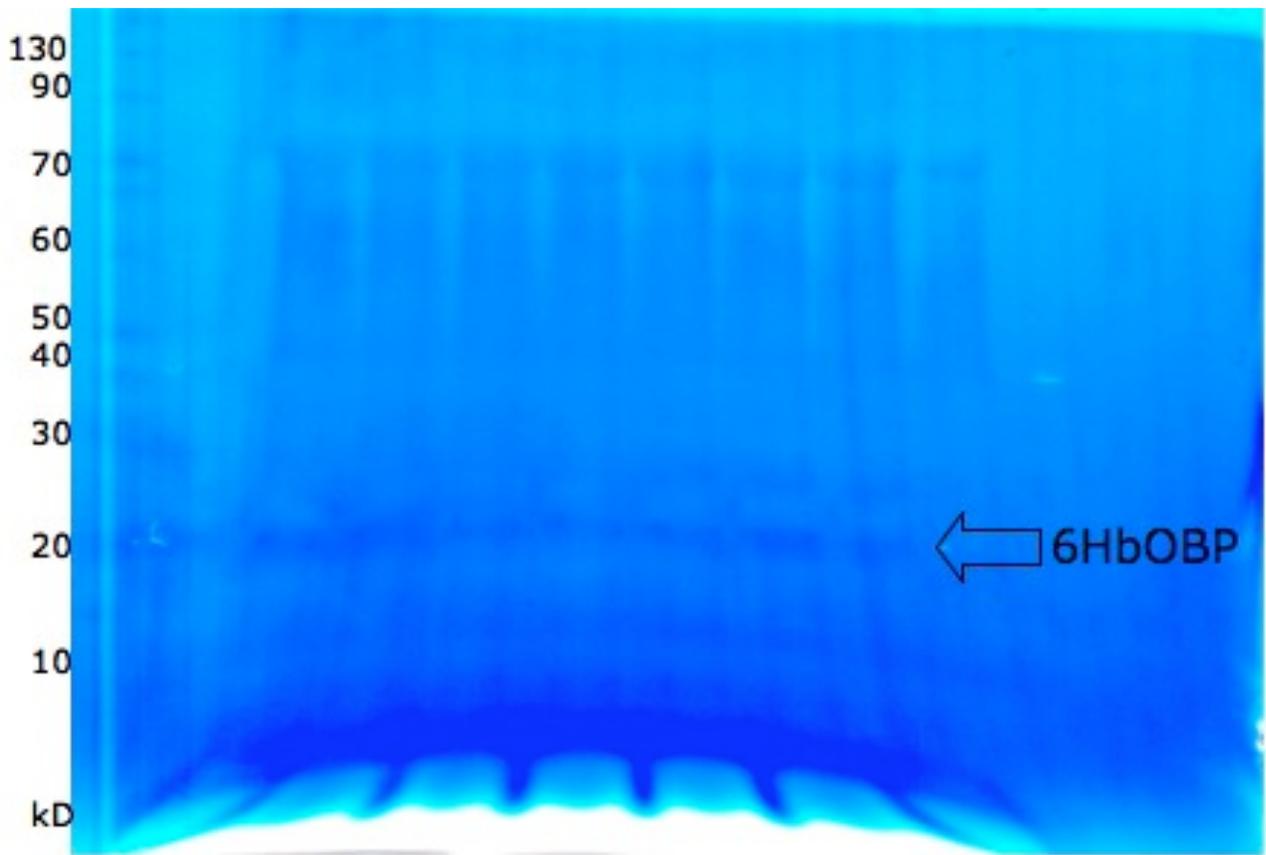


Figura 7. Gel de acrilamida teñido con azul de Serva en el amortiguador del cátodo. El gel no fue fijado ni teñido posteriormente.

### **Generación del anticuerpo $\alpha$ -OBP**

Se logró obtener anticuerpos en conejo dirigidos contra la proteína 6HGCCbOBP. Con el fin de conocer las diluciones ideales de anticuerpo para identificar a la proteína bOBP, se tituló tanto el suero de conejo como la fracción de IgG. Como se puede observar en la figura 8, la primera titulación se llevó a cabo con suero obtenido después de recolectar sangre por punción en la oreja del conejo, para confirmar si el suero era capaz de reconocer a la proteína recombinante (diluciones 1:200, 1:500, 1:100 y 1:5000). Para obtener los anticuerpos se continuó con el procedimiento que se detalla en el apartado "Producción de anticuerpos policlonales en conejo". Con la fracción de IgG a una dilución de uno en un millón fue posible aún detectar la proteína recombinante.



Figura 8. Titulación del  $\alpha$ -bOBP generado a partir la proteína recombinante, se realizó una inmuno-réplica tipo Western, en cada carril se cargaron aproximadamente 5  $\mu$ g de la proteína 6HGCC-bOBP, y las diluciones del anticuerpo  $\alpha$ -bOBP, se indican en la porción inferior de la figura.

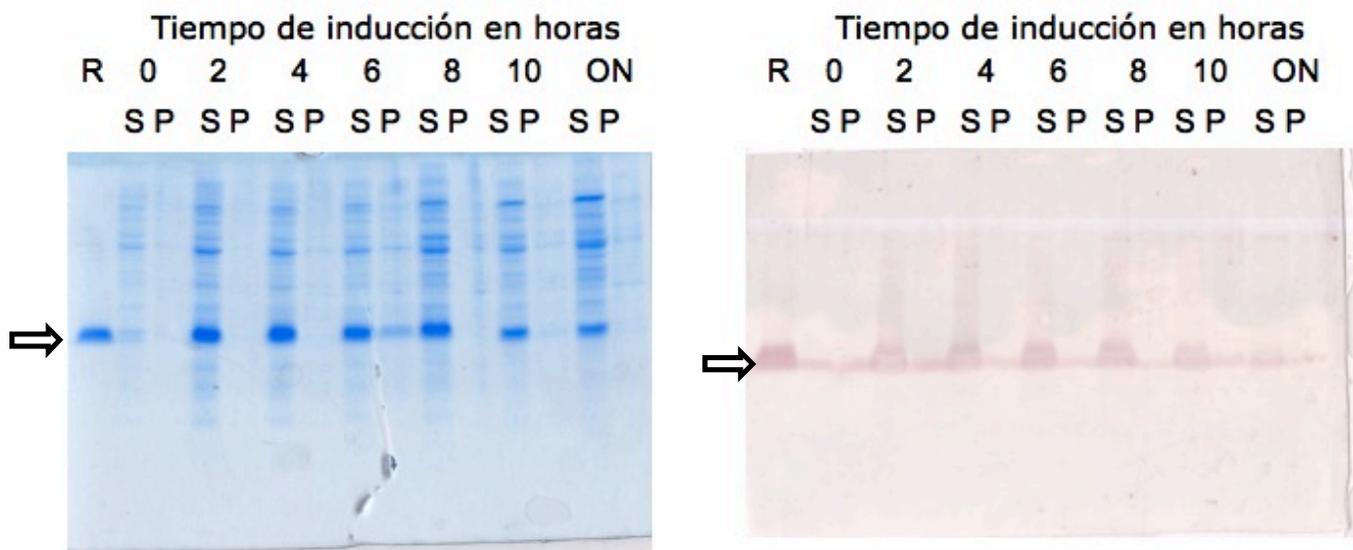
### Expresión y localización de las proteínas recombinantes

Nos preguntamos si con tanto tiempo de inducción con IPTG, la proteína GCCbOBP estaría disponible para secuestrar los productos de la lipoperoxidación o se estarían agregando en cuerpos de inclusión, ya que el gen que codifica a la proteína no está en el cromosoma bacteriano y por lo tanto no está sometido a los mismos elementos de regulación y control de otros genes, como los mencionados en el apartado "Mecanismos naturales de protección contra los EROs".

En las figuras 9 y 10 se muestran geles de poliacrilamida y sus respectivos duplicados transferidos a membranas de nitrocelulosa para realizar una inmunorréplica tipo western. Se partió de un cultivo de 10 ml con una concentración de 0.1 mg/ml de ampicilina y 0.1 mM de IPTG de los cuales se tomó cada dos horas una muestra de 1 ml y se sonicó para obtener una fracción soluble y una pastilla. Esta última contiene entre otras cosas, a los cuerpos de inclusión. En cada pozo se cargaron 25  $\mu$ l, de los cuales 20  $\mu$ l son de muestra y 5  $\mu$ l de solución digestora. Conforme aumentó el tiempo de inducción, se pudo observar que la acumulación de la proteína GCCbOBP (ya sea con o sin histidinas) aumentó en la fracción soluble. Sin embargo, también mucha proteína se va

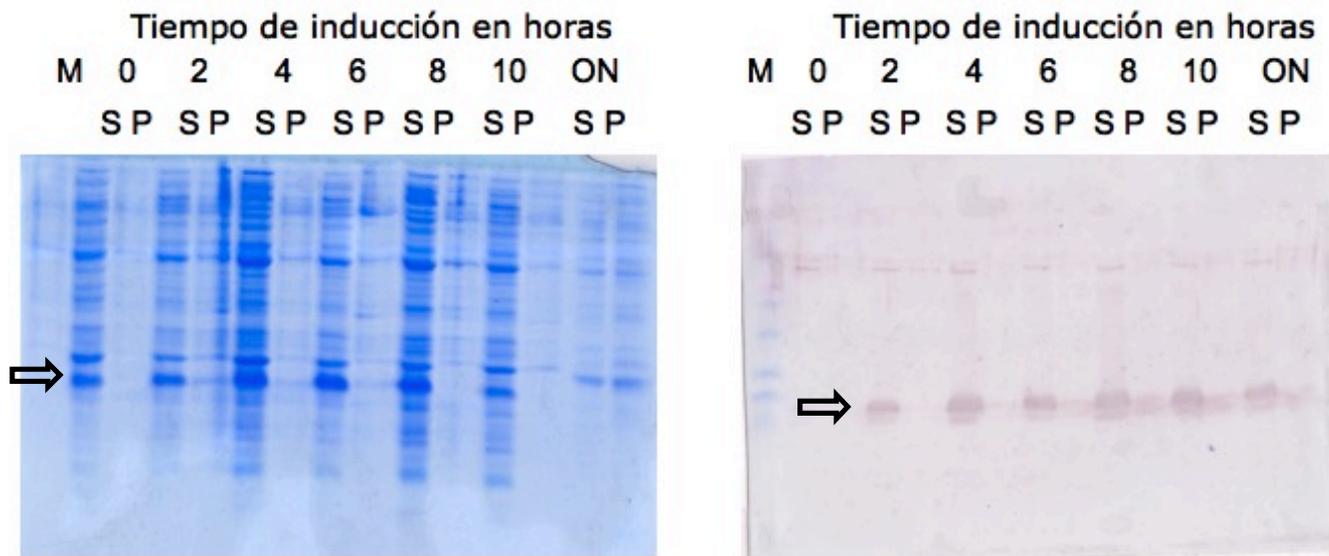
acumulando en los cuerpos de inclusión. Los tiempos de inducción seleccionados, que aparentaban acumular mayoritariamente a la proteína de interés en la fracción soluble, fueron 4 y 6 horas en presencia de IPTG.

Después, se procedió a hacer cultivos de las cepas GCC-bOBP y 6HGCC-bOBP, con diferentes tiempos de inducción (4 y 6 horas con 0.1 mM de IPTG) y separar los extractos celulares totales en fracción soluble y en botones, como se describe en la sección "Análisis de fracciones". Las fracciones se analizaron en geles desnaturizantes por duplicado, uno de ellos se tiñó y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar una inmunorréplica tipo western (Figuras 13 y 14).



R= GCC-bOBP recombinante  
 S= Sobrenadante  
 P= Pastilla  
 ON=Toda la noche (~14Hrs)

Figura 9. Acumulación de la proteína GCC-bOBP, en la cepa BL21 CodonPlus transformada con la construcción pT7-7\_GCC-bOBP, e inducida con 0.1 mM de IPTG en los tiempos indicados (S: fracción soluble; P: fracción de la pastilla), ON es el pre-cultivo sin la inducción con IPTG.



M= Marcador de peso molecular  
 S= Sobrenadante  
 P= Pastilla  
 ON=Toda la noche (~14Hrs)

Figura 10. Acumulación de la proteína 6HGCC-bOBP, en la cepa BL21 CodonPlus transformada con la construcción pT7-7\_6H-GCC-bOBP, e inducida con 0.1 mM de IPTG en los tiempos indicados. ON es pre-cultivo sin la inducción con IPTG.

Con los resultados obtenidos en la figuras 9 y 10 en donde se aprecia un aumento de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión al aumentar el tiempo de inducción mediante 0.1 mM de IPTG, se decidió trabajar con los tiempos de inducción de 4 y 6 horas. Se hicieron dos geles de poliacrilamida, uno fue teñido con azul de Coomassie (Fig. 11) y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa par realizar una inmunorréplica de tipo western blot (Fig. 12).

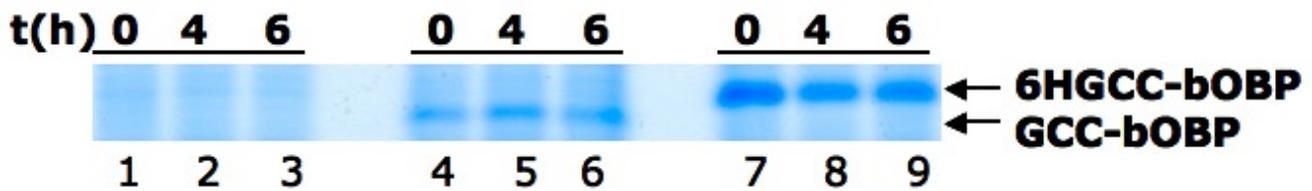


Figura 11. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12.5 % teñido con Coomassie, separando el contenido proteico de los extractos totales de las diferentes cepas. En la parte de superior se indica el tiempo de inducción (horas) con 0.1 mM de IPTG, la numeración en la parte inferior divide las diferentes construcciones, del carril 1 al 3 se trata del vector vacío, del 4 al 6 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_GCC-bOBP, del 7 al 9 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_6HGCC-bOBP, en la parte derecha se indica la posición de cada proteína recombinante.

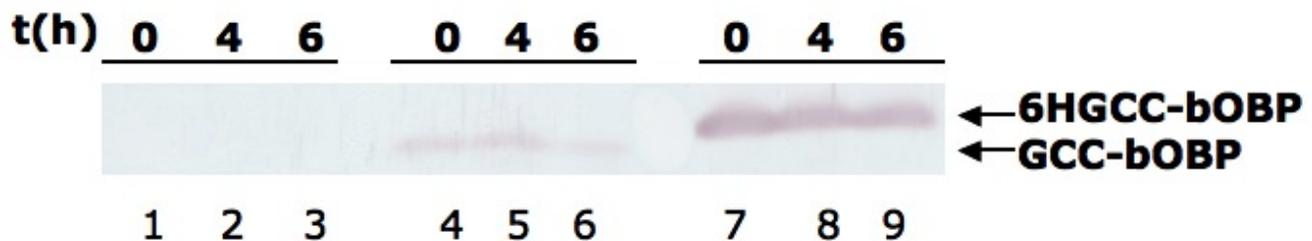


Figura 12. Inmunorréplica de tipo Western blot, en la cual se muestra la detección y la posición de las proteínas recombinantes. En la parte de arriba se muestra el tiempo de inducción con IPTG, del carril 1 al 3 se trata del vector vacío, del 4 al 6 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_GCC-bOBP, del 7 al 9 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_6HGCC-bOBP, en la parte derecha se indica la posición de cada proteína recombinante.

Se confirmó una fuerte expresión de las proteínas GCC-bOBP y 6hGCC-bOBP, sobre todo de la proteína que presente la etiqueta de histidinas, por lo que se decidió conocer en que fracción, soluble o pastilla, se tenía la mayor proporción de la proteína recombinante. Para ello se realizó lo descrito en el apartado "Análisis de fracciones". Como se muestra en la figura 13, la mayoría de las proteínas recombinantes se obtuvieron en la fracción soluble.

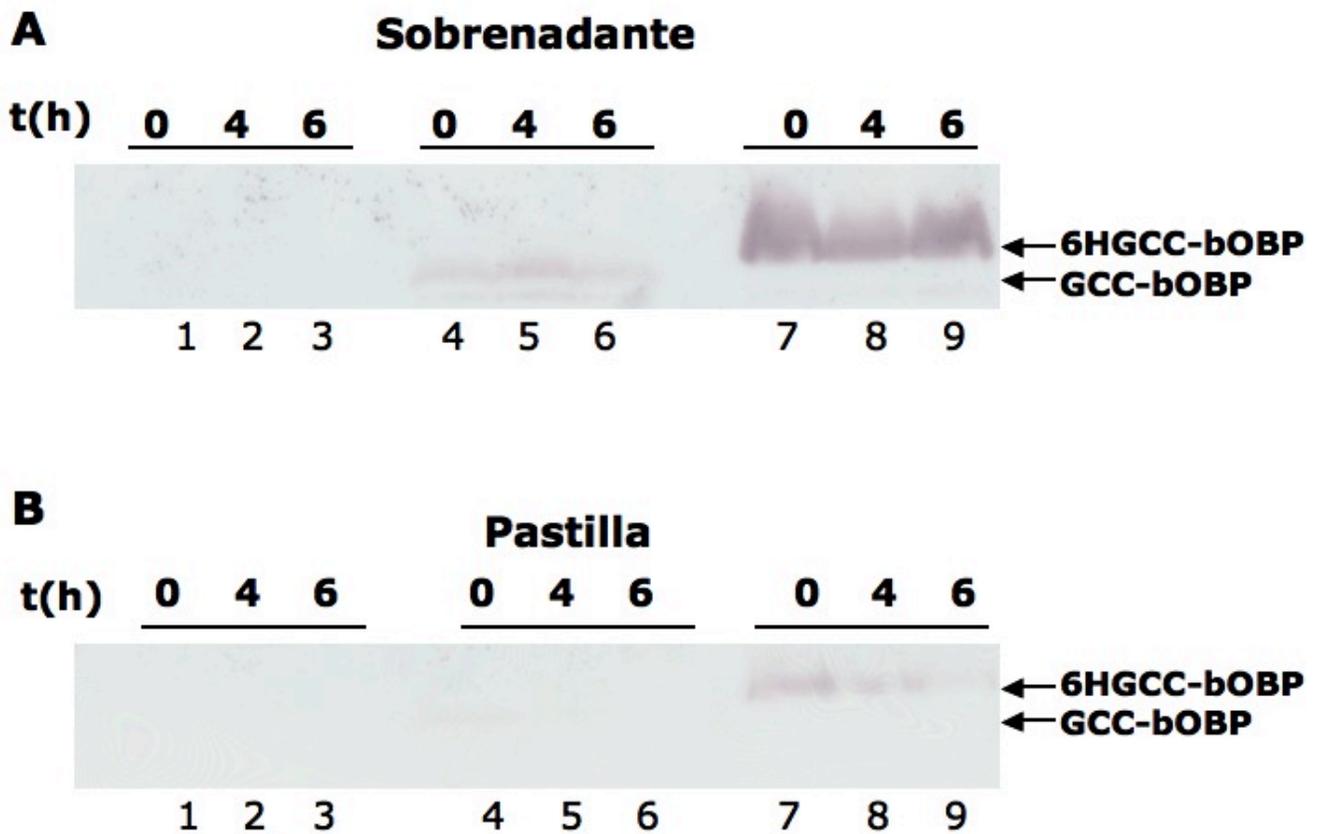


Figura 13. Inmunorréplica de tipo Western para detectar la presencia de las proteínas recombinantes. Las células se sometieron a diferentes tiempos de inducción con IPTG, se rompieron y se centrifugaron. En el panel **A** se muestra la inmunorréplica tipo western de las pastillas, en el panel **B** se muestra la inmunorréplica de las fracciones solubles, del carril 1 al 3 se trata del vector vacío, del 4 al 6 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_GCC-bOBP, del 7 al 9 se trata de extractos totales de las bacteria transformadas con la construcción pT7-7\_6HGCC-bOBP, en la parte derecha se indica la posición de cada proteína recombinante.

### Curvas de crecimiento

Los resultados obtenidos de las inmunorrélicas mostraron que las proteínas GCC-bOBP y 6HGCC-bOBP se acumulan mayoritariamente en la fracción soluble. Se decidió trabajar con las dos cepas, la que expresa la proteína con la etiqueta de seis histidinas en el amino terminal y la que carece de ella, utilizando los tiempos de inducción de 4 (Anexo 1) y 6 (Anexo 2) horas. De esta manera, consideramos que las células tendrían a la proteína bOBP en el citosol y se podría seguir el efecto protector de la proteína en respuesta al estrés oxidativo inducido

con los diferentes agentes químicos. A continuación se muestran las curvas de crecimiento obtenidas con bacterias que fueron inducidas previamente con IPTG durante 4 horas y que se estresaron con menadiona, tBuOOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siguiendo la metodología descrita en el apartado "curvas de crecimiento" en la sección de materiales y métodos. El vehículo utilizado para menadiona fue etanol (100 %) y las concentraciones (µM) que se probaron fueron las siguientes: 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 y 275 (con 4 horas de pre-inducción se muestran en el Anexo 1.1 y para 6 horas se muestran en el Anexo 2.1). De estas concentraciones, solo se muestran en el texto las gráficas de curvas de crecimiento el intervalo que va desde 125 a 225 (µM), ya que es en este rango de concentraciones donde se observó el efecto protector que confiere la GCC-bOBP ante la menadiona (Figura 14), en comparación con las otras dos construcciones, con colas de histidinas 6HGCC-bOBP (Figura 15) y pT7-7 (plásmido vacío) (Figura 16).

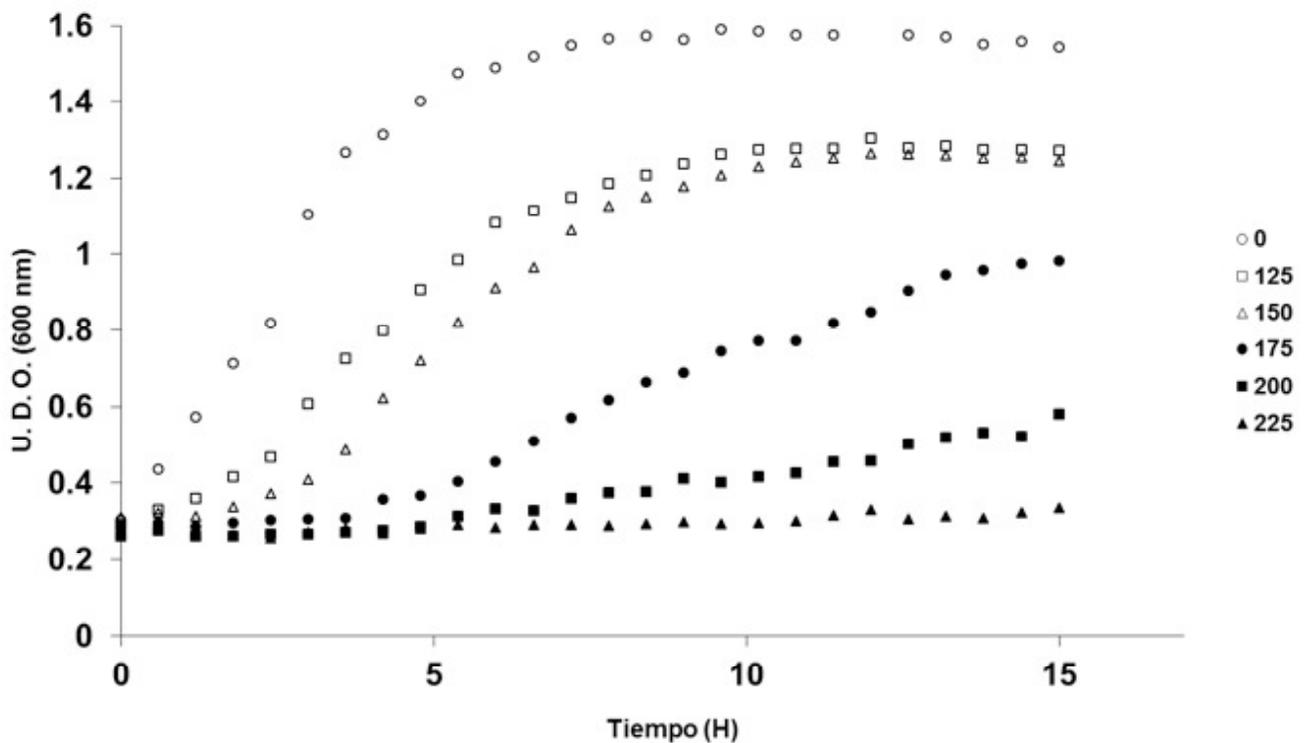


Figura 14. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_GCC-bOBP expuesta a diferentes concentraciones µM de menadiona después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

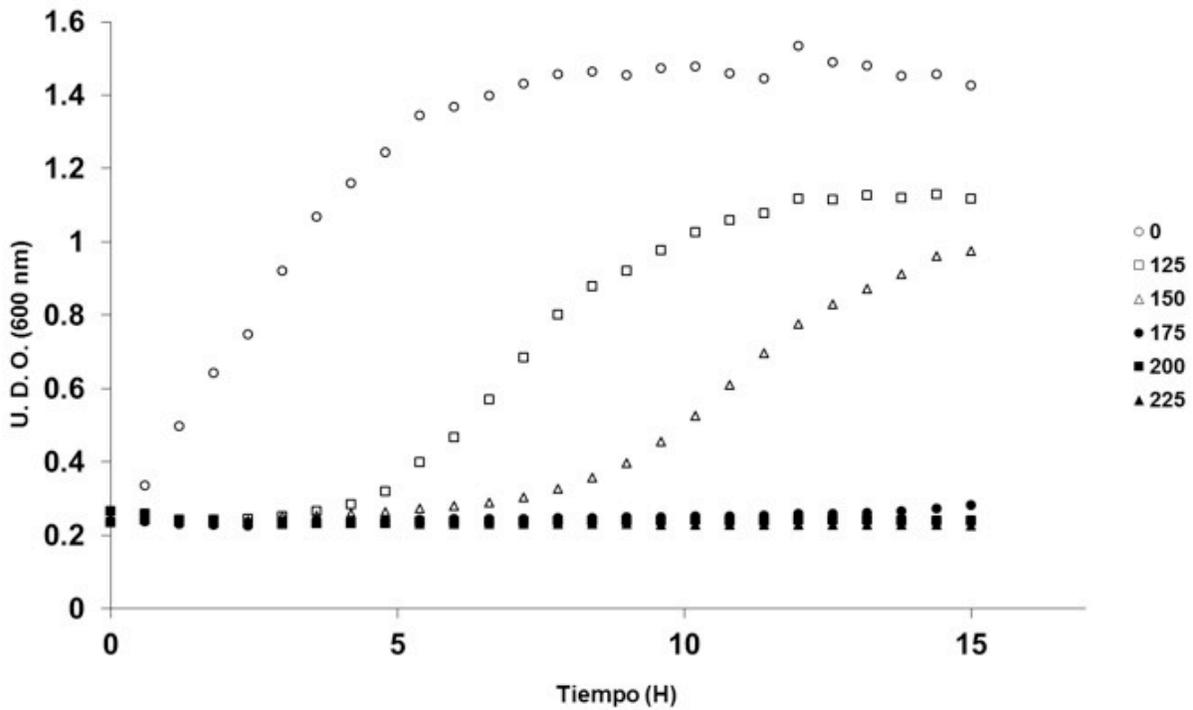


Figura 15. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_6HGCC-bOBP con diferentes concentraciones  $\mu$ M de menadiona después de la pre-inducción de 4 Hrs con 0.1 mM de IPTG.

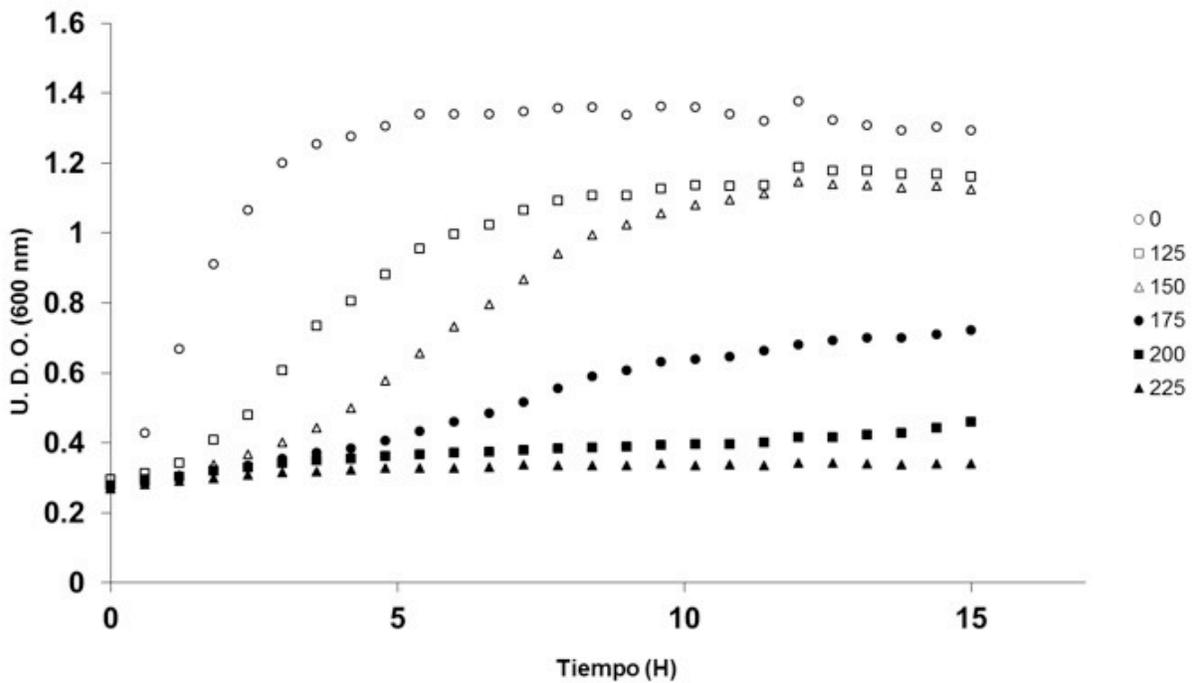


Figura 16. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7 en diferentes concentraciones  $\mu$ M de menadiona después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

Con la exposición de las diferentes transformantes a la menadiona, no se observó una resistencia clara de alguna de las transformantes a el estrés oxidativo provocado por dicho agente. Tanto la clona que presenta la OBP (Fig. 14) como la clona que contenía el plásmido vacío (Fig. 16), presentan un crecimiento muy similar. Por su parte, la clona que contiene la etiqueta de 6 histidinas en el amino terminal fue la que presentó un menor crecimiento, dejando de crecer a concentraciones superiores a 150  $\mu\text{M}$  de menadiona (Fig. 15).

Se realizaron curvas de crecimiento en presencia de *tert*-butil-hidroperóxido (tBuOOH), otro agente que promueve el estrés oxidativo. Las concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) que se utilizaron fueron las siguientes: 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 y 275 (4 horas de pre-inducción en Anexo 1.2 y 6 horas en Anexo 2.2). De las concentraciones mencionadas, fue en el intervalo de 175 a 275  $\mu\text{M}$  en donde se pudo observar que la proteína recombinante confería cierta resistencia al tBuOOH, en las bacterias transformadas con la GCC-bOBP (Figura 17). Este efecto no se observó en la cepa que expresa a la proteína con colas de histidinas (Figura 18) ni en la cepa que contiene sólo al vector vacío (Figura 19).

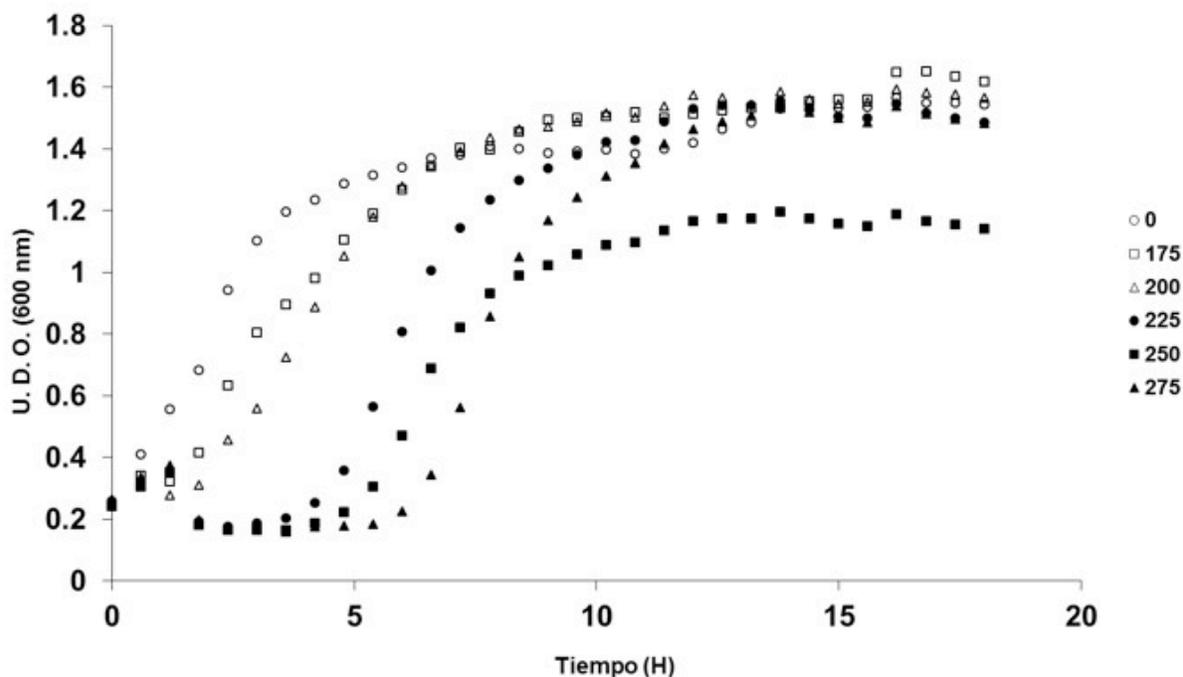


Figura 17. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_GCC-bOBP expuesta a diferentes concentraciones  $\mu$ M de tBuOOH después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

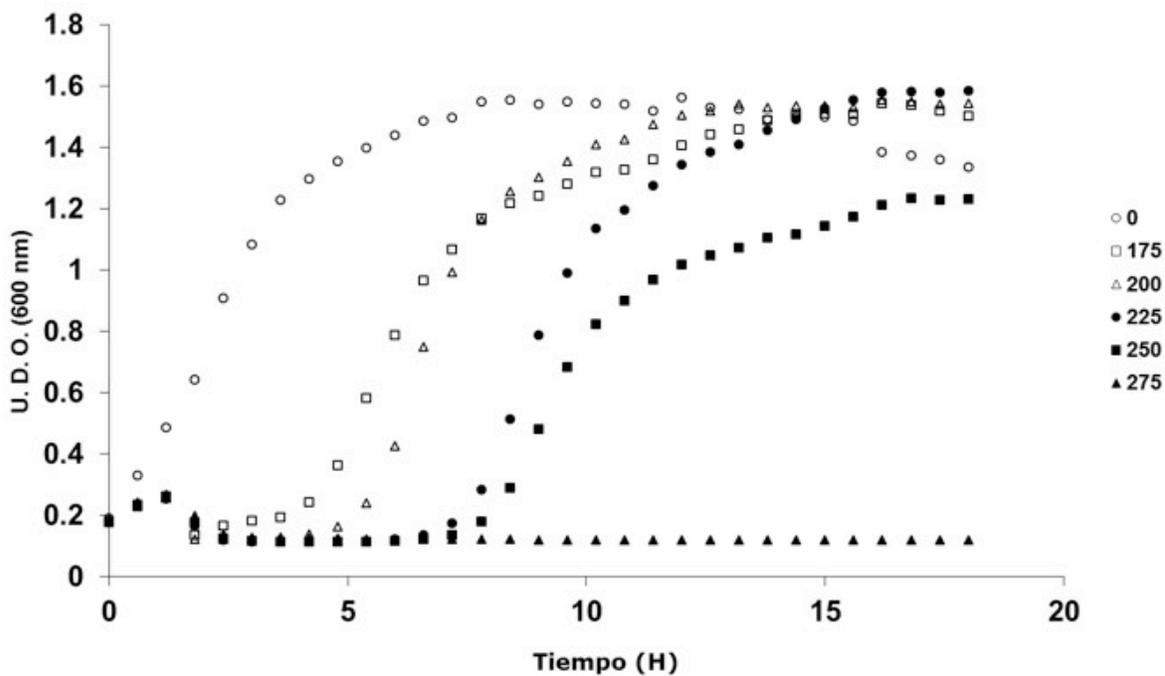


Figura 18. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_6HGCC-bOBP en diferentes concentraciones  $\mu$ M de tBuOOH después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

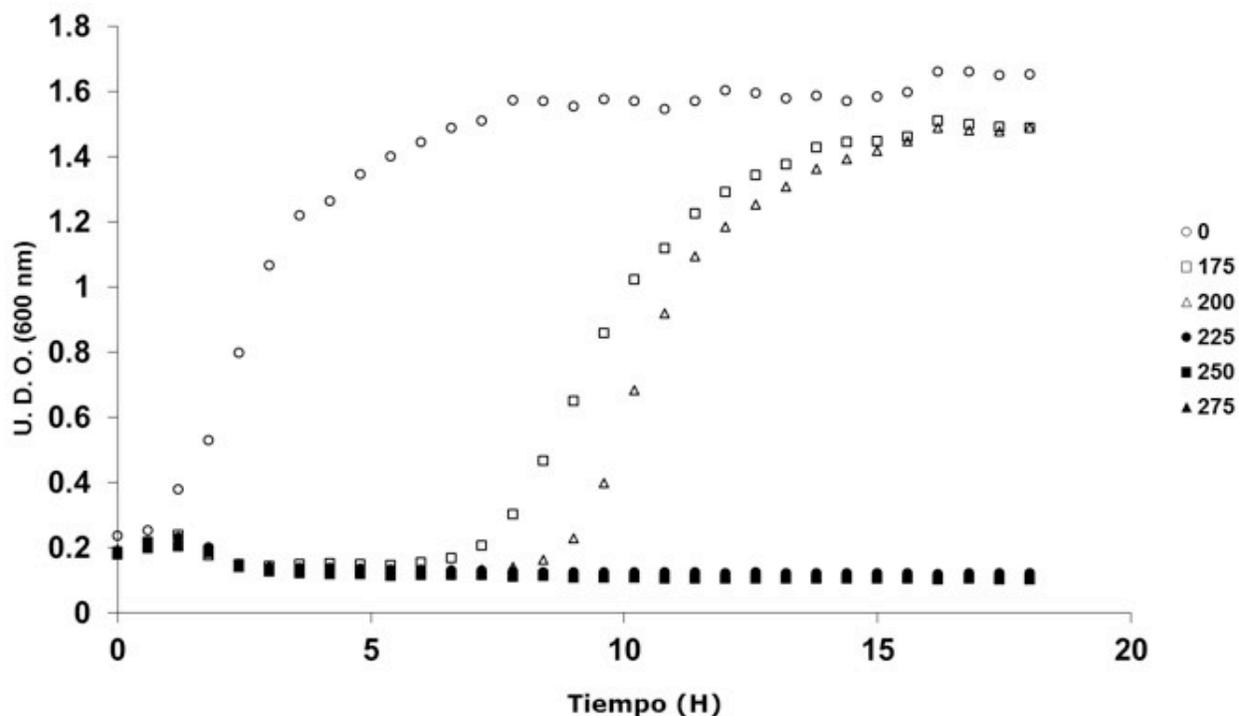


Figura 19. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7 en diferentes concentraciones  $\mu\text{M}$  de tBuOOH después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

Las bacterias transformadas con la construcción GCC-bOBP fue la que presentó mayor resistencia al efecto deletéreo del tBuOOH. Se observó un incremento en el tiempo de la fase *lag* a medida que fue creciendo la concentración del agente insultante. Cabe mencionar que esta transformante fue la única que pudo crecer en todas las concentraciones, no así las bacterias transformadas con la clona que presenta 6 histidinas en el amino terminal. En la clona que expresa a la OBP con etiqueta de histidinas se observó un aumento en la fase *lag* en comparación con las bacterias transformadas con la GCC-bOBP, además de que la bacteria no pudo crecer a una concentración de 275  $\mu\text{M}$  de tBuOOH. En el caso de las bacterias transformadas con el plásmido vacío, solo se pudo observar crecimiento a 175 y 200  $\mu\text{M}$  de tBuOOH aunado a un aumento en la fase *lag*.

El último agente promotor del estrés oxidativo que se probó fue el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las concentraciones ( $\mu M$ ) que se utilizaron en los ensayos fueron 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1 mM (4 horas de pre-inducción en Anexo 1.3 y 6 horas en Anexo 2.3). De las concentraciones probadas, en el rango de 0.6 a 1 mM es donde se pudo observar un efecto protector de las proteínas sobre-expresadas. Como se puede observar en la figura 20, las bacterias transformadas con la construcción pT7-7\_GCC-bOBP pudieron crecer hasta concentraciones tan altas como 1 mM y fueron las que presentaron mayor resistencia al agente insultante en comparación con las transformadas con la construcción, con colas de histidinas pT7-7\_6HGCC-bOBP (Figura 21) y las que contienen solamente al plásmido pT7-7 (Figura 22).

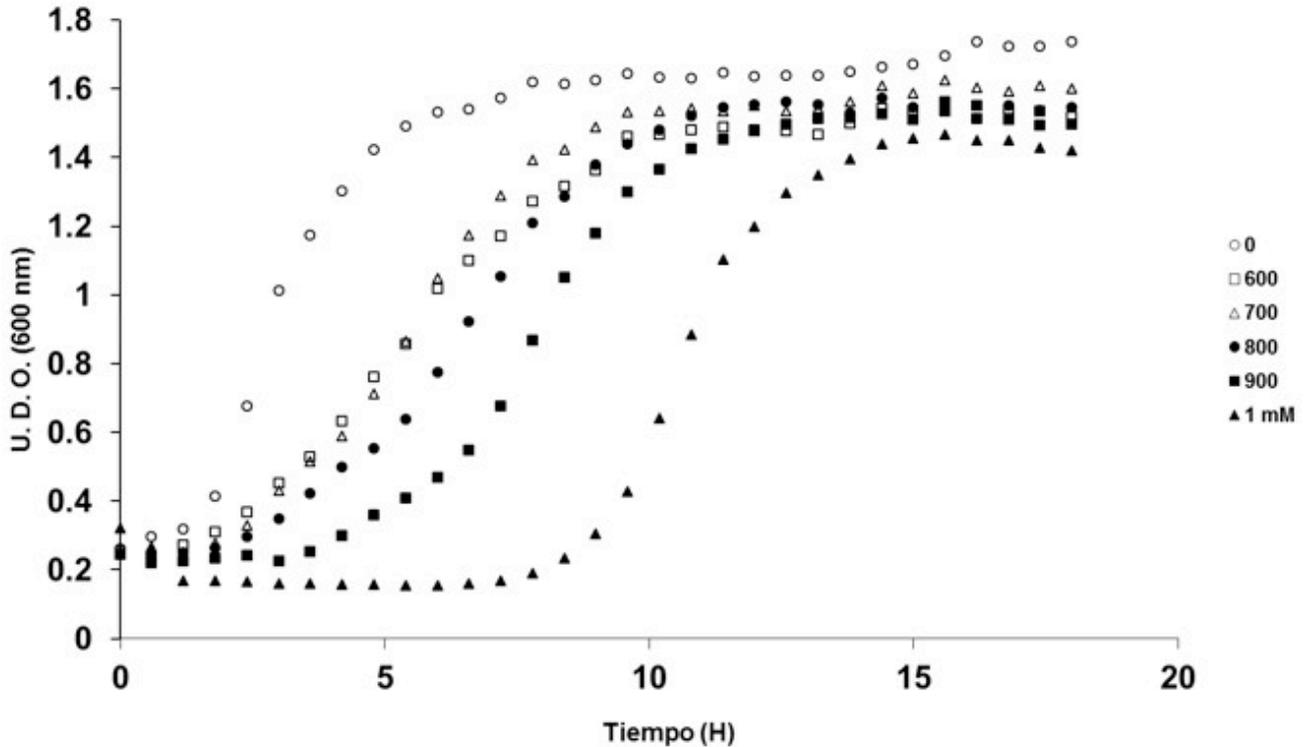


Figura 20. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_GCC-bOBP expuesta a diferentes concentraciones  $\mu M$  de  $H_2O_2$  después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

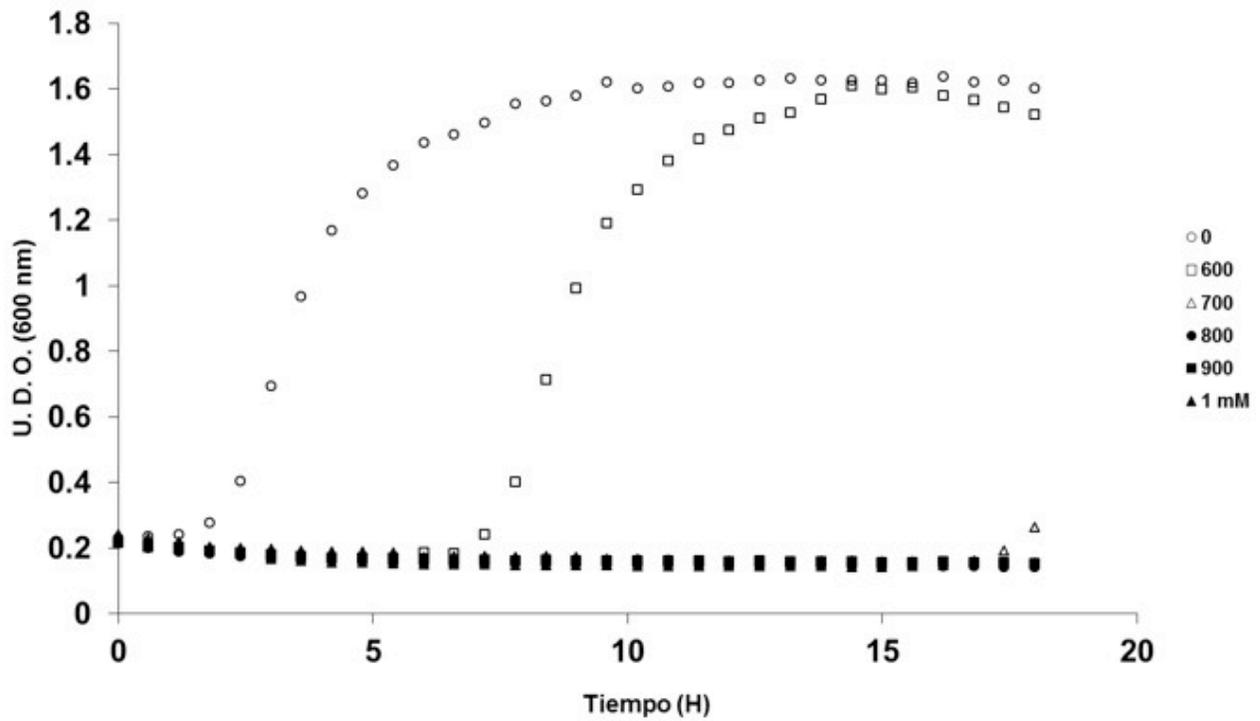


Figura 21. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7\_6HGCC-bOBP en diferentes concentraciones  $\mu$ M de  $H_2O_2$  después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

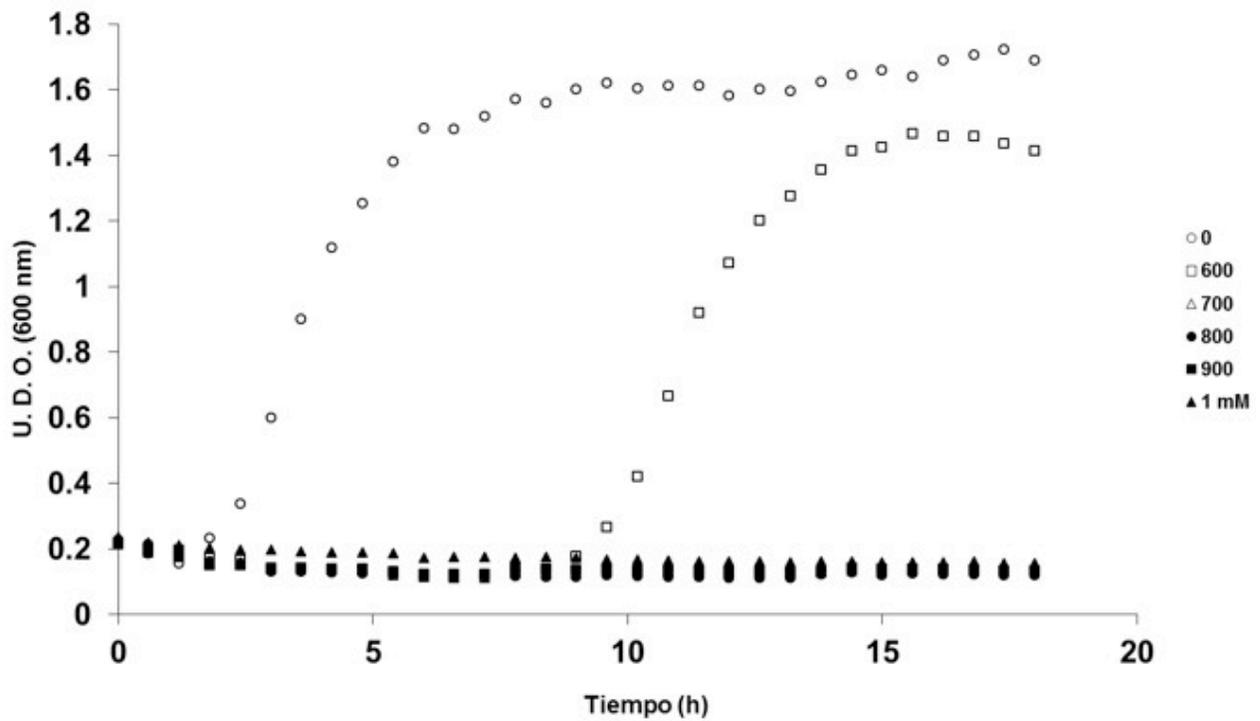


Figura 22. Curvas de crecimiento de la cepa BL21 CodonPlus con pT7-7 en diferentes concentraciones  $\mu$ M de  $H_2O_2$  después de la pre-inducción (4 Hrs) con 0.1 mM de IPTG.

Con la exposición a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), es en donde se puede ver más claro el efecto protector que confiere la proteína GCC-OBP (Fig. 20), ya que en todas las concentraciones ( $\mu M$ ) probadas las bacterias pudieron llegar hasta la fase estacionaria. Sin embargo, es en la fase *lag* en donde se puede ver el efecto de las diferentes concentraciones del agente, aumentando el tiempo de duración de dicha fase. Tanto la clona con colas de histidinas 6HGCC-OBP (Fig. 21) como la que contiene el vector vacío (Fig. 22), se comportaron de una manera muy similar. Ninguna de las clonas crecieron a concentraciones de  $H_2O_2$  por arriba de  $600 \mu M$ .

### **Resultados preliminares de la expresión de la GCC-OBP en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae***

Los resultados obtenidos con la cepa de levadura W303 (Mat $\alpha$  ade2 trp1 ura3 leu2 his3) se muestran en el anexo 3, fue posible localizar en mitocondrias aisladas las fusiones de la GCC-OBP con la presecuencia mitocondrial de citocromo c isoforma 1 (CYC1) y la segunda contiene la presecuencia de la proteína Hierro-Azufre (ISP), así como un cruce transmembranal de dicha proteína que es parte del complejo III (citocromo c reductasa) de *S. cerevisiae*.

## **DISCUSIÓN**

### **ESTRÉS OXIDATIVO**

Las especies reactivas de oxígeno son radicales intermediarios de vida corta, generados a consecuencia de metabolismo, y son capaces de causar daño

a los diferentes constituyentes celulares si no existe un control sobre la producción o en la inactivación de estas moléculas.

Los oxi-radicales pueden reaccionar casi indiscriminadamente con las biomoléculas. Entre los principales blancos para la generación de EROs hay que mencionar los dobles enlaces de las cadenas aciladas de los lípidos. Los intermediarios de radicales lipídicos, de hecho, pueden autopropagarse y generar más radicales y otras moléculas reactivas como los 2-hidroxi-alquenos, que pueden comprometer la integridad de las proteínas y la de los ácidos nucleicos (Uchida 2003). De estudios previos se conocía que la proteína bOBP es capaz de unir el 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) (Grolli *et. al.* 2006) y que tiene la capacidad de unir otras moléculas pequeñas como aldehídos de cadena corta generados en la lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, con esta base, se decidió probar si la expresión de OBP era capaz de proteger a un ser vivo de las sustancias que inducen la peroxidación lipídica

## **SOBRE-EXPRESIÓN DE LA bOBP**

Para poder sobreexpresar a la proteína, en este trabajo se utilizó a *E. coli* (BL21 CodonPlus) ya que contiene otros RNAs de transferencia que utilizan las células eucariotas preferentemente. Esta cepa contiene el plásmido pT7-7 que expresa la GCCbOBP, esta proteína, que es un mutante monomérica caracterizada por el típico plegamiento de las lipocalinas monoméricas, que es capaz de unir pequeñas moléculas de bajo peso molecular y con la misma afinidad con que lo hace la bOBP nativa (Ramoni R. *et al.* 2008). También se sobre-expresó la versión de dicha proteína con la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal (6H-GCC-bOBP), que presenta capacidades similares de secuestrar pequeñas moléculas hidrofóbicas.

La sobre-expresión de la proteína GCC-bOBP fue capaz de proteger a las células de *E. coli* del estrés ocasionado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 17) y tBuOOH (Fig. 20). En

general, la citotoxicidad que provocan estos agentes es a través de la peroxidación de ácidos grasos insaturados. Los productos finales que se generan son aldehídos reactivos de cadena corta y de bajo peso molecular, incluido el 4HNE (Miwa S. *et al.* 2008). Por lo tanto, podemos especular que la protección que brinda la sobre-expresión de la GCC-bOBP radica en remover los productos de la lipoperoxidación. Por otra parte, el insulto con menadiona (2-metil-1.4-naftoquinona) radica en la generación del ión superóxido dentro de la célula, que si no se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno por la acción de la superóxido dismutasa, puede reducir los grupos de alto potencial ferril de los citocromos (Bielski B. H. J. 1985) y oxidar a los núcleos fierro-azufre de bajo potencial (Bielski B. H. J. *op. cit.*; Srinivasan C. *et al.* 2000; Liochev S. I. and Fridovich I. 2002.). Por su parte, el peróxido de hidrógeno conduce a la lipoperoxidación. La oxidación del hierro es considerada la principal ruta de toxicidad generada por el superóxido generado dentro de la célula, por lo que se puede sugerir que los aldehídos reactivos generados en la lipoperoxidación por la presencia de menadiona, es menor que los generados por el daño del peróxido de hidrógeno o del peróxido orgánico (tBuOOH).

Se observó que las bacterias transformadas con la construcción GCC-bOBP, presentan mayor resistencia al estrés que provoca la presencia de peróxidos, que las transformadas con la construcción 6HGCC-bOBP. La protección que brinda la sobre-expresión de la proteína GCC-bOBP no radica en las cantidades de la proteína que se acumulan (Figuras 12 y 13), ya que se producen mayores cantidades de la proteína con etiqueta de histidinas que aquella sin etiqueta. Esto nos lleva a sugerir que la bacteria *E. coli* transformada con la construcción con etiqueta esta comprometida totalmente a sobre-expresar la proteína y no despliega adecuadamente los sistemas de defensa (OxyR, SoxRS y RpoS) que se inducen cuando se expone a los agentes que provocan el estrés oxidativo.

Sorprendentemente, las células transformadas con el vector vacío resistieron concentraciones elevadas de menadiona (Fig. 16), en comparación con

las transformadas con la construcción 6HGCC-bOBP (Fig. 15). Esto puede deberse a lo comentado previamente, que al comprometerse la bacteria a sobre-expresar la proteína recombinante, se están estresando más las células y por lo tanto son más susceptibles al efecto oxidativo que provoca la quinona en comparación con las que no sobre-expresan la proteína recombinante.

En el caso de las fosas nasales, donde la bOBP lleva a cabo su función fisiológica, la proteína probablemente es capaz de secuestrar los productos finales de la lipoperoxidación que se generan a consecuencia del contacto directo del epitelio con el oxígeno. En el caso de la bacteria, la OBP expresada intracelularmente podría estar secuestrando los productos de la lipoperoxidación generados por los agentes químicos probados en este estudio como el  $H_2O_2$  y el tBuOOH. Cabe recalcar que la función de la OBP en el interior de la célula no es catalítica, ya que no procesa enzimáticamente los ligandos que une; simplemente se limita a secuestrar dichos productos tóxicos. Por eso, por cada molécula colectada, se inactiva una OBP. Esto es cierto en los dos sistemas biológicos, tanto en el epitelio de la mucosa bovina como en *E. coli*. Bajo condiciones severas de estrés oxidativo, los productos que provienen de la lipo-peroxidación podrían generarse en cantidades milimolares. Para que la OBP funcione como un agente protector efectivo, también tiene que encontrarse en concentraciones similares, en el rango milimolar. En el epitelio de la mucosa se regenera continuamente a la OBP, la cual se piensa que secuestra los productos nocivos y los acarrea a rutas de eliminación. En cambio, en la bacteria solo se cuenta con la cantidad de proteína que se acumuló durante la inducción de IPTG, y no existe un recambio continuo de la proteína en las fases de replicación celular. Sin embargo, podemos concluir que el tiempo de inducción (4 h) fue suficiente para generar la suficiente proteína para poder conferir resistencia a las bacterias que expresan la GCC-bOBP en las concentraciones micromolares probadas de  $H_2O_2$  y el tBuOOH, en comparación con las bacterias que expresan la 6HGCC-bOBP y las que contienen el plásmido sin inserto.

Solamente existe otro caso descrito de una proteína que puede funcionar como agente secuestrador de productos tóxicos. La apolipoproteína D es una lipocalina presente en el plasma sanguíneo de mamíferos que se asocia a las lipoproteínas de alta densidad y transporta diferentes moléculas hidrofóbicas como son colesterol, progesterona, pregnenolona, bilirrubina, ácido araquidónico y drogas (Eichinger A. *et al.* 2007). Su capacidad para unir aldehídos que son producto final de la lipoperoxidación es desconocida, pero se ha demostrado que protege a *Drosophila* en hiperoxia (Walker D. W. *et al.* 2006) y a vertebrados en estado de estrés oxidativo (Ganforina M. D. *et al.* 2008). En el presente estudio demostramos por primera vez que una lipocalina sirve como un protector ante la presencia de EROs producidos en la lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados en un sistema biológico, por lo tanto, este esquema experimental podría representar un modelo valioso para probar el mismo efecto con otras proteínas que pertenecen a la misma familia.

### **La proteína GCC-bOBP**

Los cambios efectuados a la bOBP a semejanza con la estructura de la OBP de porcino (pOBP), provocan que: 1) ahora solo se obtengan formas monoméricas de la bOBP, incapaces de formar la forma dimérica, debido a una inserción de una glicina en la posición 121. 2) el cambio en la posición 64 de un triptófano por un cisteína y la sustitución de una histidina por una cisteína en la posición 155, forman un puente disulfuro, el cual esta presente en la OBP de porcino. Estos cambios en la composición de aminoácidos, no afectan la estructura tridimensional de la proteína ni su capacidad de atrapar moléculas pequeñas poco solubles en agua. Las constantes de disociación (Kd) para las diferentes moléculas probadas se parece a la de bovino o a la de porcino, como se puede observar en los datos obtenidos de Ramoni R. *et al.* (2008) y que se muestran en la tabla 1.

	Kd bOBP nativa	Kd GCC-bOBP	Kd pOBP
AMA	1	0.8	1.5
OCT	1.2	8.4	2.7
UND	0.3	2.2	2.1
BZP	0.8	2.0	3.1
IBMP	17.6	20.6	0.3
DHM	0.35	2.3	0.1

Tabla 1. Las constantes de disociación ( $\mu\text{M}$ ) de las diferentes OBPs para los diferentes compuestos probados. bOBP=la bOBP de bovino que forma dímeros, GCC-bOBP=la bOBP que no forma dímeros, pOBP=la OBP de porcino. AMA=amino antraceno; OCT=1-octeno-3-ol; UND=undecanal; BZP=benzofenona; IBMP=1 isobutil 3 metil pirazina; DHM=dihidromircenol.

En un estudio más reciente se probó la capacidad de retener herbicidas presentes en agua en concentraciones milimolares, con la 6H-bOBP unida a una resina de agarosa Ni-NTA (Bianchi F. *Op. Cit.*). Esto depende de la concentración de proteína que se una a la resina, así como de la concentración de la molécula que es capaz de unir la bOBP, ya que existe una relación equimolar. Típicamente, la proteína tiene la capacidad de secuestrar moléculas de entre 150-300 Da, esto sugiere que la GCC-bOBP tiene la capacidad de unir otras moléculas pequeñas que estén disueltas en ambientes acuosos, ya que presenta avidez por moléculas pequeñas y poco solubles.

Del gel teñido con azul de Coomassie (Fig. 11), apoyado con la inmunorréplica tipo Western (Fig. 13), podemos decir que las células transformadas con 6HGCC-OBP sobre-expresan alrededor de cinco veces más que las que están transformadas con la GCC-OBP sin histidinas. La concentración de esta proteína con una inducción de 4 hrs con IPTG, no puede determinarse exactamente. Sin embargo, sobre la base de los rendimientos de expresión determinados en estudios anteriores, se puede especular que se encuentran en el orden micromolar (Ramoni *et al.* 2008). Luego, basado en estos datos y teniendo

en cuenta las constantes de disociación ( $K_d$ ) de los diferentes ligandos de la OBP que se encuentran en el rango micromolar, se puede decir que la concentración de GCC-OBP en forma soluble en las células de *E. coli*, es lo suficientemente alta para que la proteína pueda secuestrar cantidades equimolares de moléculas tóxicas y/o productos intermediarios producidos por las EROs, siempre y cuando sean reconocidos por el sitio de unión a ligandos.

En el anexo 3 se pueden observar los resultados obtenidos de la expresión de la proteína GCC-bOBP en *Saccharomyces cerevisiae*. Fue posible importar la forma monomérica de la bOBP con diferentes presecuencias mitocondriales, esto se corroboró mediante inmunorréplicas tipo Western. Al igual que en la bacteria *E. coli*, se realizaron curvas de crecimiento con los agentes estresantes previamente mencionados (datos no mostrados), pero no fue posible observar una resistencia clara entre las diferentes transformantes ante la presencia de los agentes químicos que ocasionan el estrés oxidativo. Esto puede deberse a que *S. cerevisiae*, carece de ácidos grasos insaturados, y probablemente no se generen alcanos de cadena corta que puedan ser secuestrados por la GCC-bOBP.

## CONCLUSIONES

i) Por primera vez se demostró, que una lipocalina sirve como un protector ante la presencia de las EROs producidas en la lipoperoxidación de ácidos grasos insaturados en un sistema biológico.

2) Las curvas de crecimiento nos permitieron observar que las bacterias transformadas con la construcción que presenta la GCC-bOBP y que fueron preinducidas durante 4 horas con 0.1 mM de IPTG, es la que presenta la mayor resistencia a el estrés oxidativo ocasionado por  $H_2O_2$  y tBuOOH.

3) La concentración de GCC-OBP en forma soluble en las células de *E. coli*, es suficiente para que la proteína pueda secuestrar cantidades equimolares de moléculas tóxicas y/o productos intermediarios producidos por las EROs.

4) Mediante curvas de crecimiento, se pudo observar que la clona que presenta el plásmido con la GCC-bOBP, resistió las diferentes concentraciones  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrógeno y tBuOOH, y como consecuencia del aumento en las concentraciones se observa una duración más amplia de la fase *lag*.

## **PERSPECTIVAS**

1) Realizar estudios en líneas celulares de mamífero, expresando dentro de las células la bOBP, puede brindar resistencia a agentes que generan estrés oxidativo.

2) Con ayuda de transfecciones estables en líneas celulares de mamíferos, observar si la expresión de la bOBP con secuencias de direccionamiento a la mitocondria, es capaz de conferir resistencia ante la presencia de agentes que promueven el estrés oxidativo y la generación de radicales libres.

## **Anexo 1**

Curvas de crecimiento de las bacterias BL21 CodonPlus, transformadas con el plásmido pT7-7, y con las construcciones con la secuencia de cDNA que codifica para la GCCbOBP (pT7-7\_bOBP) y la que presenta las seis histidinas en el extremo amino terminal 6HGCCbOBP (pT7-7\_6HbOBP), con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG. Las gráficas comparan el comportamiento de las diferentes transformantes en la misma concentración de los diferentes agentes, en el mismo día de experimento. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los diferentes experimentos.

## 1.1 Menadiona

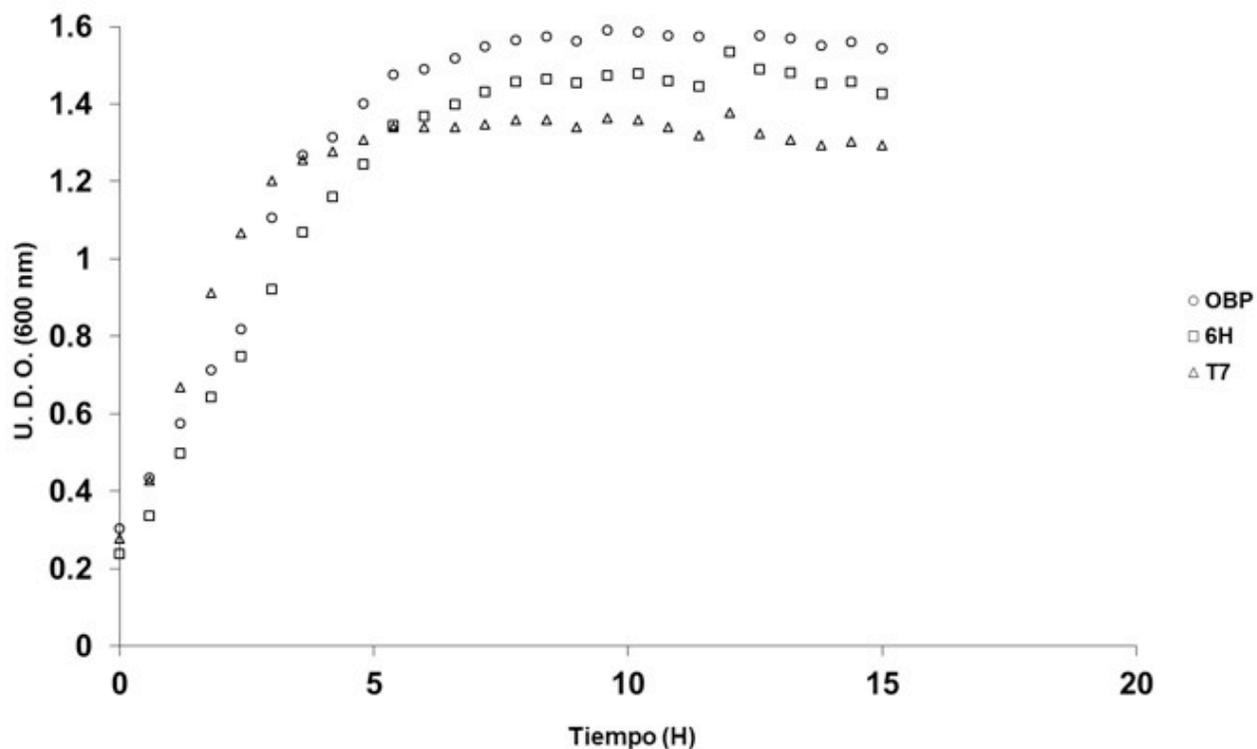


Figura 1.1.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG.

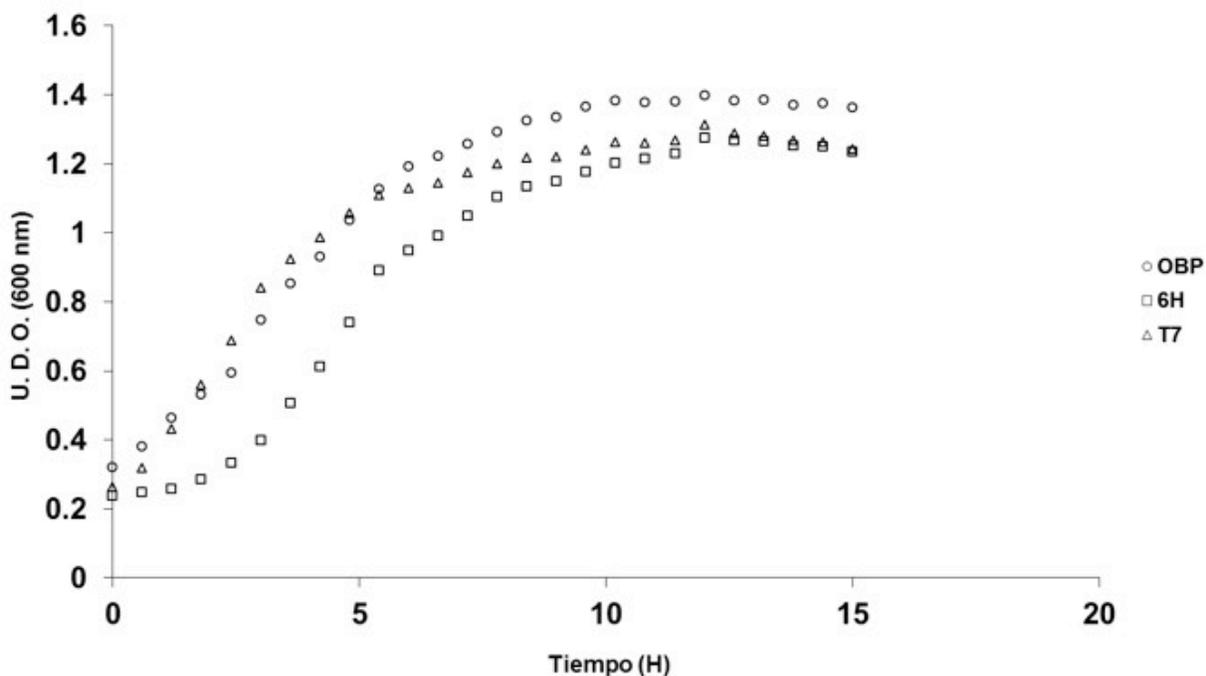


Figura 1.1.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 100 μM de Menadiona.

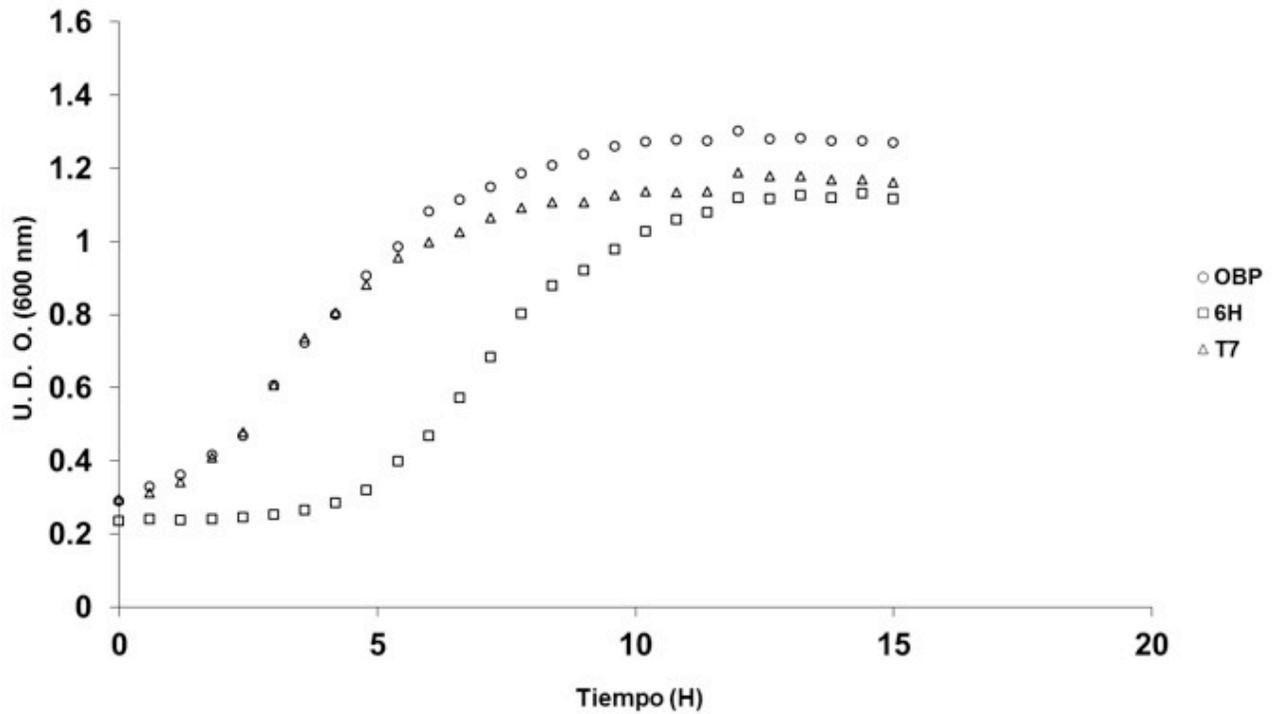


Figura 1.1.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 125 μM de Menadiona.

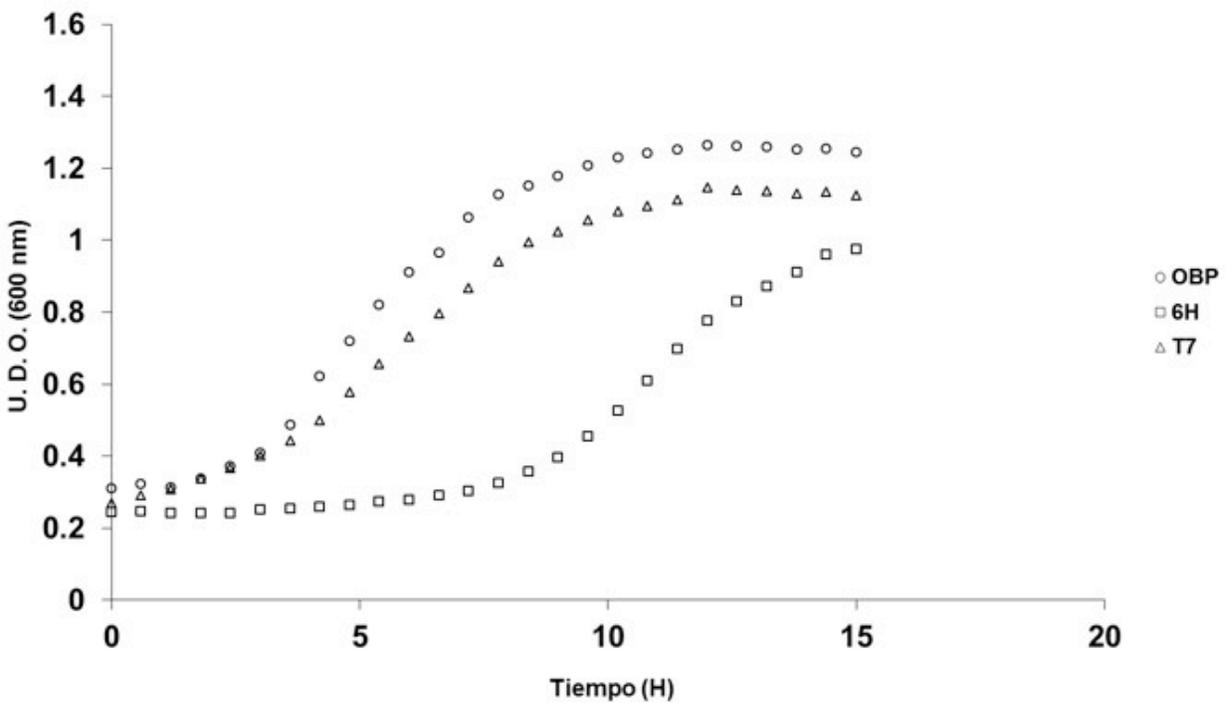


Figura 1.1.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 150 μM de Menadiona.

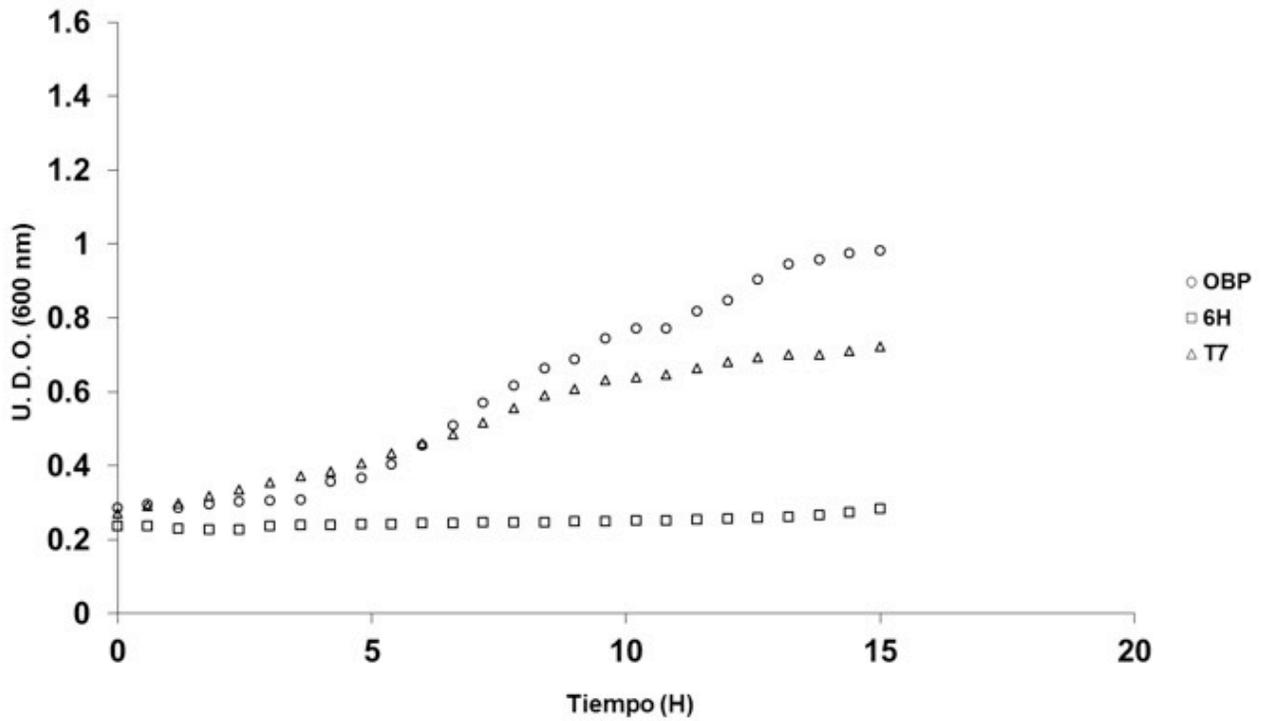


Figura 1.1.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 175  $\mu$ M de Menadiona.

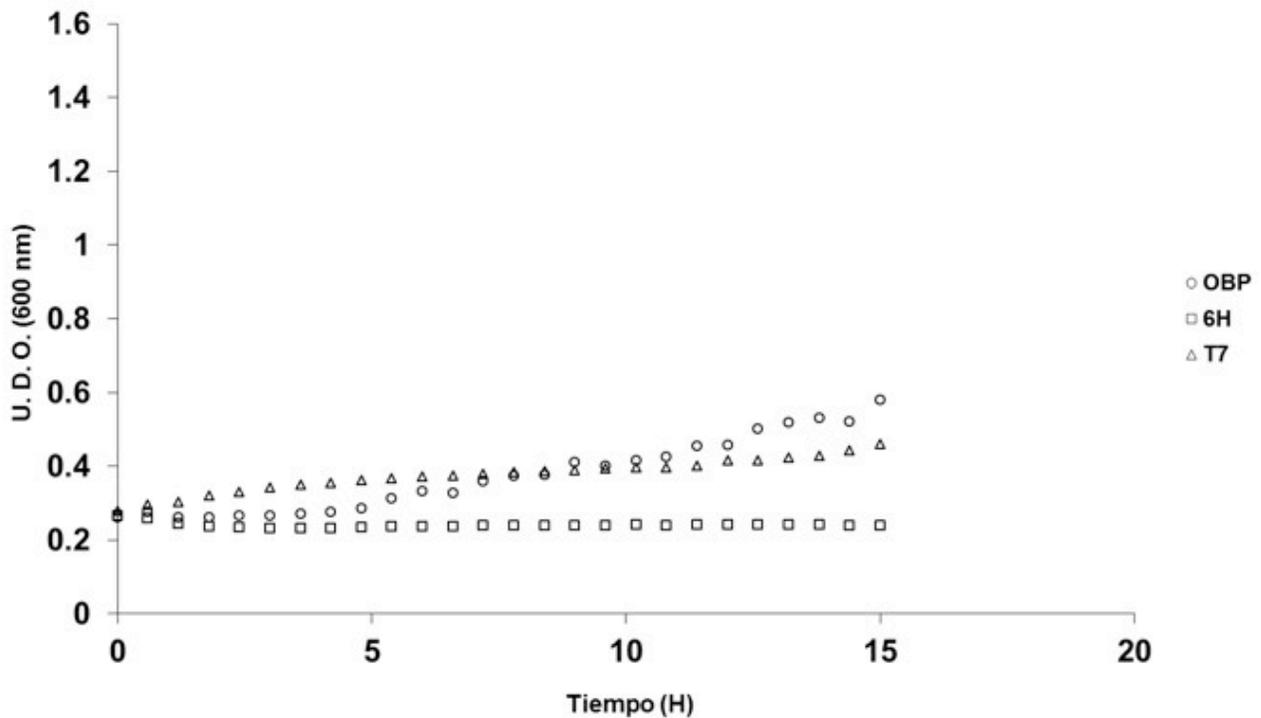


Figura 1.1.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200  $\mu$ M de Menadiona.

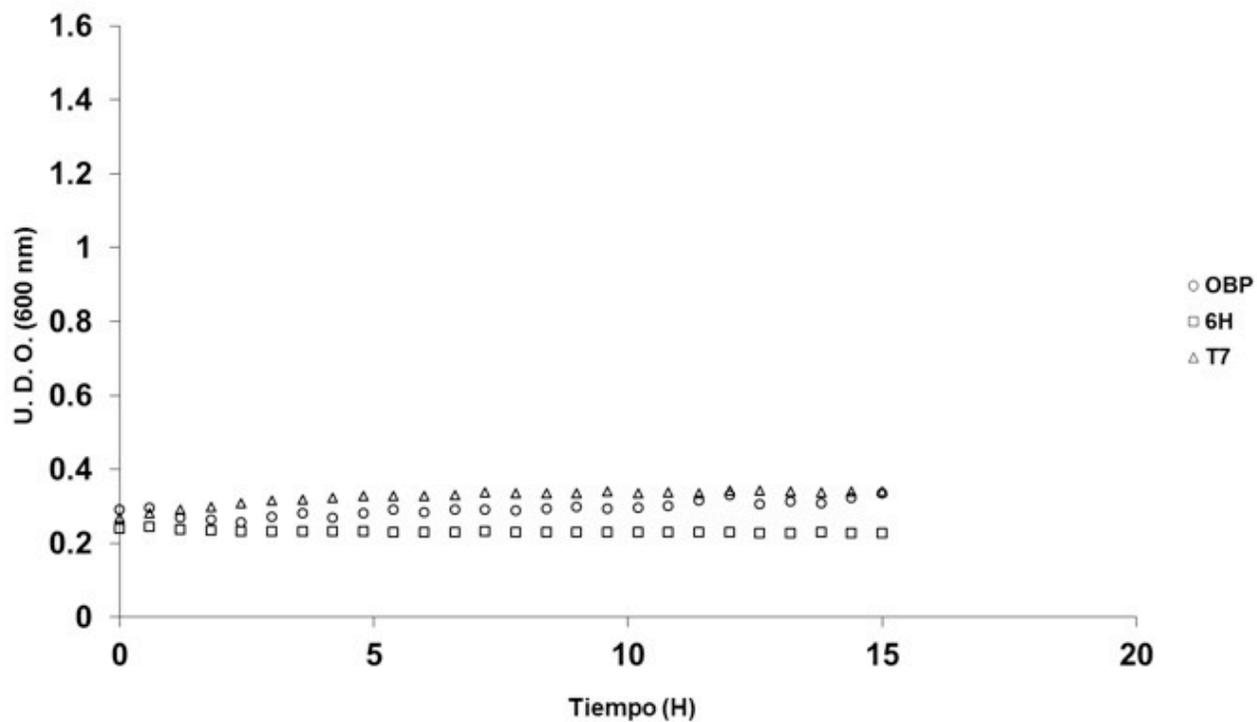


Figura 1.1.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 225  $\mu$ M de Menadiona.

## 1.2 *tert*-Butilhidroperóxido (tBuOOH)

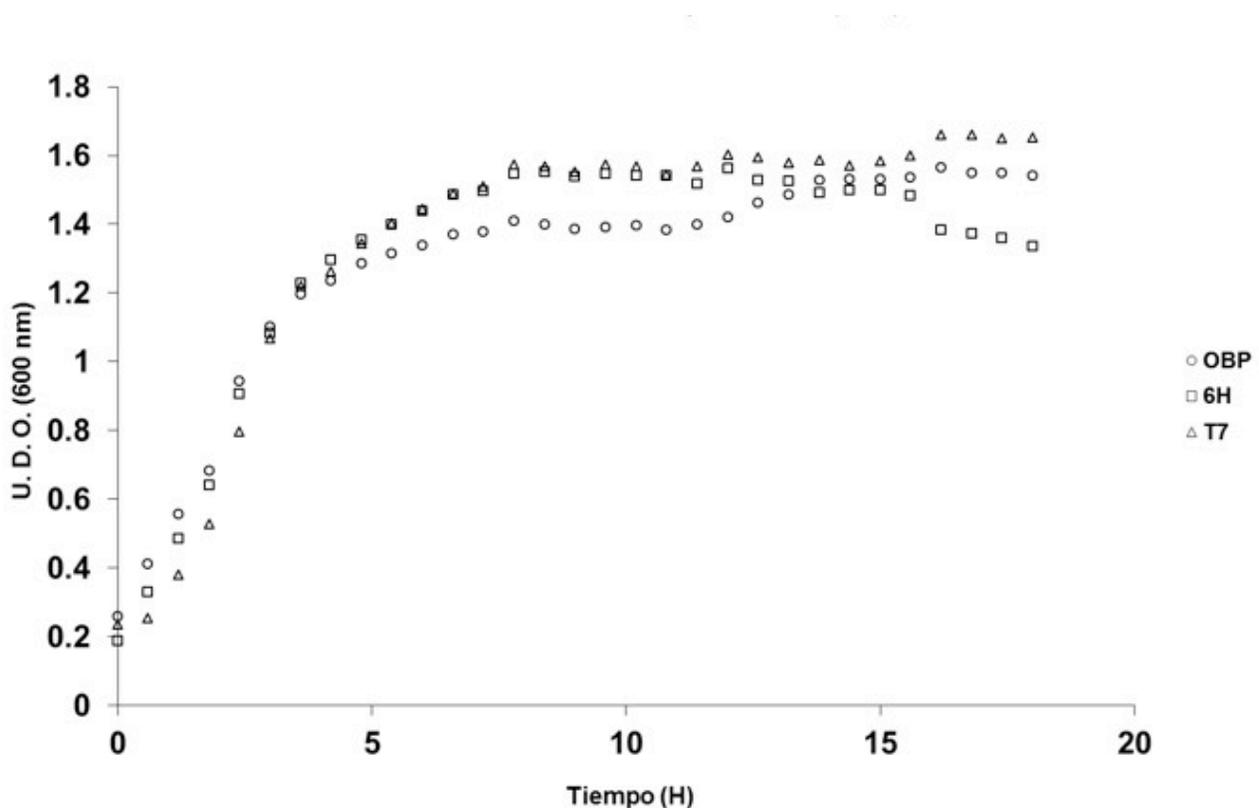


Figura 1.2.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG.

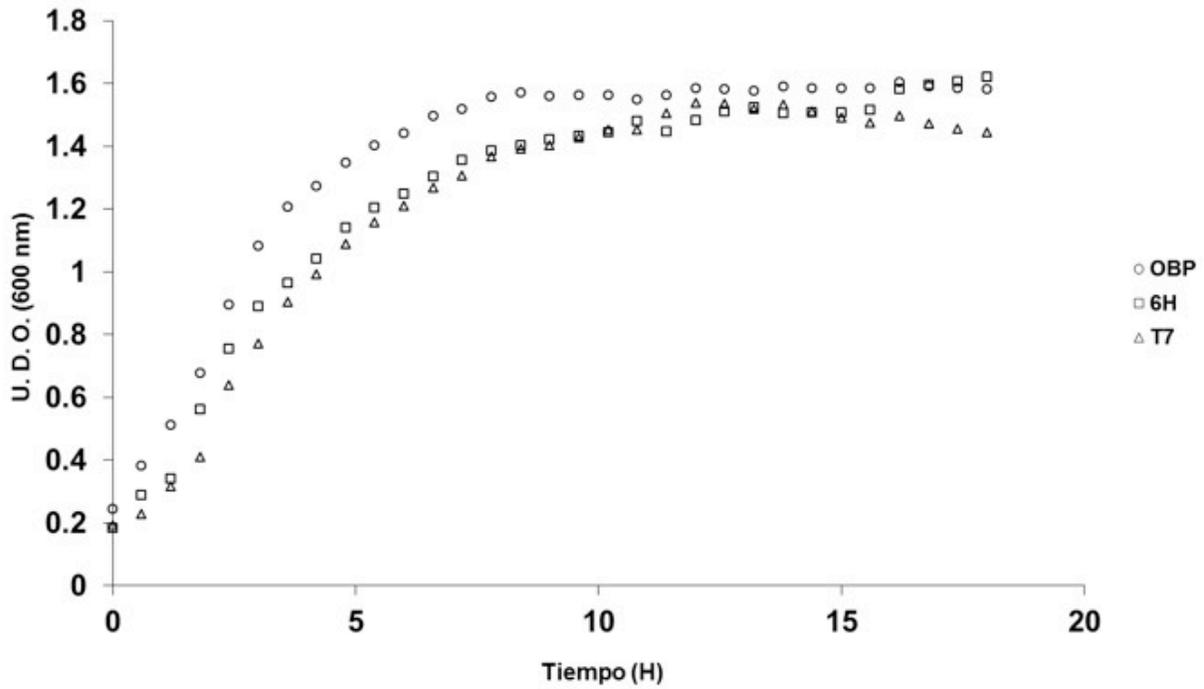


Figura 1.2.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 75  $\mu$ M de tBuOOH.

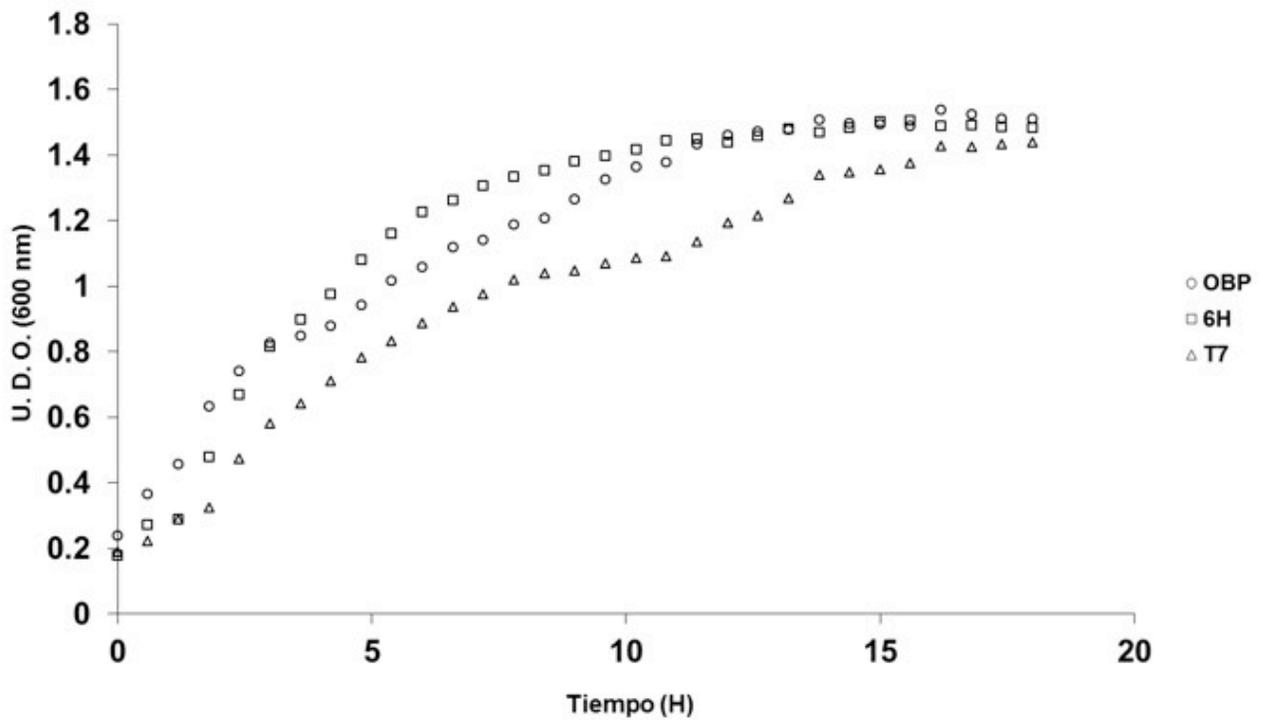


Figura 1.2.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 100  $\mu$ M de tBuOOH.

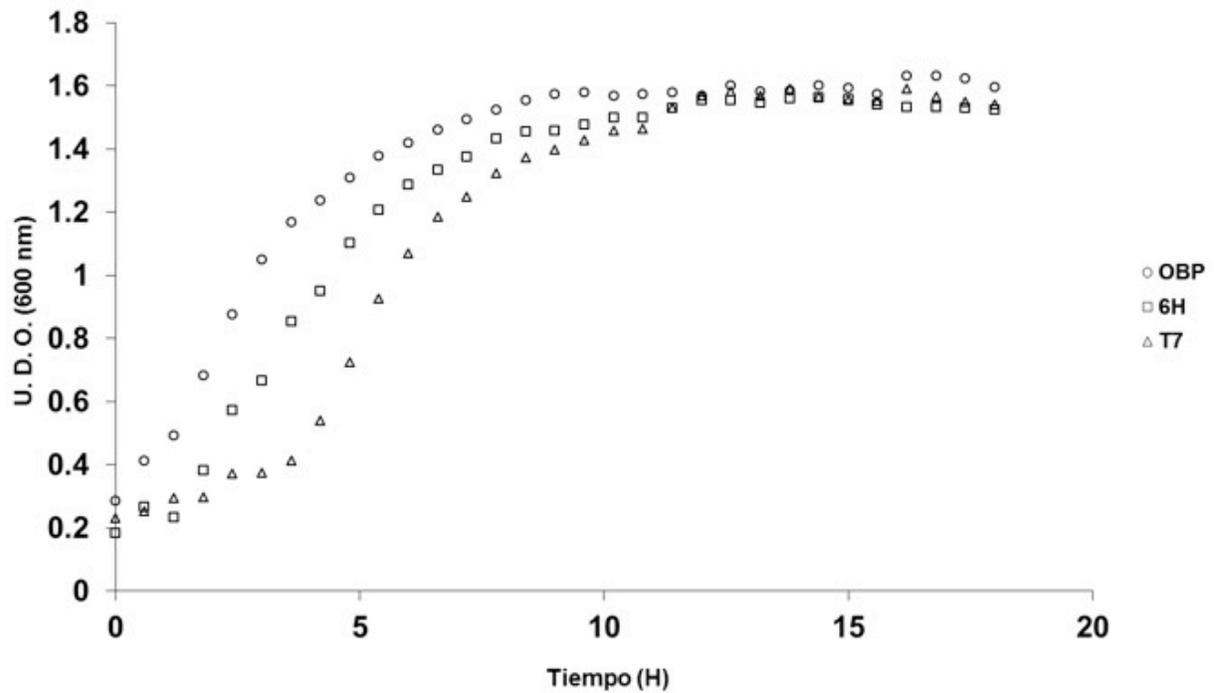


Figura 1.2.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 125  $\mu$ M de tBuOOH.

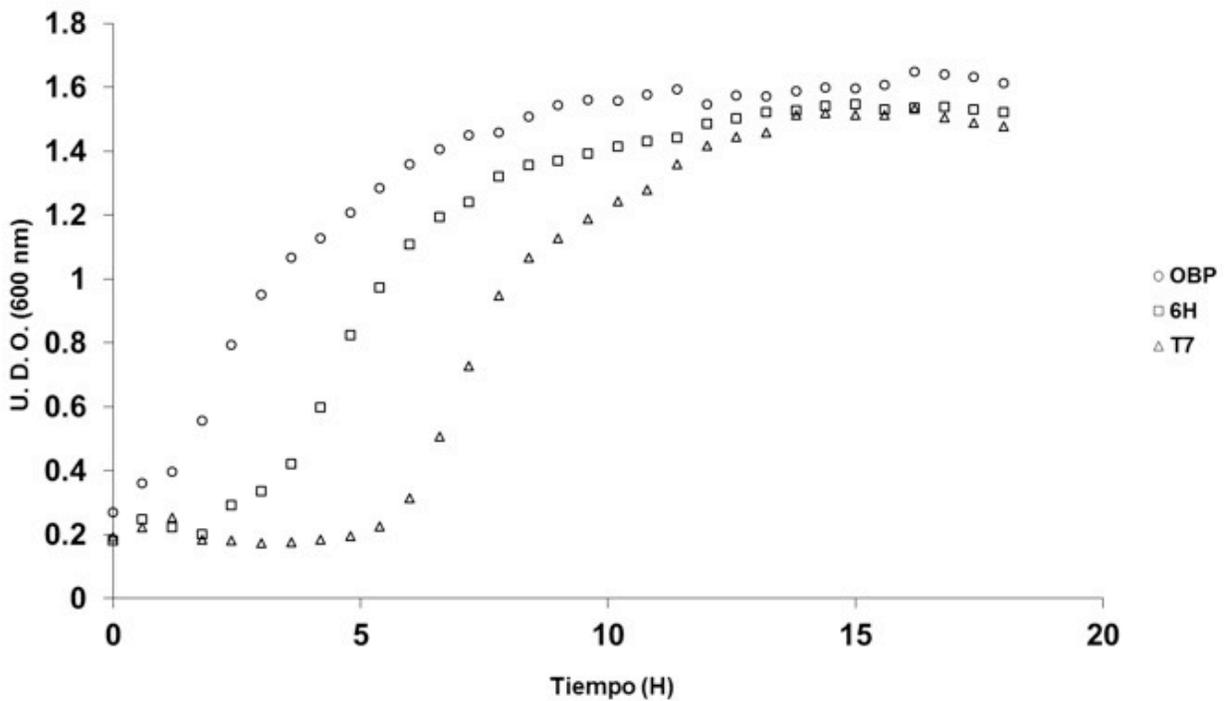


Figura 1.2.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 150  $\mu$ M de tBuOOH.

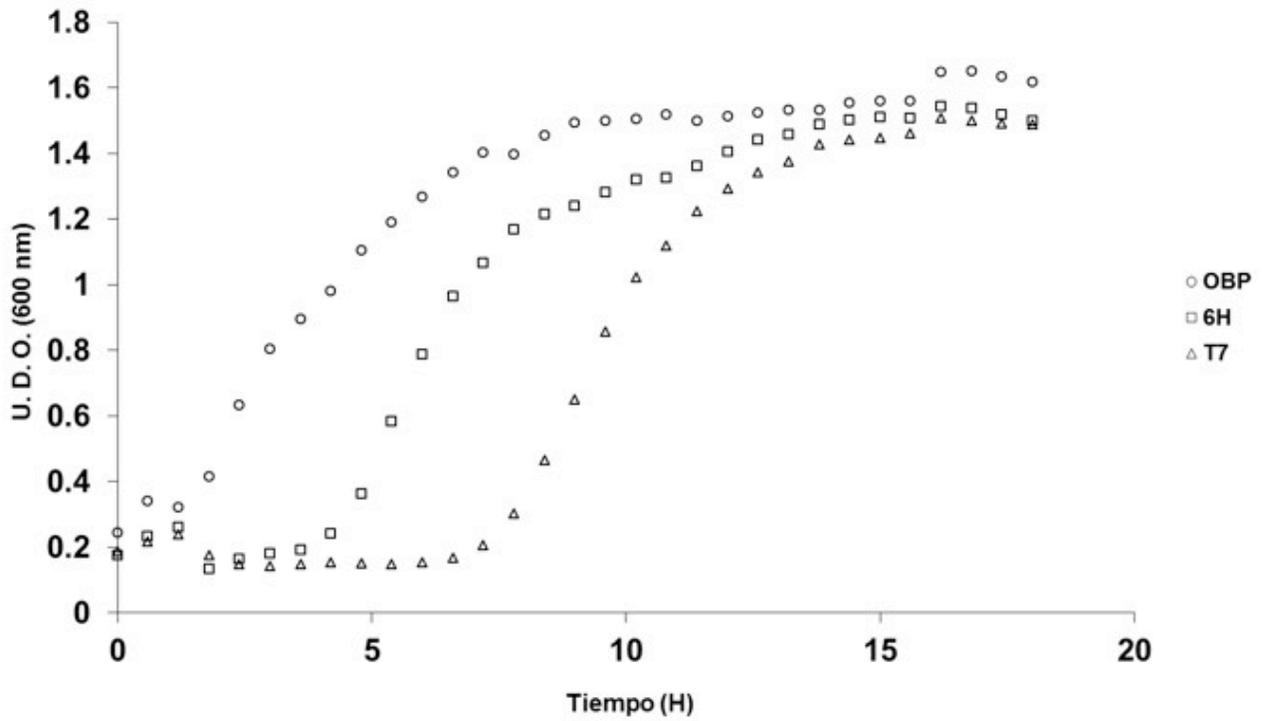


Figura 1.2.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 175 μM de tBuOOH.

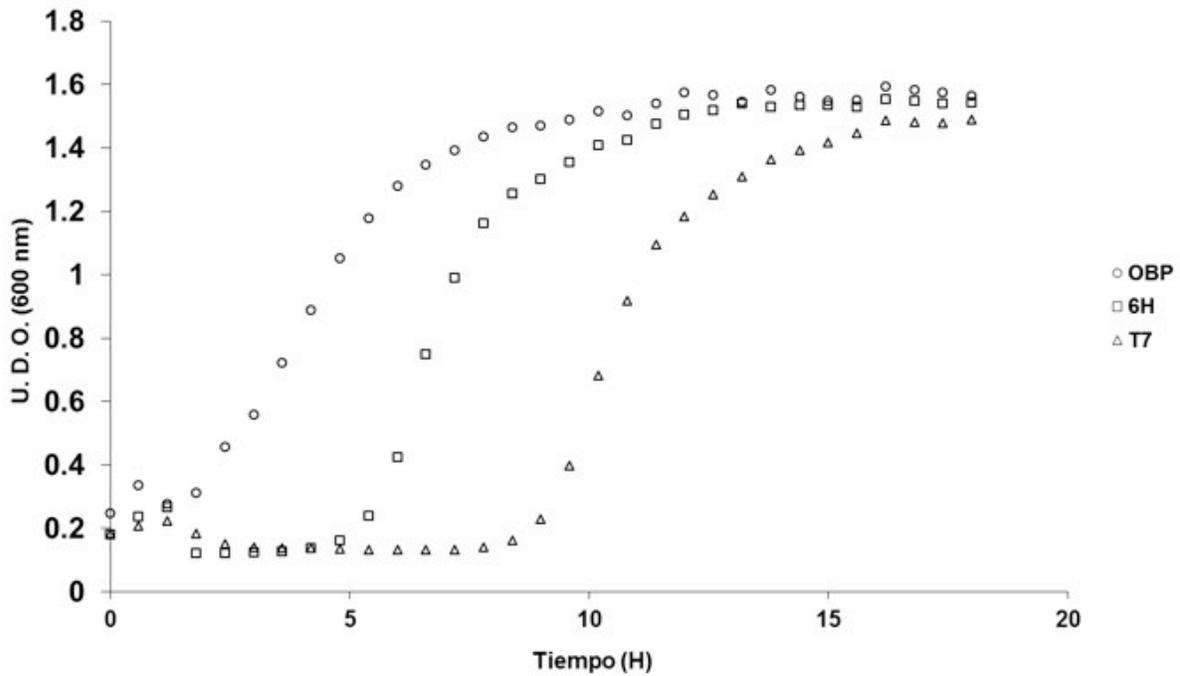


Figura 1.2.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200 μM de tBuOOH.

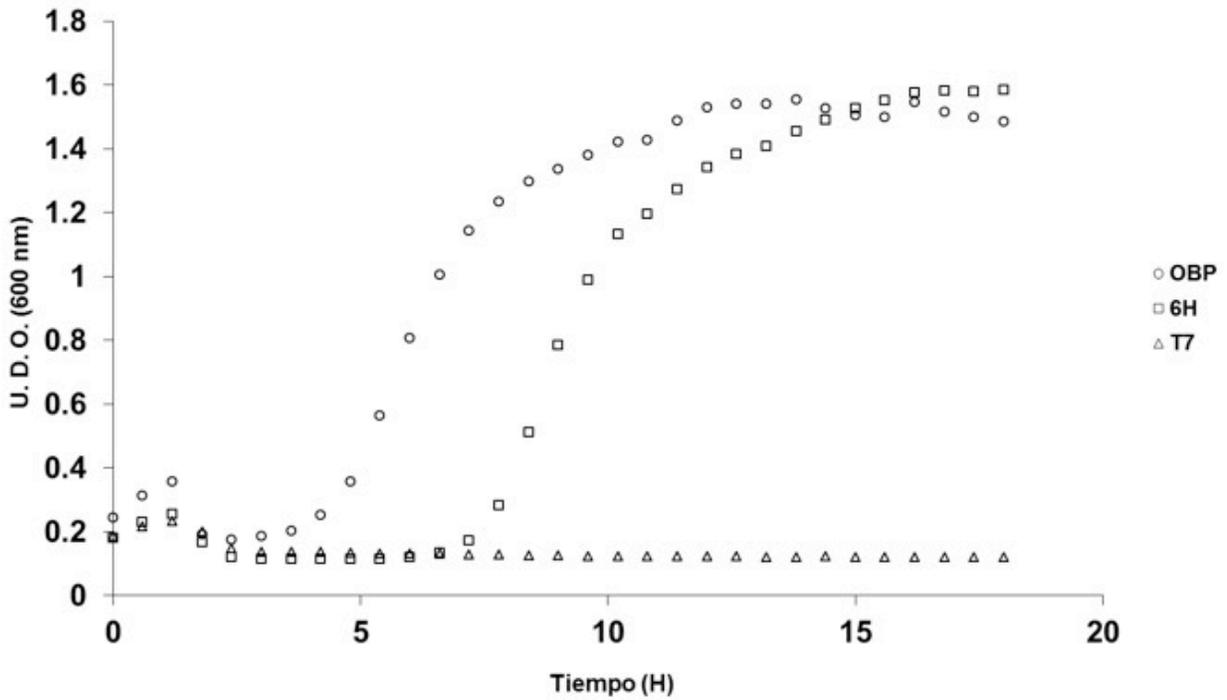


Figura 1.2.8. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 225  $\mu$ M de tBuOOH.

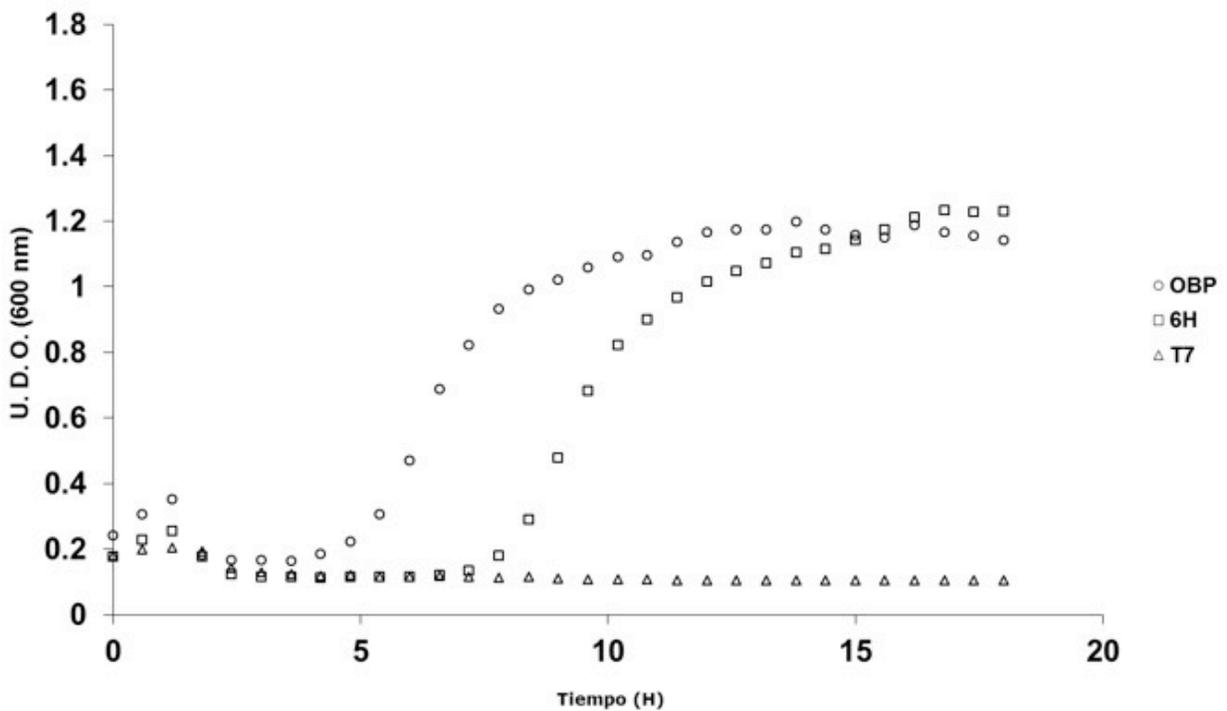


Figura 1.2.9. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 250  $\mu$ M de tBuOOH.

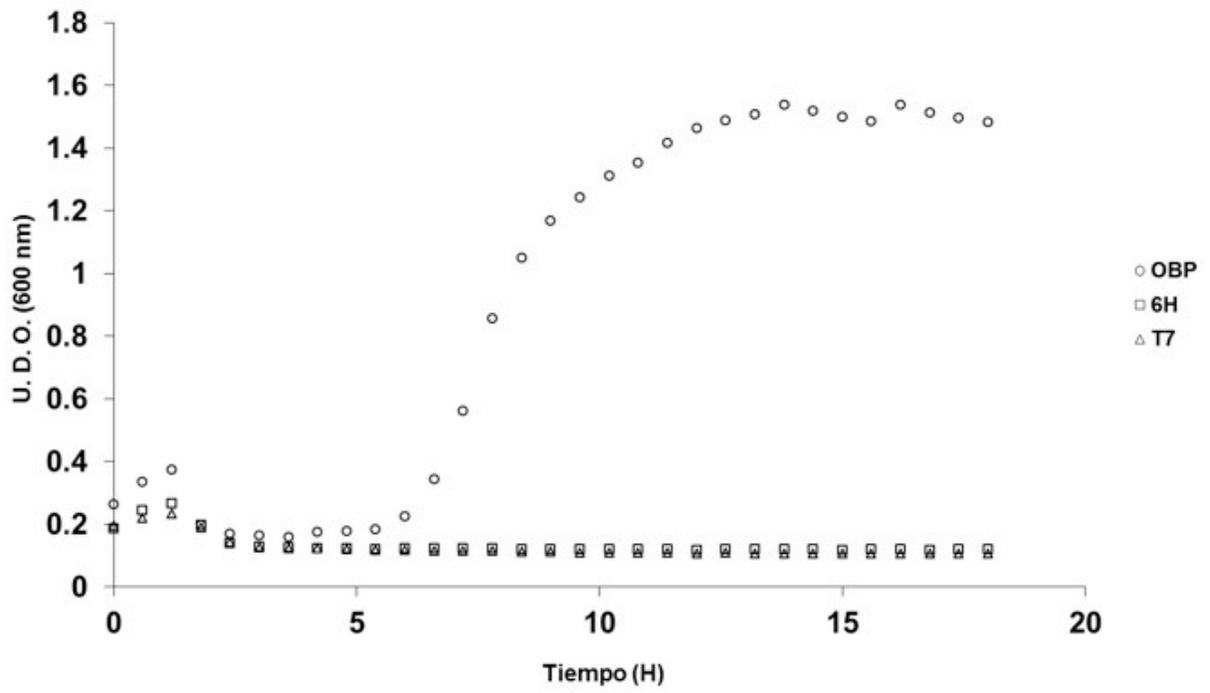


Figura 1.2.10. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 275  $\mu$ M de tBuOOH.

### 1.3 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

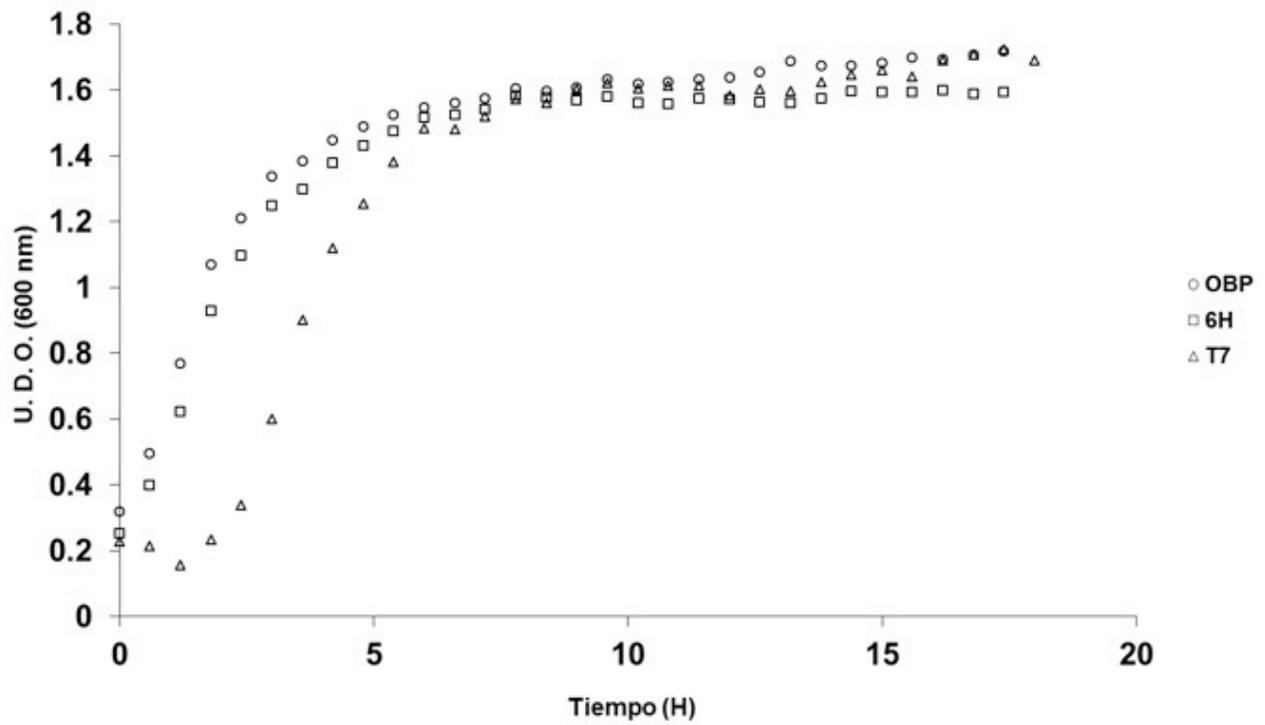


Figura 1.3.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG.

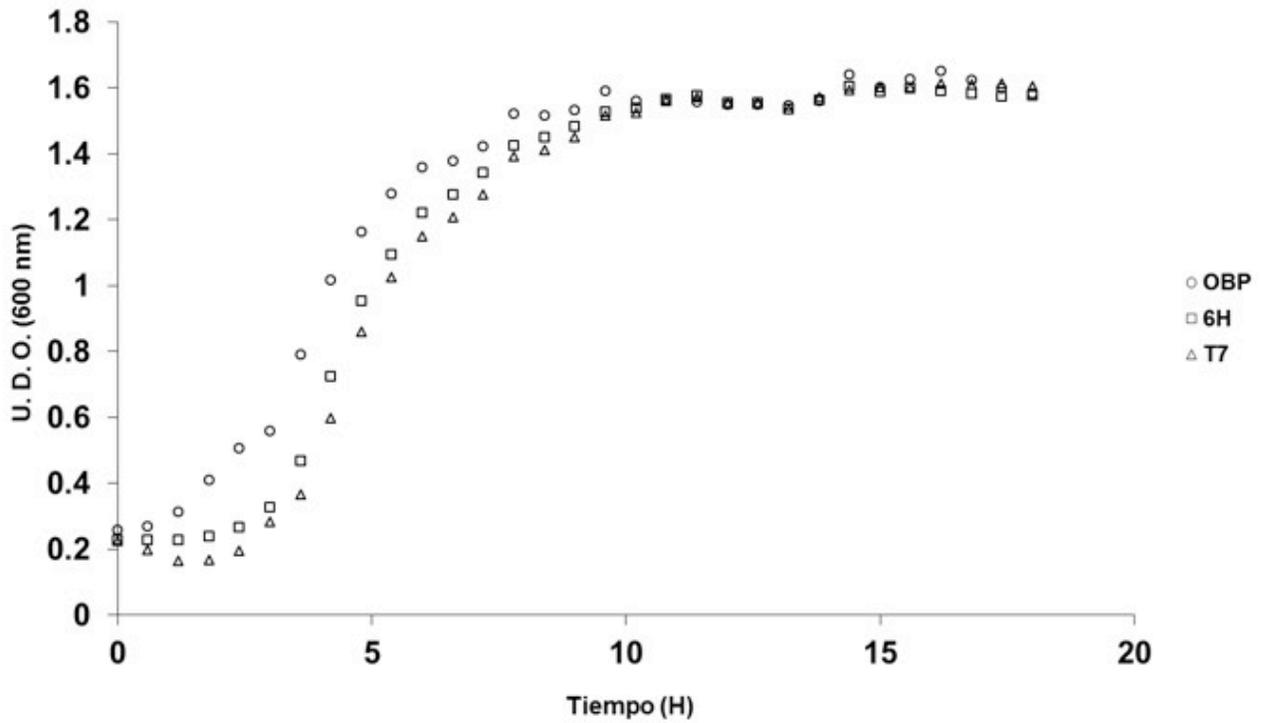


Figura 1.3.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

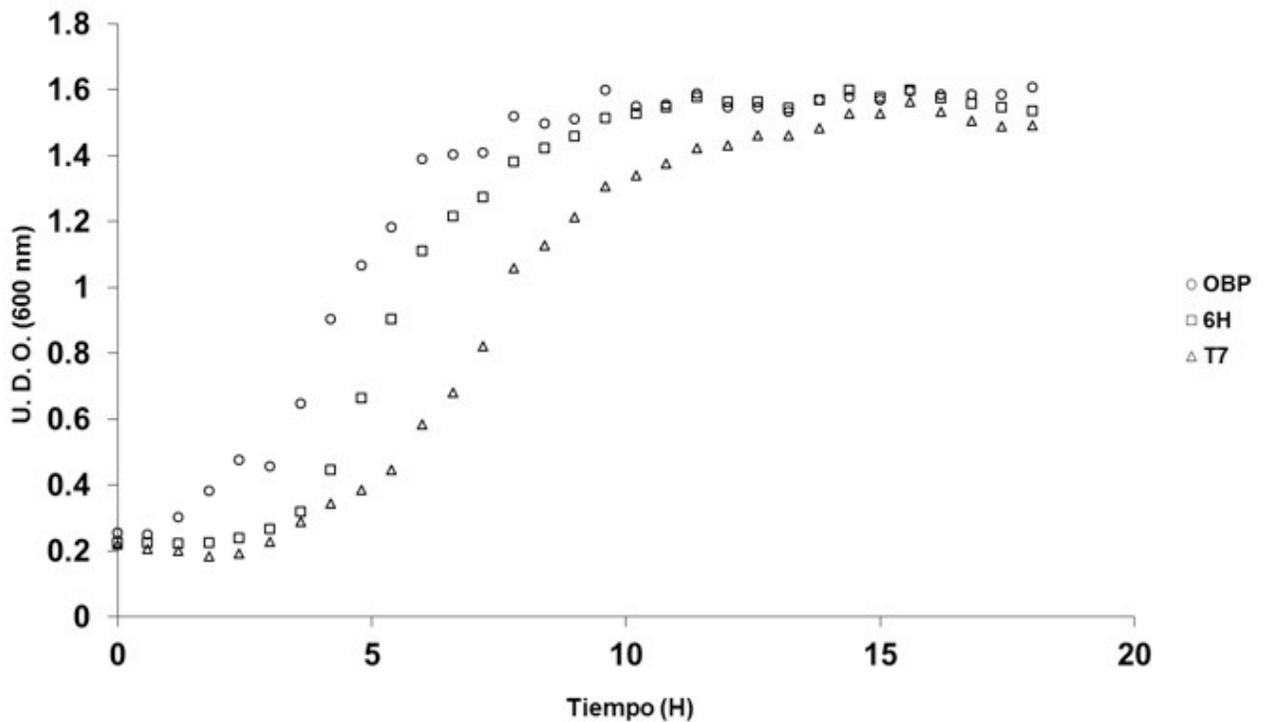


Figura 1.3.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

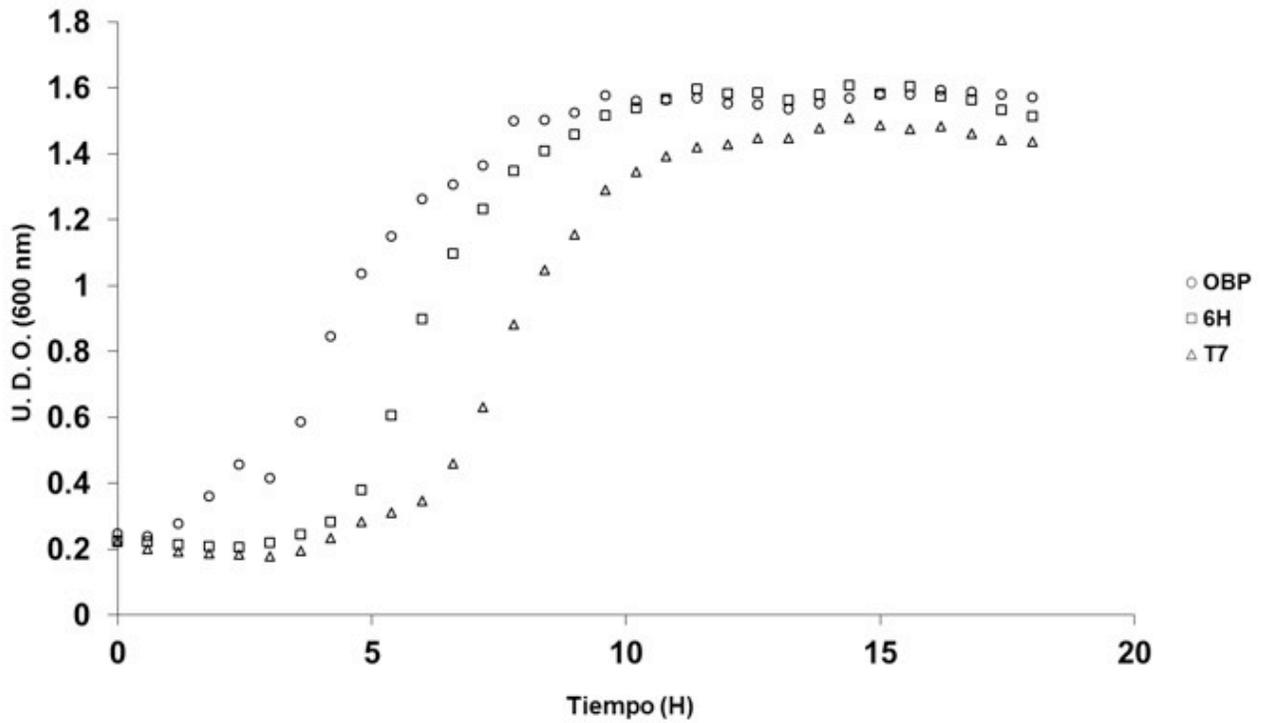


Figura 1.3.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

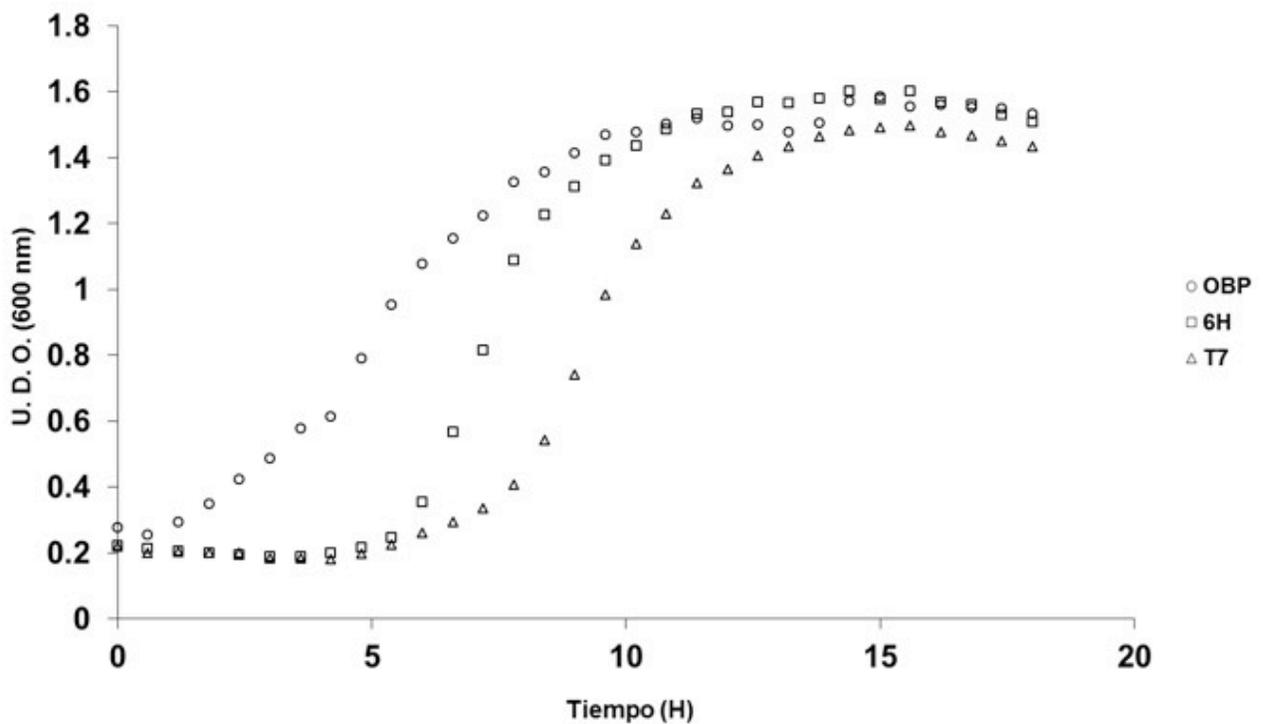


Figura 1.3.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 500 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

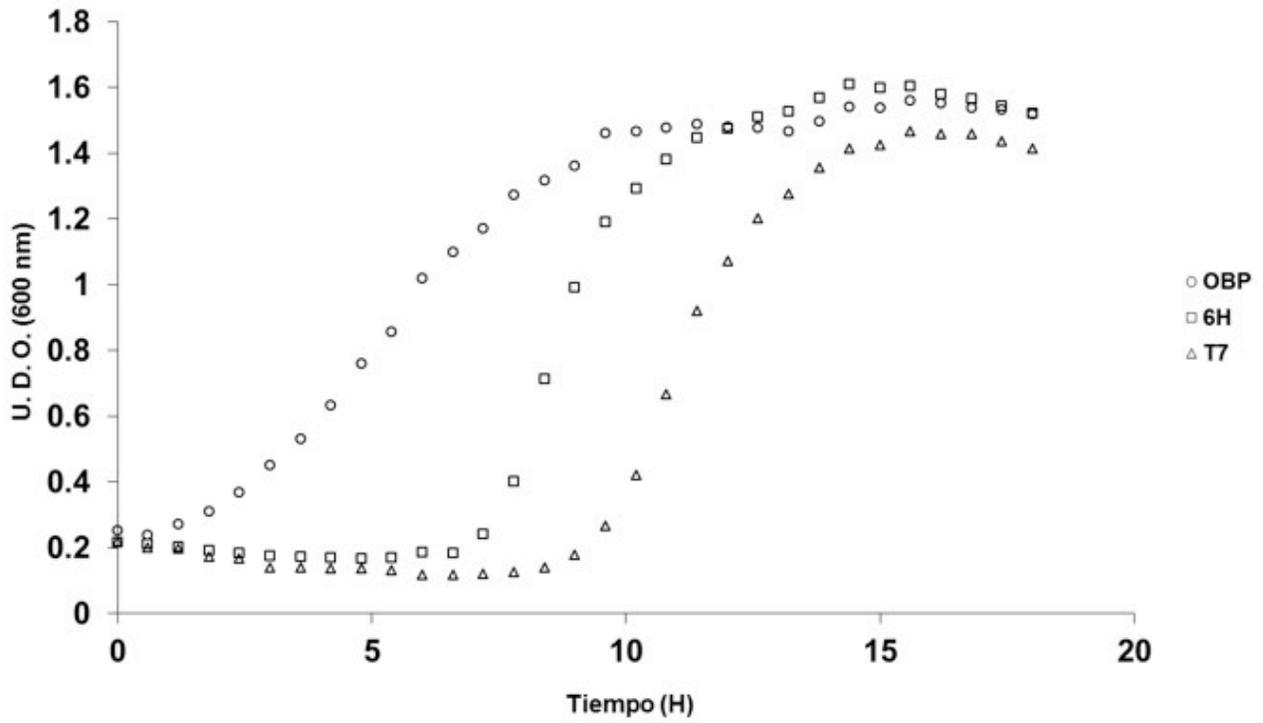


Figura 1.3.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 600 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

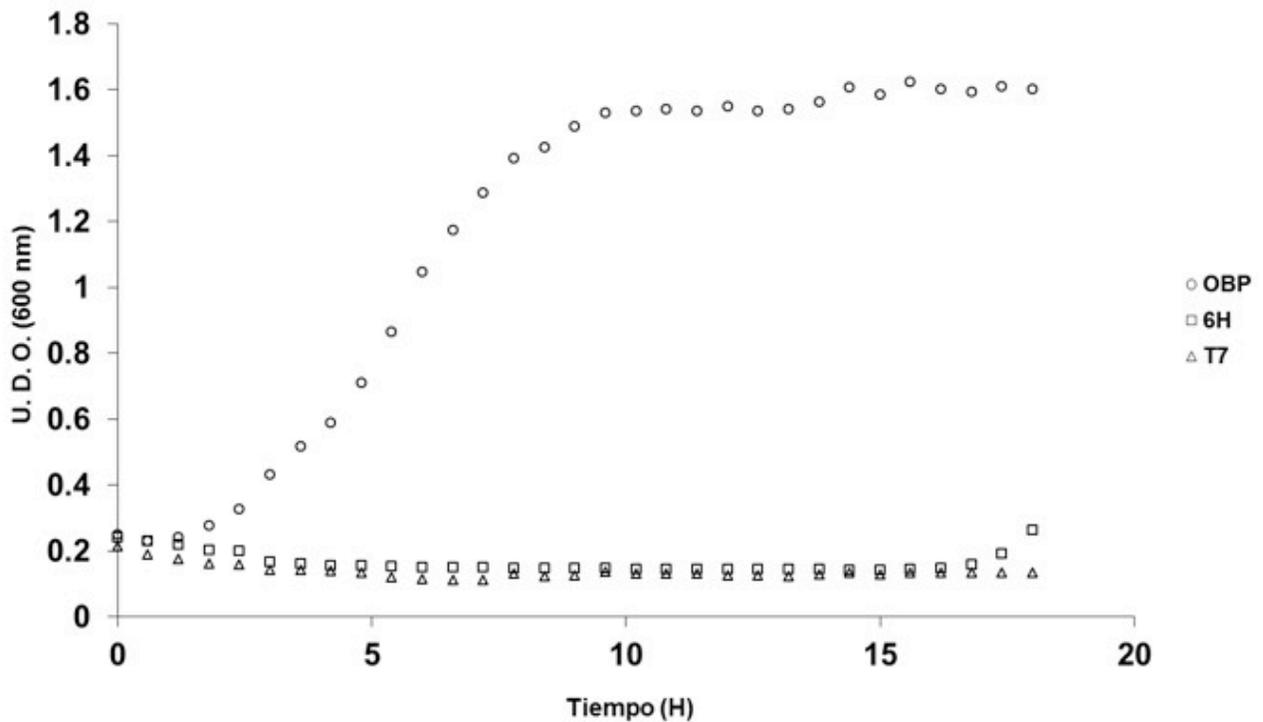


Figura 1.3.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 700 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

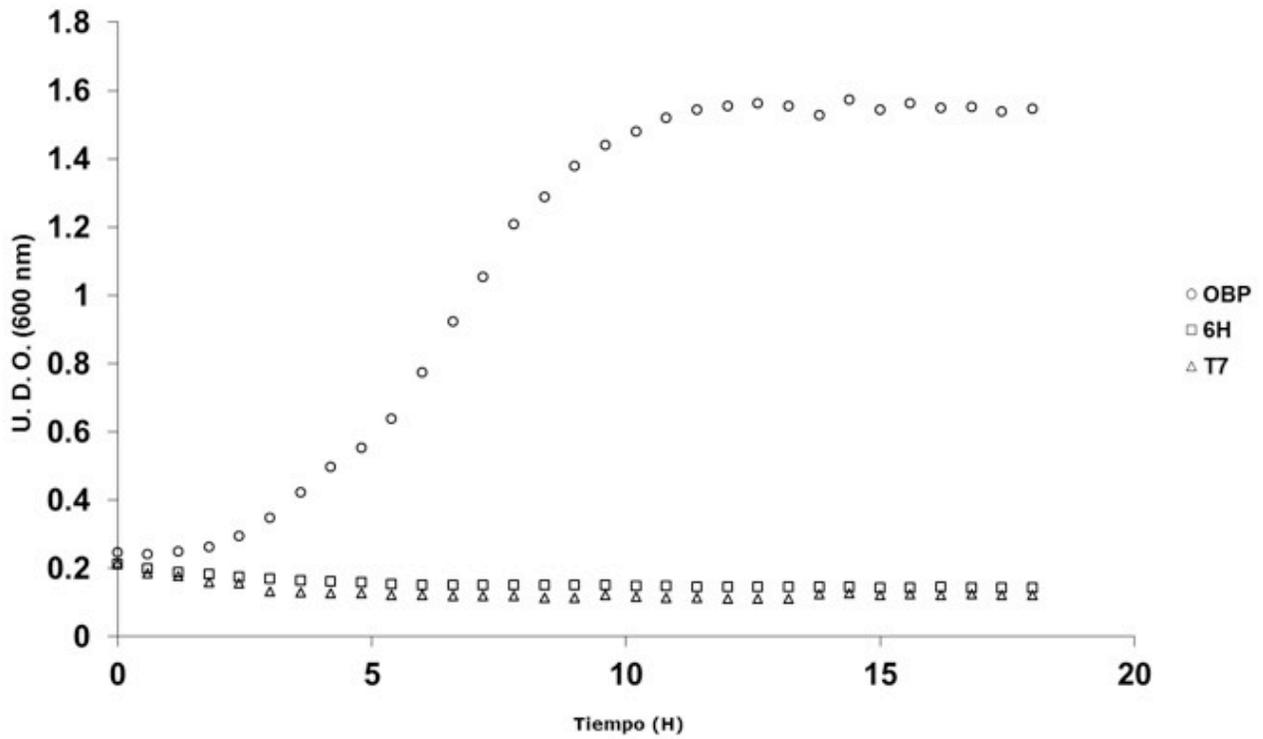


Figura 1.3.8. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 800 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

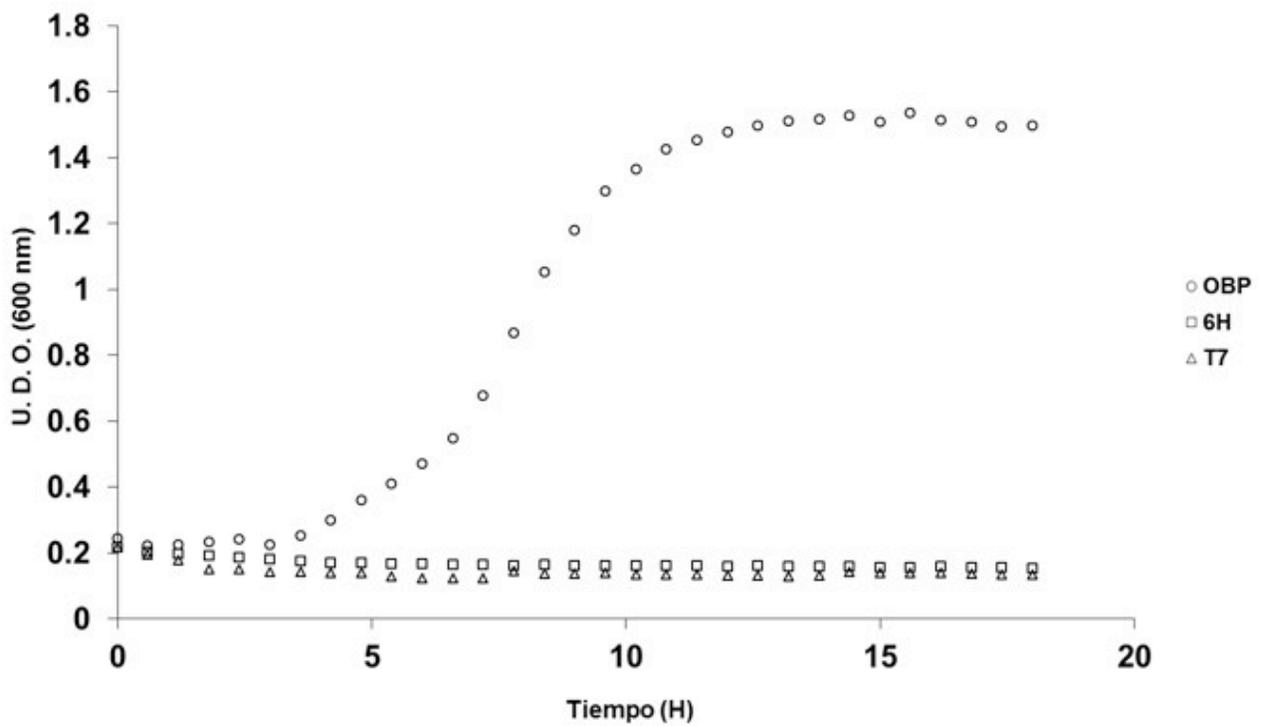


Figura 1.3.9. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 900 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

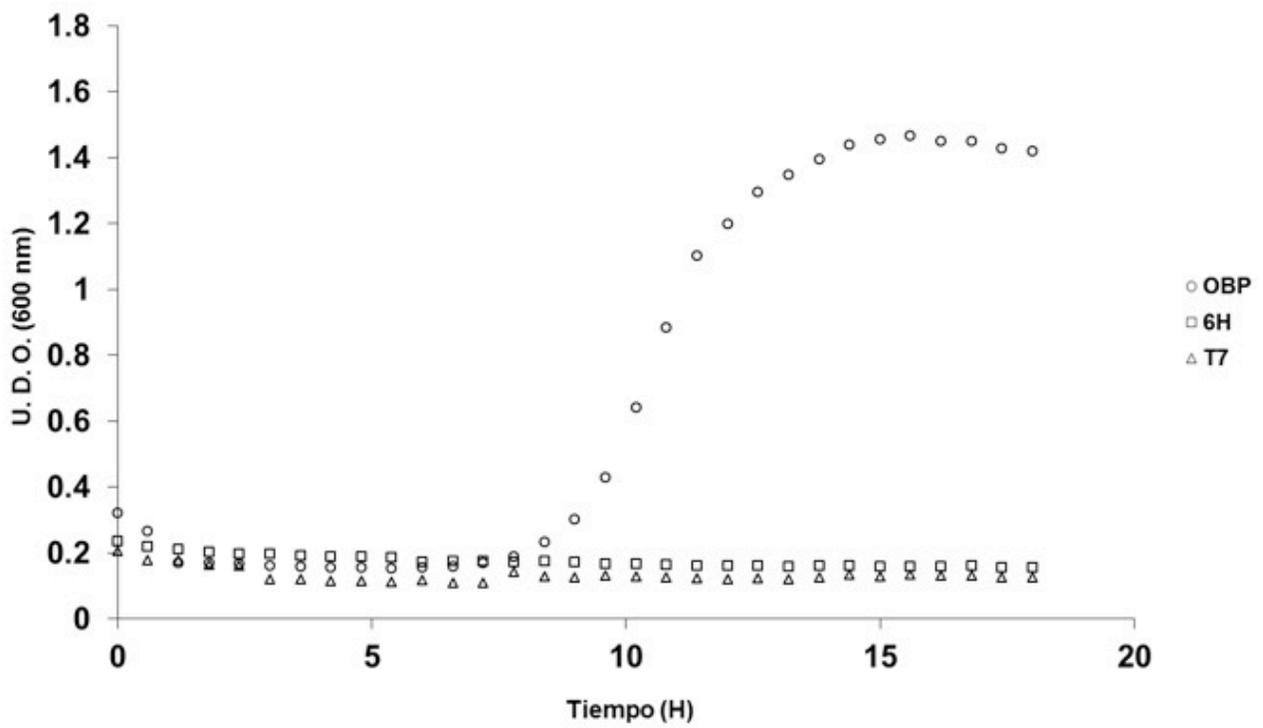


Figura 1.3.10. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Anexo 2

Gráficas realizadas con las bacterias BL21 CodonPlus, transformadas con el plásmido pT7-7, y con las construcciones con el cDNA que codifica para la GCCbOBP (pT7-7\_bOBP) y la que presenta las seis histidinas en el extremo amino terminal 6HGCCbOBP (pT7-7\_6HbOBP), con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG. Las gráficas comparan el comportamiento de las diferentes transformantes en la misma concentración de los diferentes agentes, en el mismo día de experimento. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los diferentes experimentos.

### 2.1 Menadiona

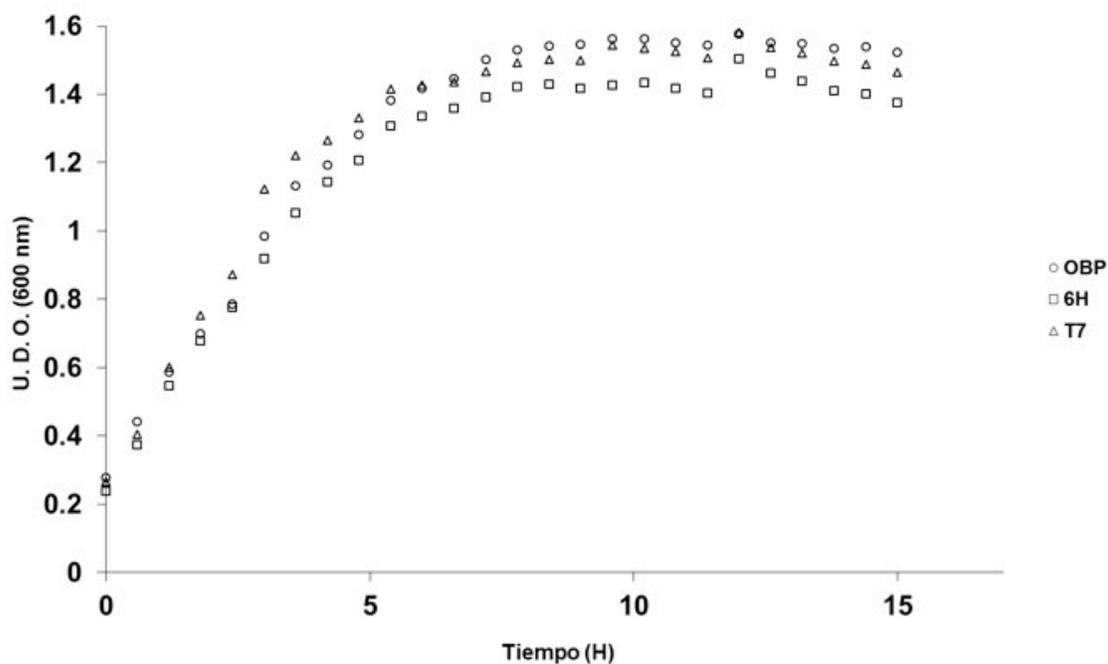


Figura 2.1.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG.

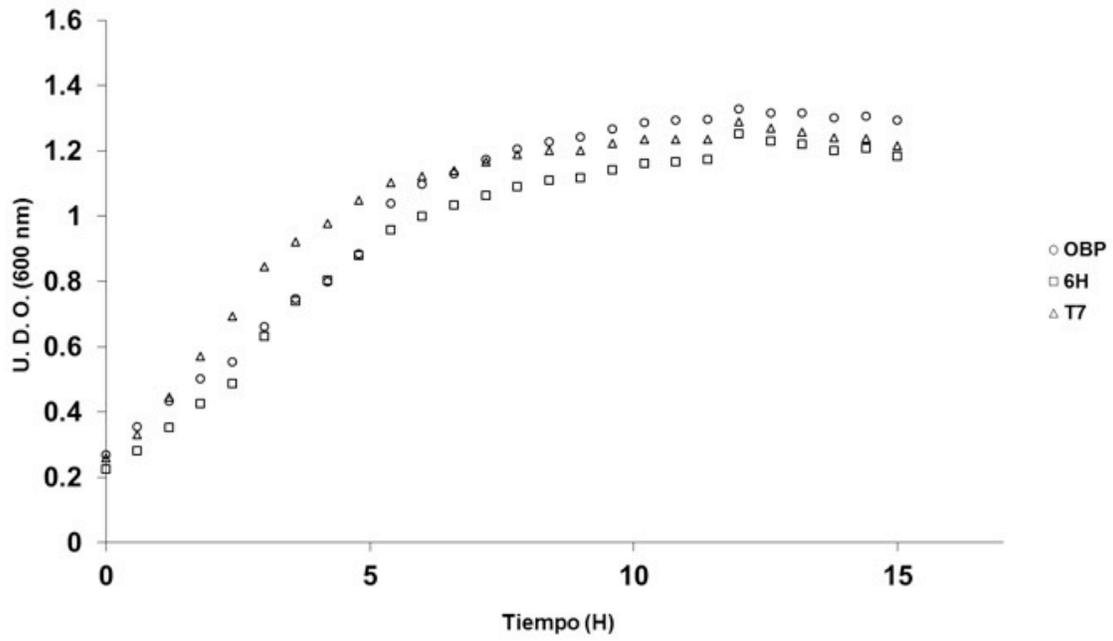


Figura 2.1.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 100  $\mu$ M de Menadiona.

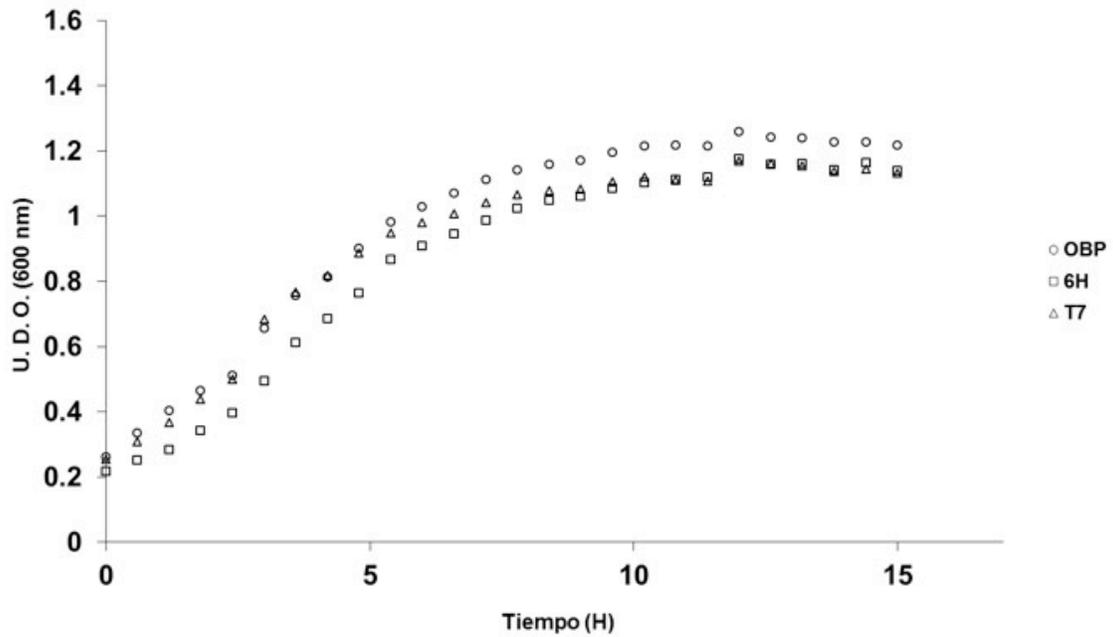


Figura 2.1.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 125  $\mu$ M de Menadiona.

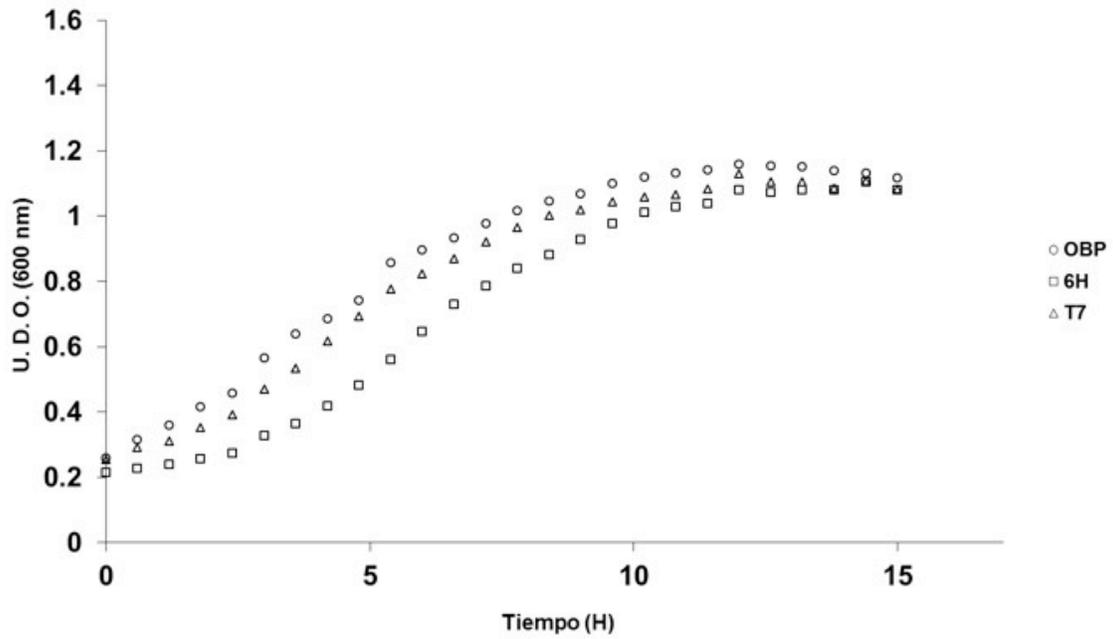


Figura 2.1.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 150 μM de Menadiona.

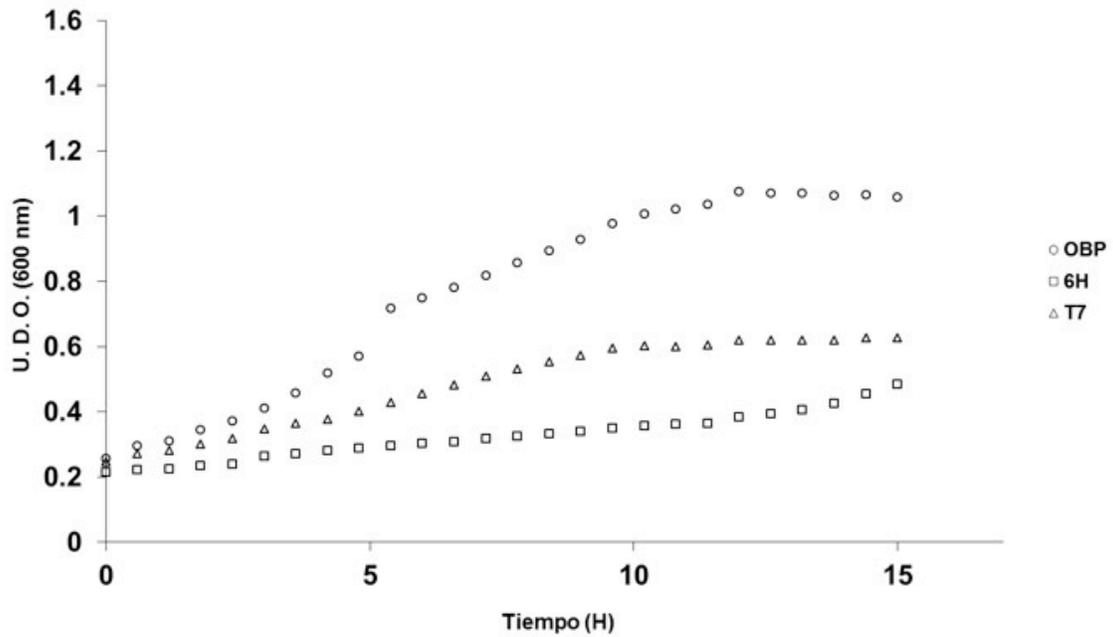


Figura 1.1.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 4 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 175 μM de Menadiona.

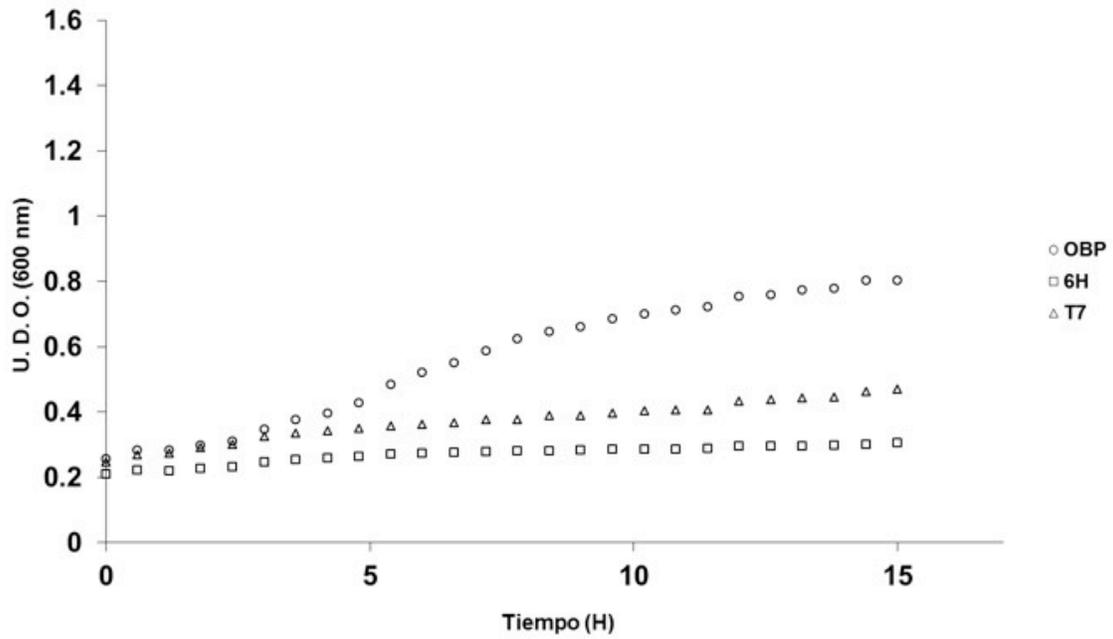


Figura 2.1.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200 μM de Menadiona.

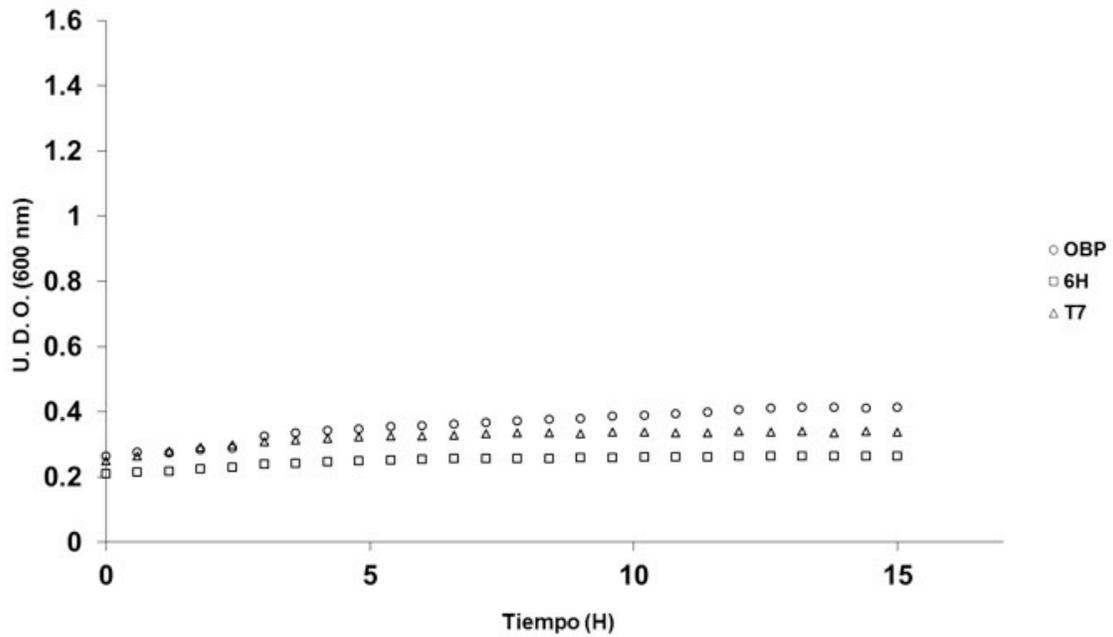


Figura 2.1.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 225 μM de Menadiona.

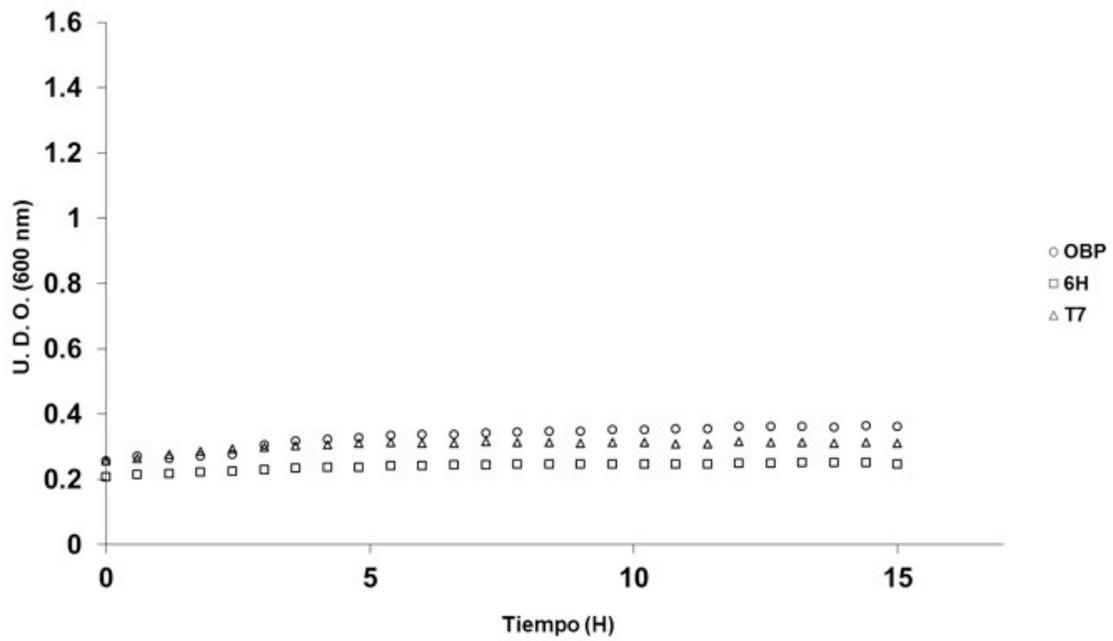


Figura 2.1.8. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 250  $\mu$ M de Menadiona.

## 2.2 *tert*-Butilhidroperóxido

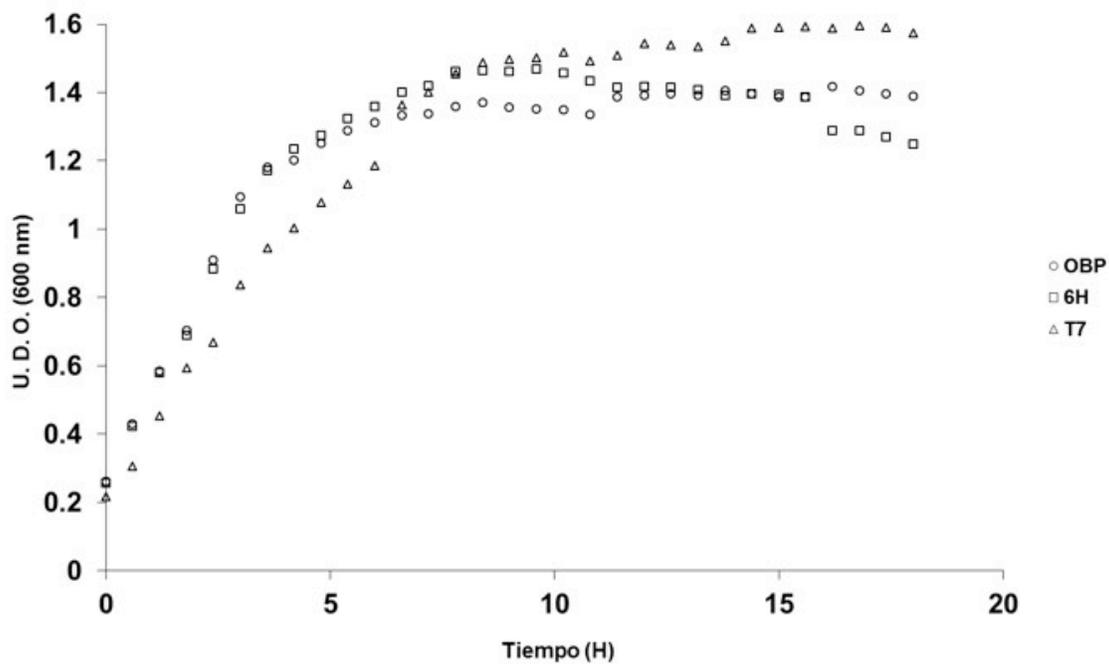


Figura 2.2.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG.

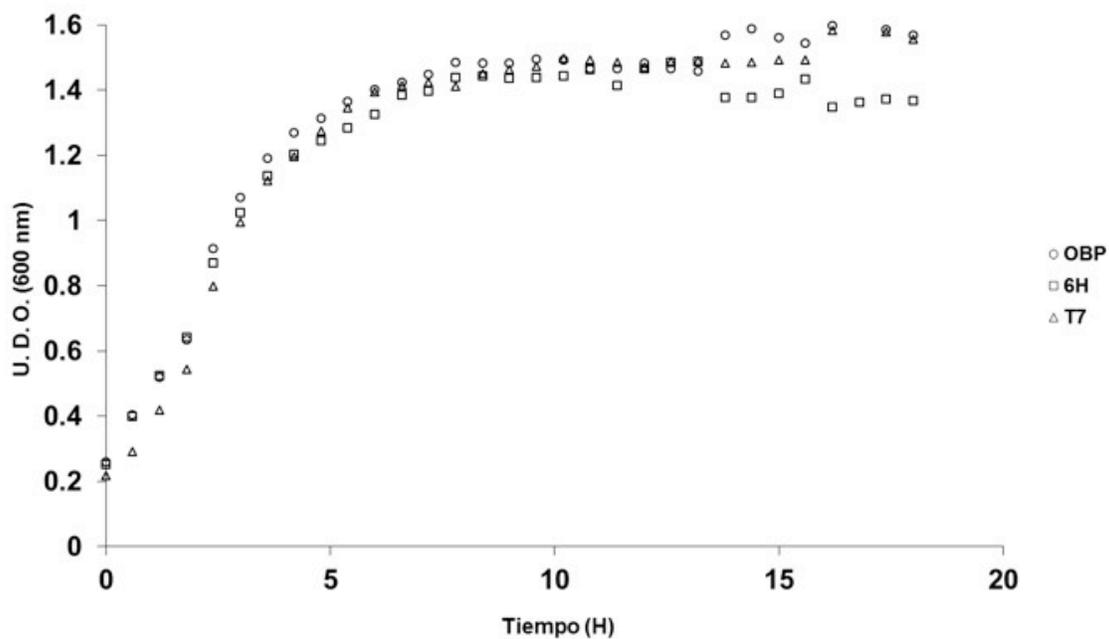


Figura 2.2.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 75 μM de tBuOOH.

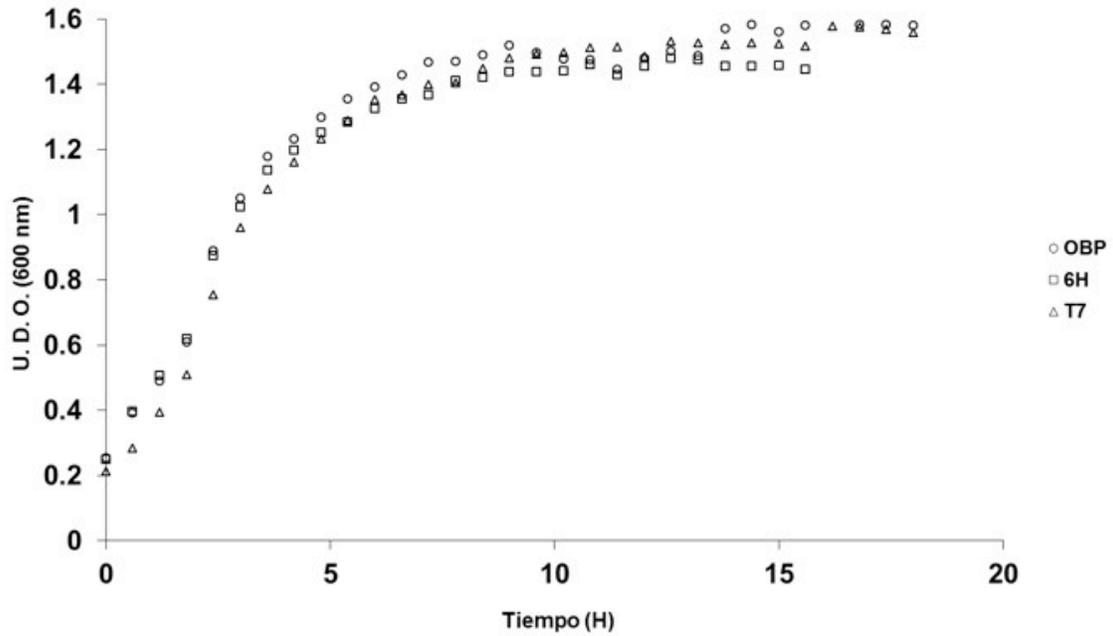


Figura 2.2.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 100  $\mu$ M de tBuOOH.

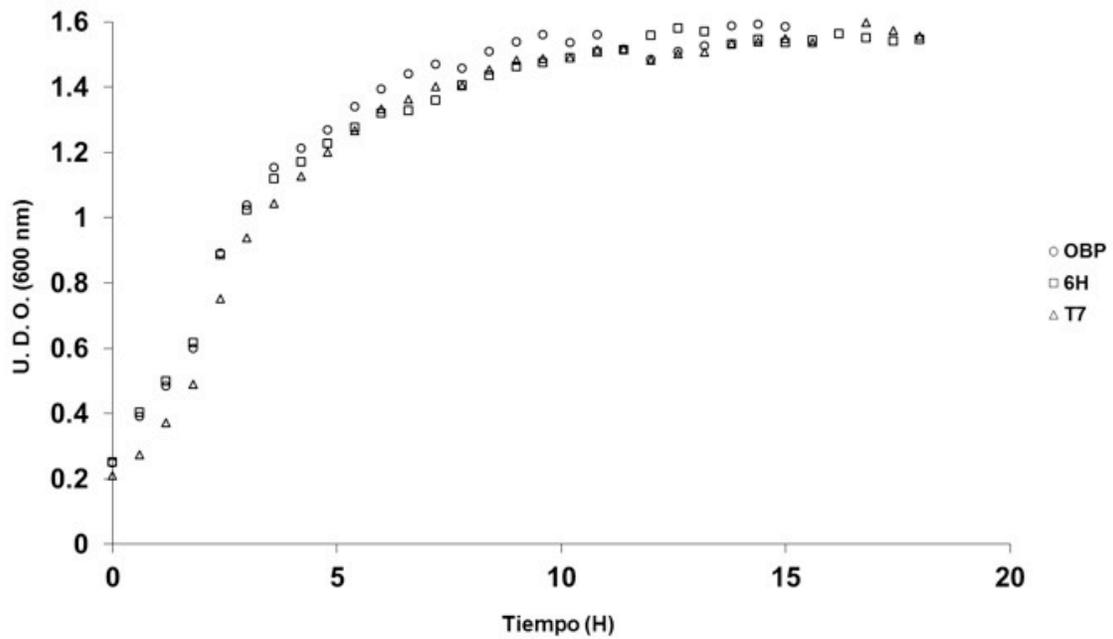


Figura 2.2.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 125  $\mu$ M de tBuOOH.

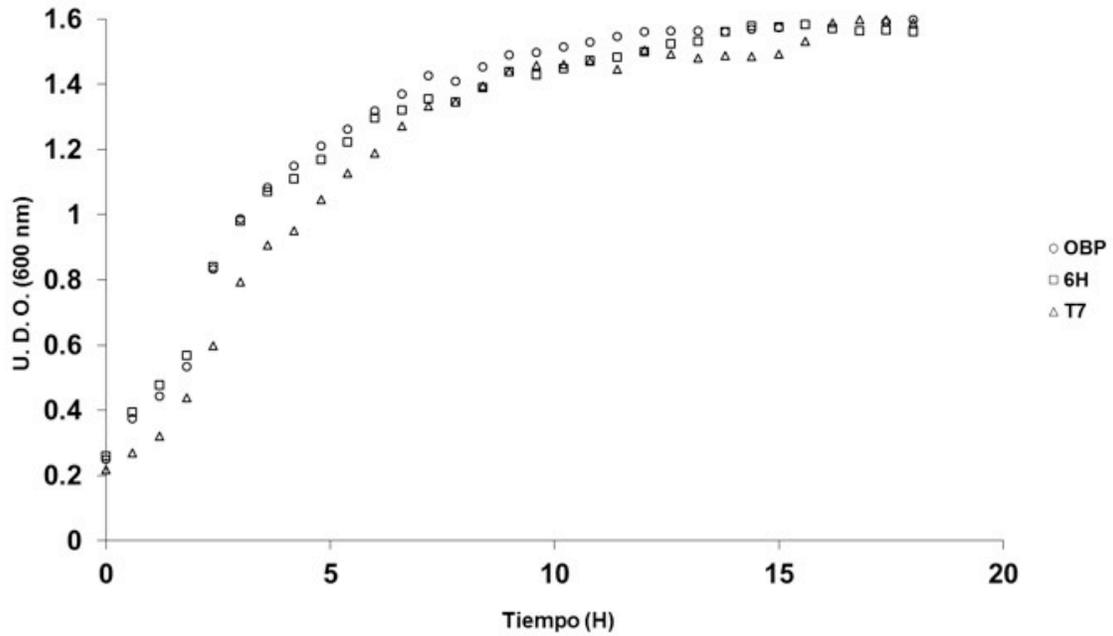


Figura 2.2.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 150  $\mu$ M de tBuOOH.

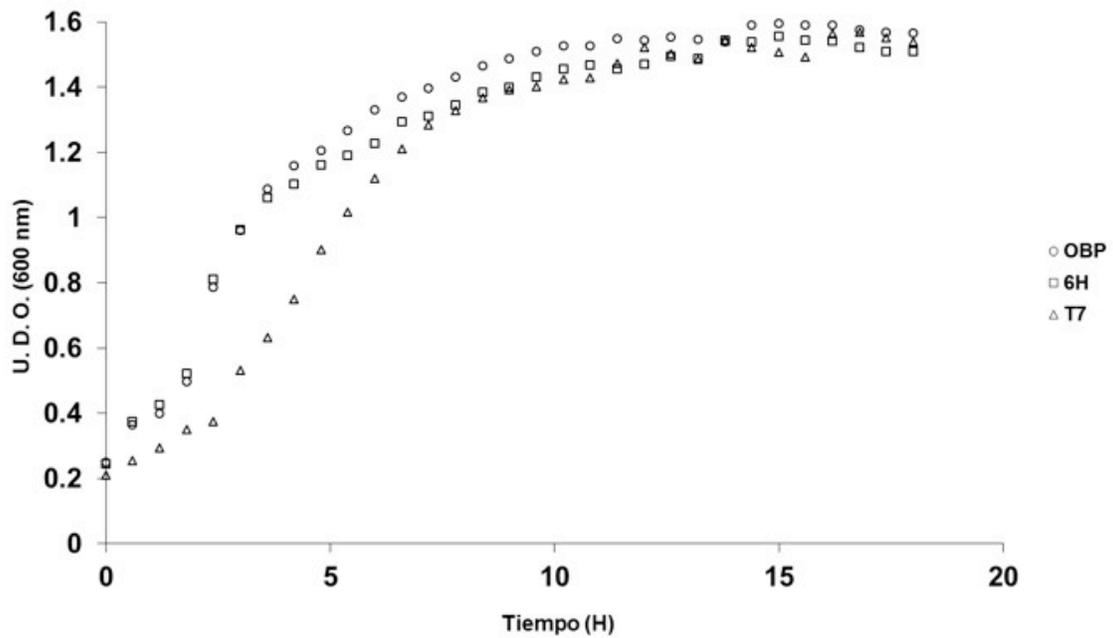


Figura 2.2.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 175  $\mu$ M de tBuOOH.

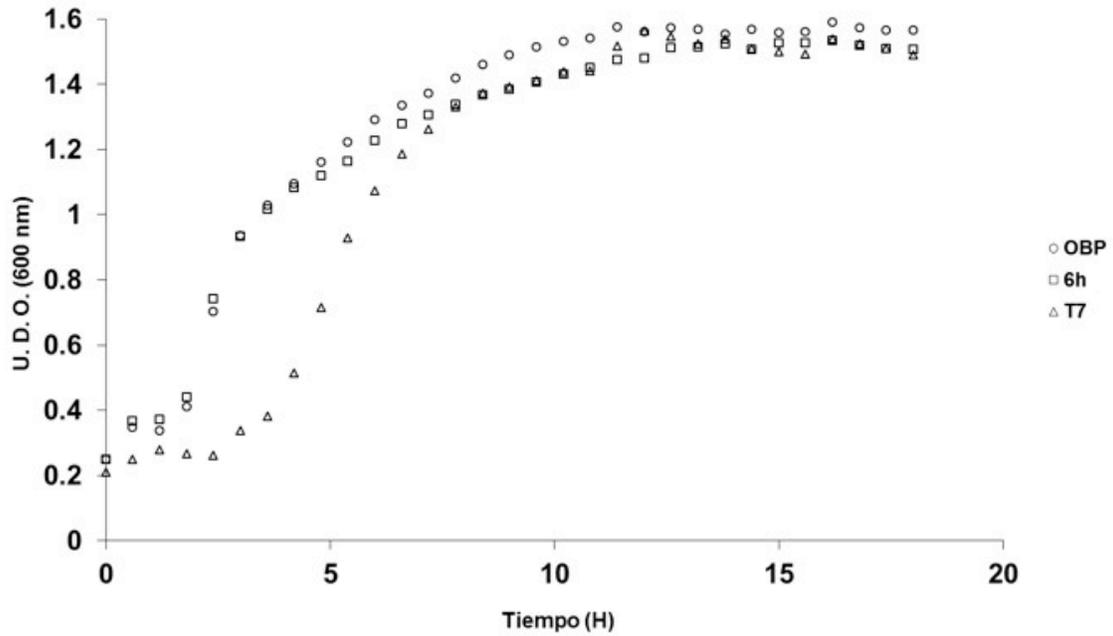


Figura 2.2.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200  $\mu$ M de tBuOOH.

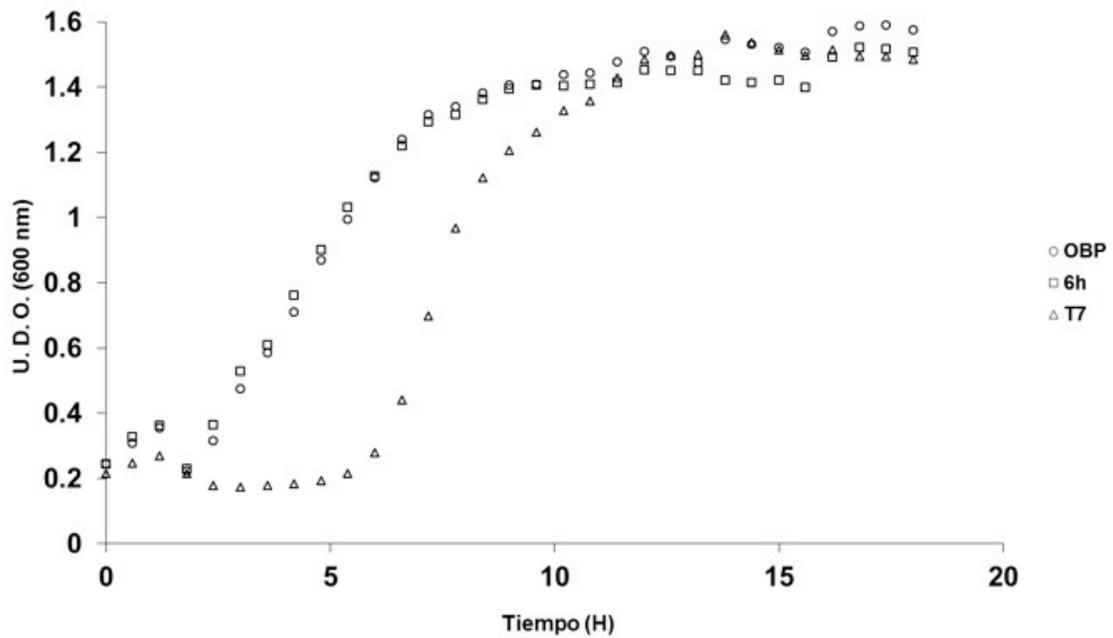


Figura 2.2.8. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 225  $\mu$ M de tBuOOH.

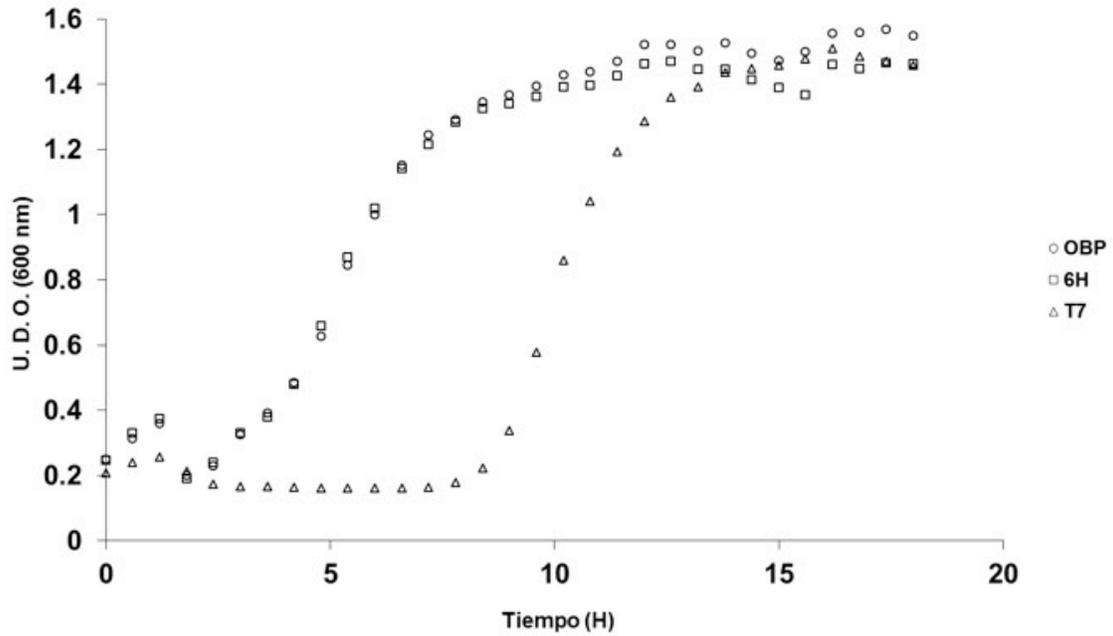


Figura 2.2.9. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 250  $\mu$ M de tBuOOH.

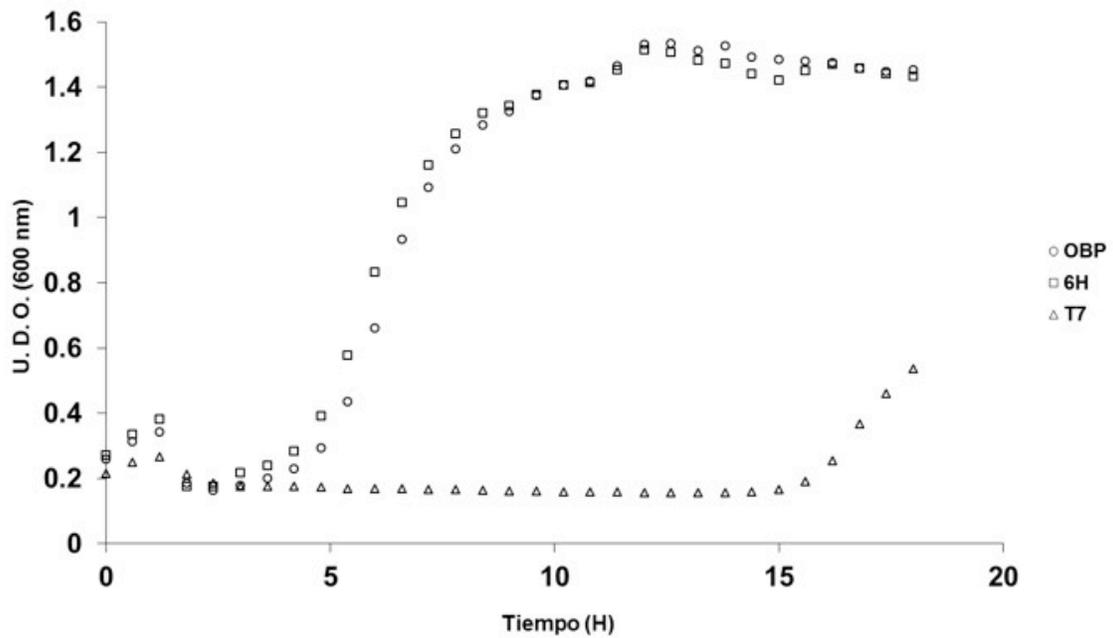


Figura 2.2.10. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 275  $\mu$ M de tBuOOH.

## 2.3 Peróxido de hidrógeno

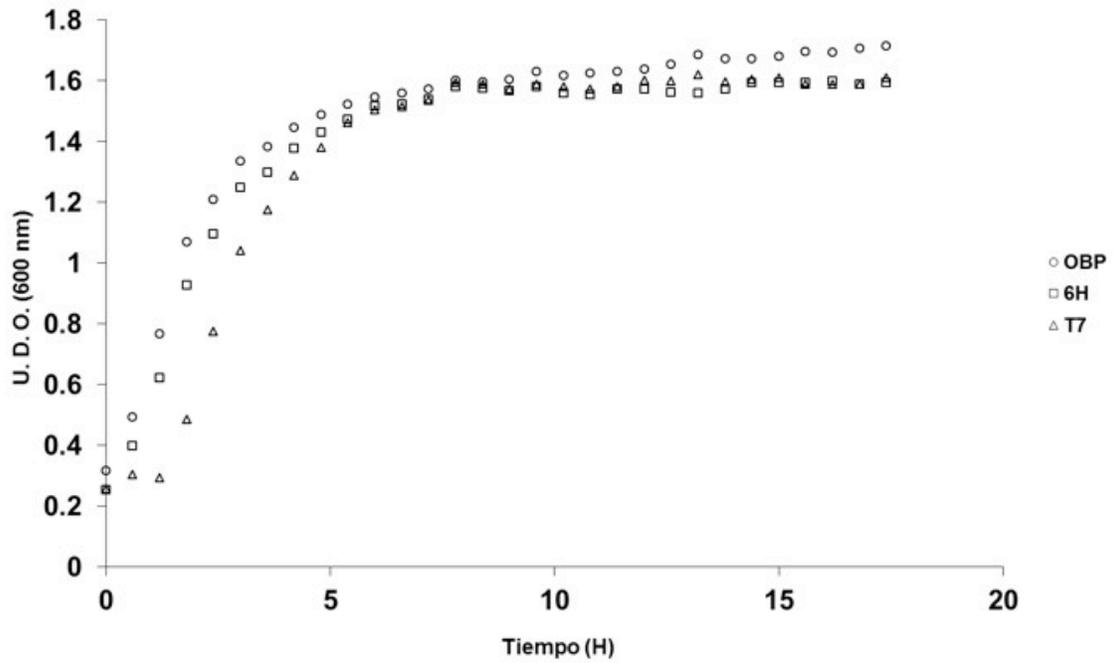


Figura 2.3.1. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG.

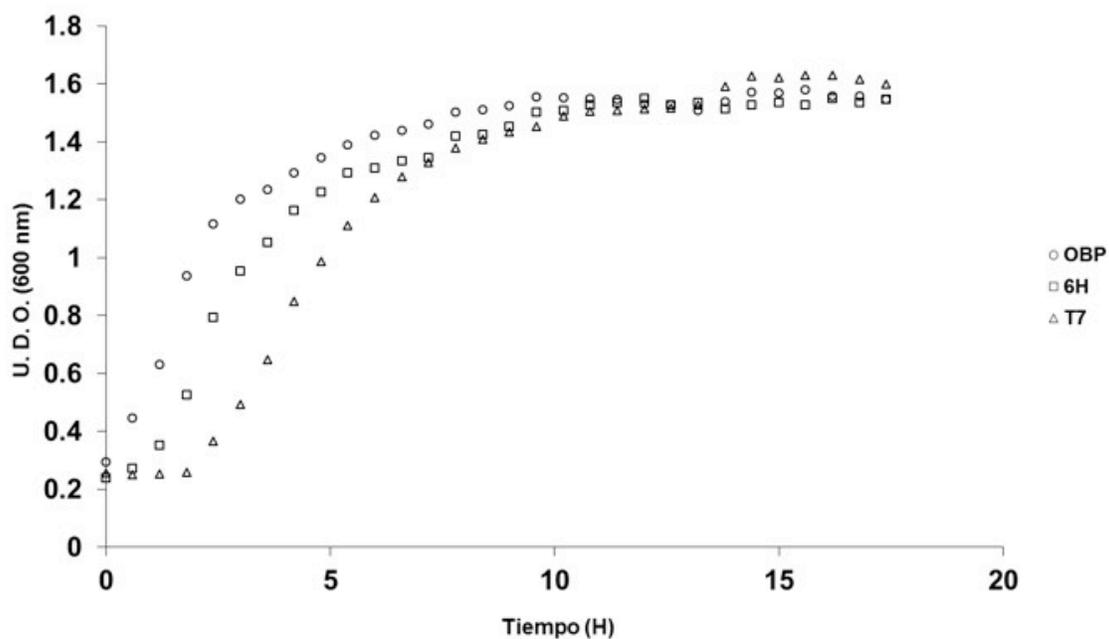


Figura 2.3.2. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

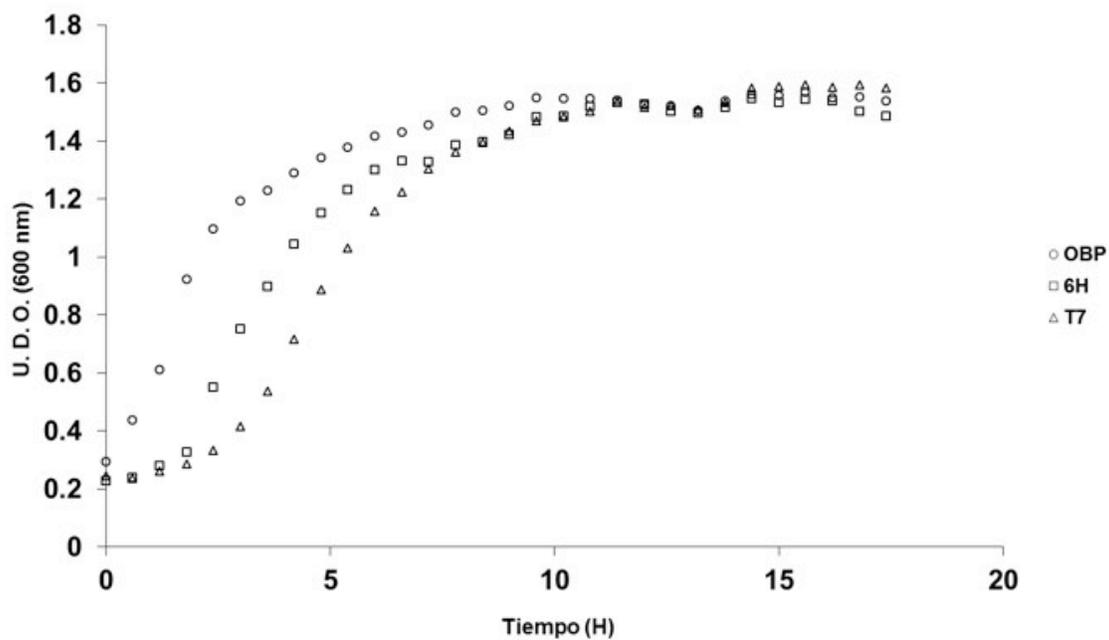


Figura 2.3.3. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

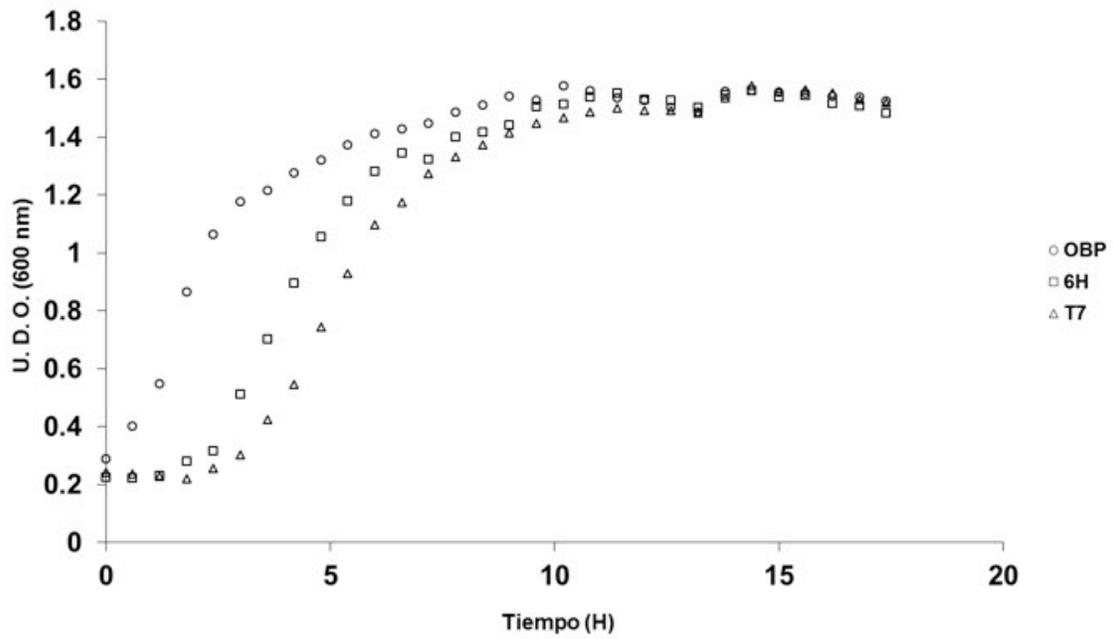


Figura 2.3.4. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

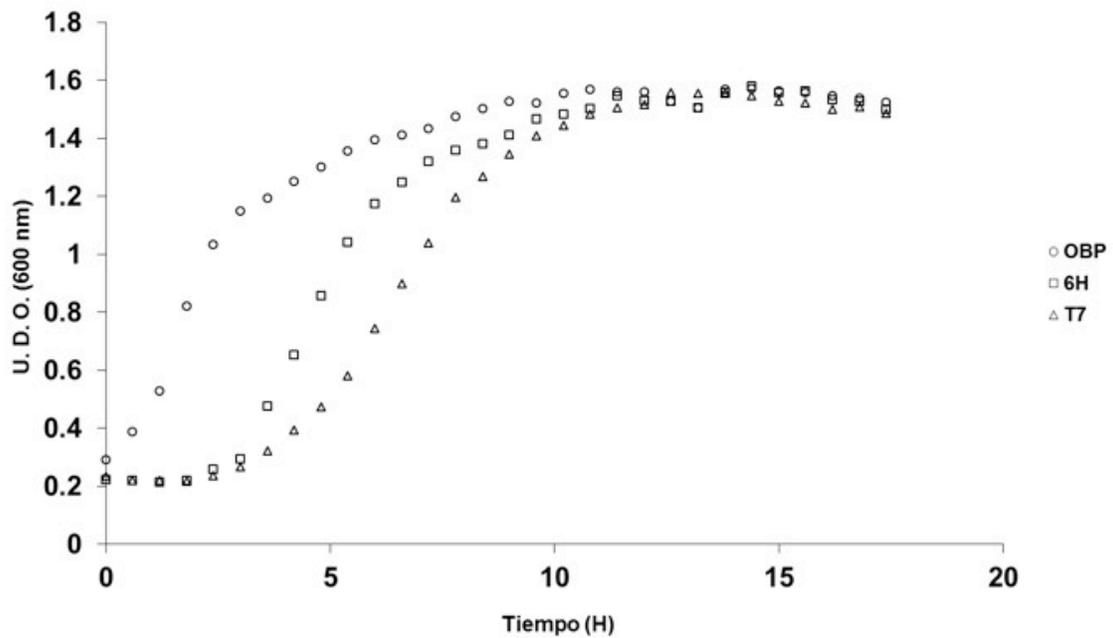


Figura 2.3.5. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

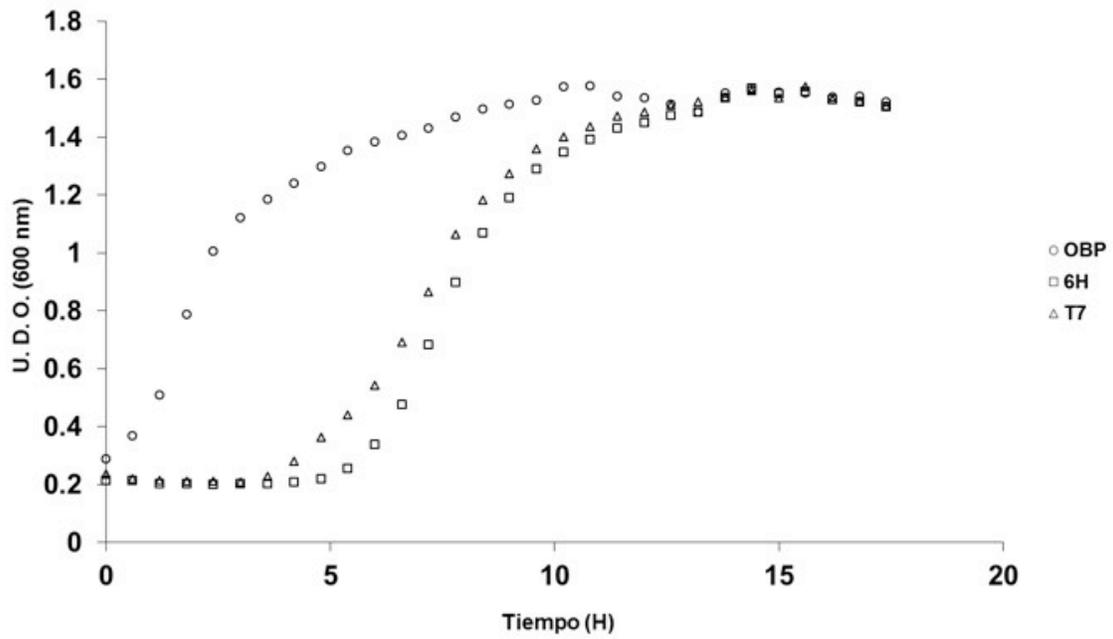


Figura 2.3.6. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 600 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

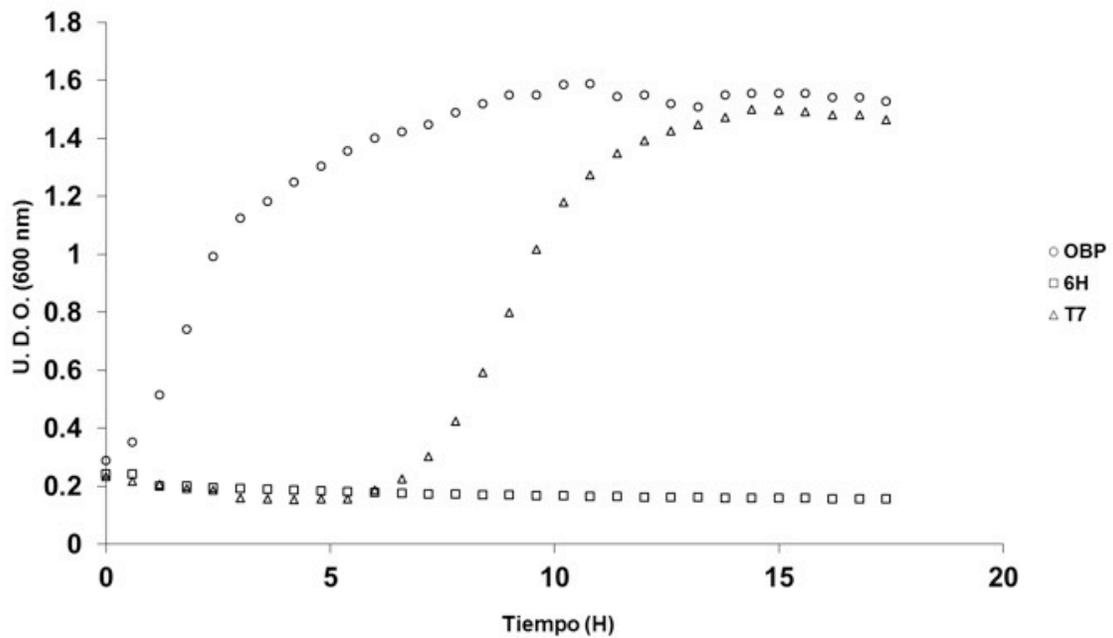


Figura 2.3.7. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 700 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

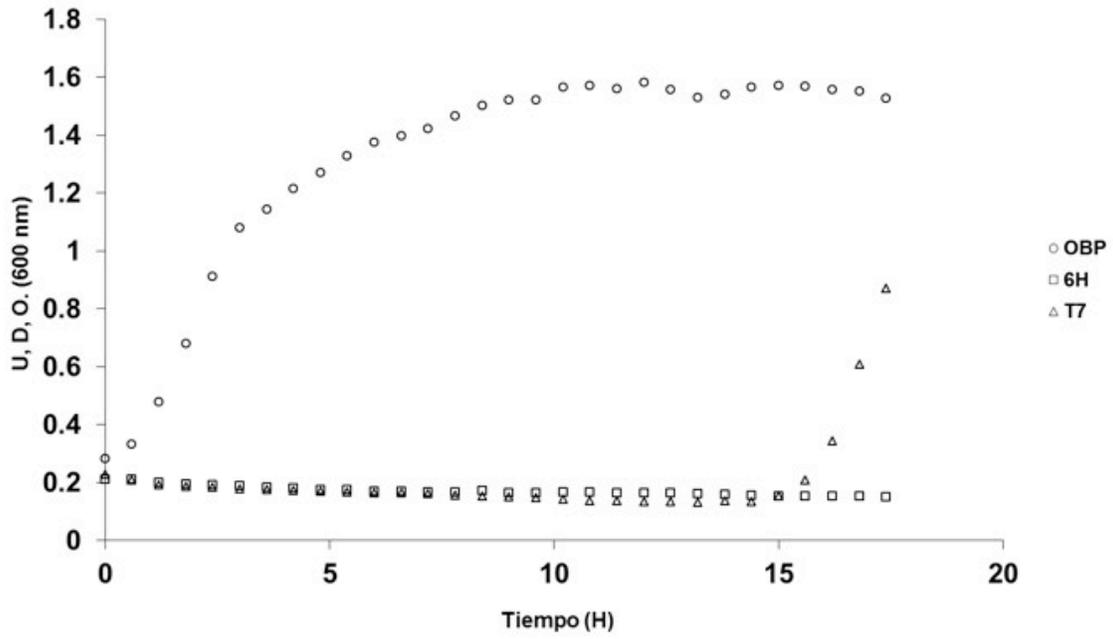


Figura 2.3.8. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 800  $\mu$ M de  $H_2O_2$ .

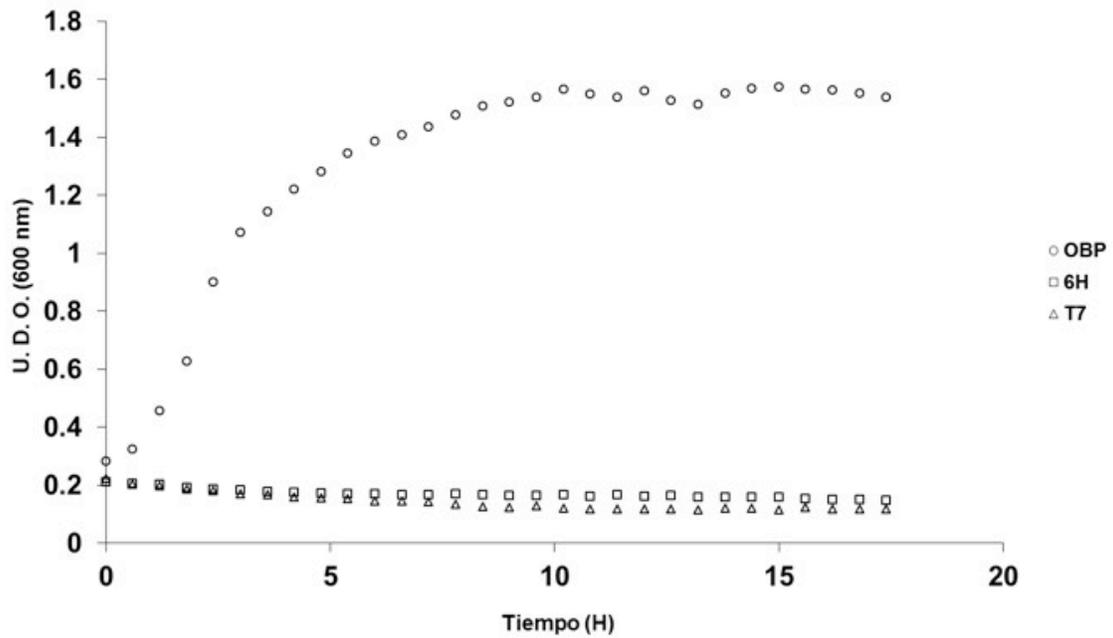


Figura 2.3.9. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 900  $\mu$ M de  $H_2O_2$ .

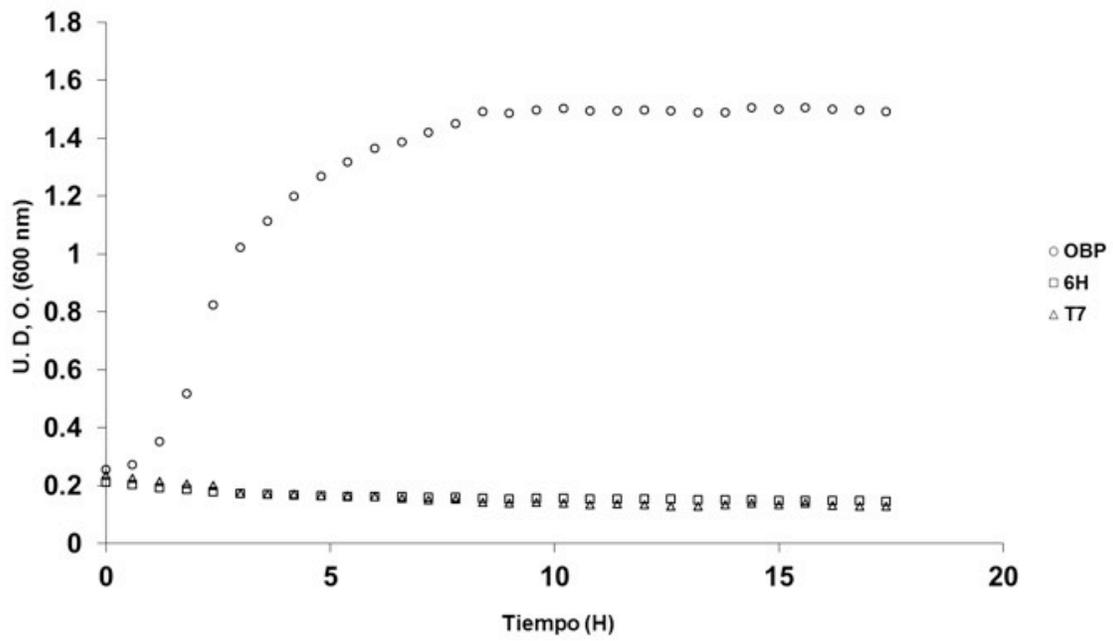


Figura 2.3.10. Las diferentes construcciones con la pre-inducción de 6 horas con 0.1 mM de IPTG con la presencia de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## **ANEXO 3**

### **Expresión heteróloga de la OBP en las mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

Además del estudio en *E. coli*, durante esta tesis se realizaron experimentos preliminares en la levadura, para probar si la sobre-expresión de la OBP en la mitocondria, también podía proteger a las células eucariotas de los daños causados por el estrés oxidativo.

Esta bien establecido que las mitocondrias son los herederos de bacterias ancestrales, que entraron en simbiosis con un arqueón y que desarrollaron una relación simbiótica que trajo beneficios a la nueva célula eucariota. Por esta razón, consideramos que los experimentos realizados en *E. coli*, son particularmente pertinentes para realizar un estudio posterior enfocado a estudiar las mitocondrias de las células eucariotas.

En estas circunstancias, como la OBP es una proteína secretora que ejerce su acción en el exterior de la célula, diseñamos tres cDNA capaces de permitir la importación de la proteína al interior de la mitocondria. Con este fin, combinamos el cDNA de la GCC-bOBP con tres presecuencias de proteínas mitocondriales codificadas en el ADN nuclear. Las construcciones fueron las siguientes:

<b>Nombre del construcción</b>	<b>Presecuencia mitocondrial a la que se asocia con la GCC-bOBP</b>	<b>Compartimiento de la mitocondria en el que está destinado la localización de la GCC-OBP</b>
pCM182-ISP_OBP	alcohol deshidrogenasa isoforma 3 (ADH3)	matriz mitocondrial
pCM182-CYC1_OBP	citocromo c isoforma 1 (CYC1)	espacio intermembranal
pCM182-ISP_OBP	Proteína hierro-azufre (ISP) del complejo III (citocromo c reductasa) con un solo cruce transmembranal	espacio intermembranal

Las construcciones se clonaron en el vector de expresión para levadura PCM182, que fueron utilizadas para transformar células de levadura de tipo W303-1B/50 (Mat $\alpha$  ade2 trp1 ura3 leu2 his3). Las mitocondrias se purificaron mediante el método descrito por Herrmann J. M. *et. al.* (1994), tanto para la cepa transformada con el vector vacío (pCM182) como para las diferentes construcciones (ADH3, CYC1 e ISP). La concentración de proteína se determinó mediante el método modificado de Lowry (Markwell M. A. *et. al.* 1978)

El contenido proteico de las mitocondrias purificadas se analizó mediante geles desnaturizantes al 12.5 % de poliacrilamida, y la presencia de GCC-bOBP fue observada en las inmunorréplicas de tipo Western, utilizando los mismos anticuerpos contra la GCC-OBP producidos en el estudio llevado a cabo en *E. coli*.

## RESULTADOS

Las siguientes figuras muestran la resolución del contenido proteico de las mitocondrias aisladas de *S. cerevisiae*, en geles de poliacrilamida y inmunorrélicas tipo Western de la cepa de levadura W303, transformada con las diferentes construcciones en el plásmido pCM182.

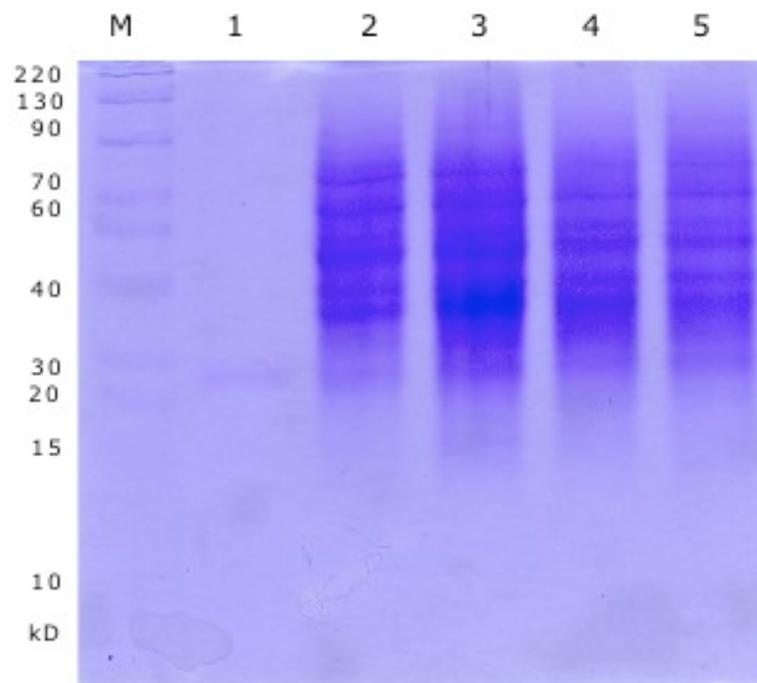


Figura 1. Gel desnaturalizante de poliacrilamida, resolviendo 100 µg de mitocondrias aisladas de las diferentes construcciones. M= Marcado de peso molecular, 1= GCC-bOBP, 2= ADH3, 3=CYC1, 4=ISP y 5=pCM182 (del carril 2 al 5 se cargaron 100µg de proteína).

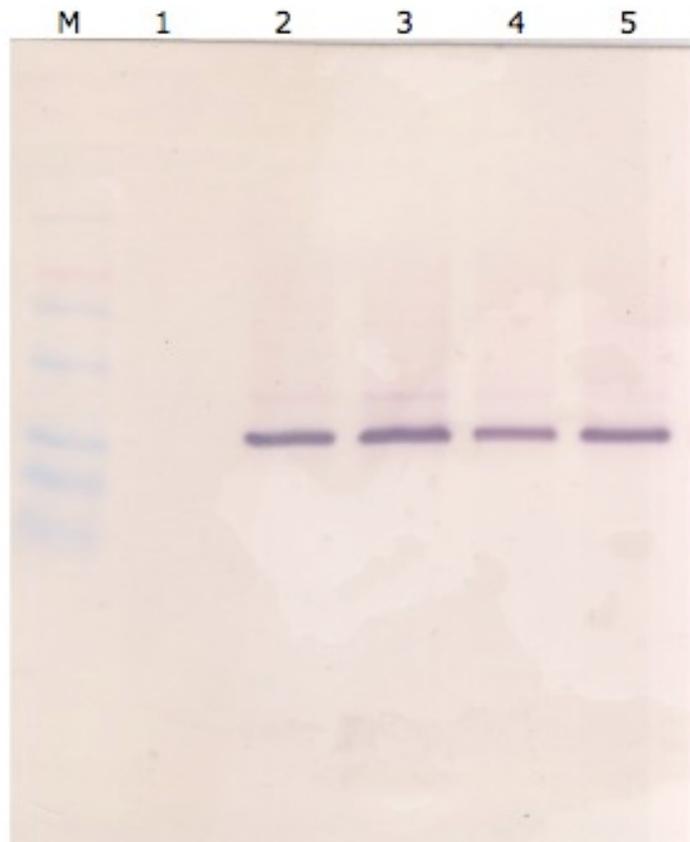


Figura 2. Inmunorréplica tipo Western, la transferencia se realizó a partir del gel que se muestra en la figura 1, con el anticuerpo  $\alpha$ -COXII (Molecular Probes). M= Marcado de peso molecular, 1= GCC-bOBP, 2= ADH3, 3=CYC1, 4=ISP y 5=pCM182.

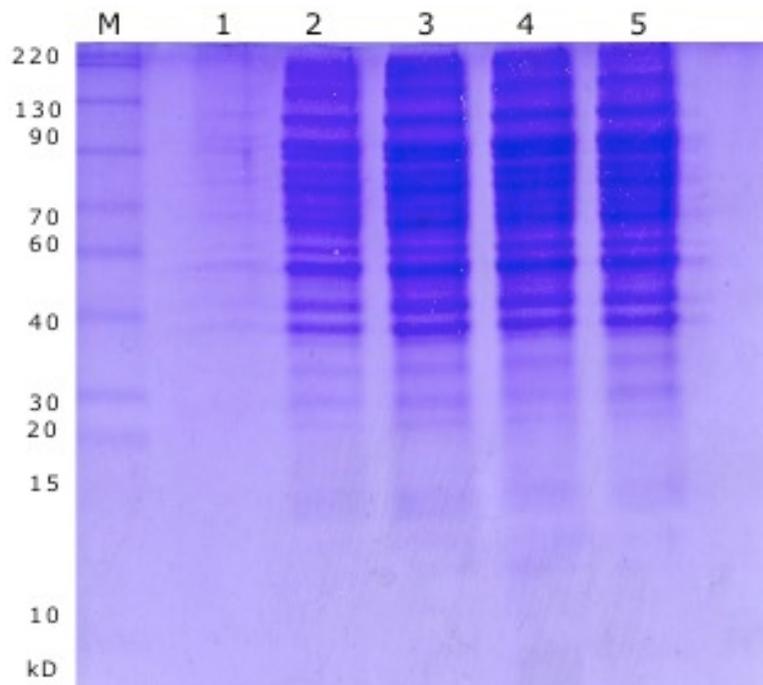


Figura 3. Gel desnaturalizante de poliacrilamida, resolviendo 100  $\mu$ g de mitocondrias aisladas de las diferentes construcciones. M= Marcado de peso molecular, 1= GCC-bOBP, 2= ADH3, 3=CYC1, 4=ISP y 5=pCM182 (del carril 2 al 5 se cargaron 100 $\mu$ g de proteína).

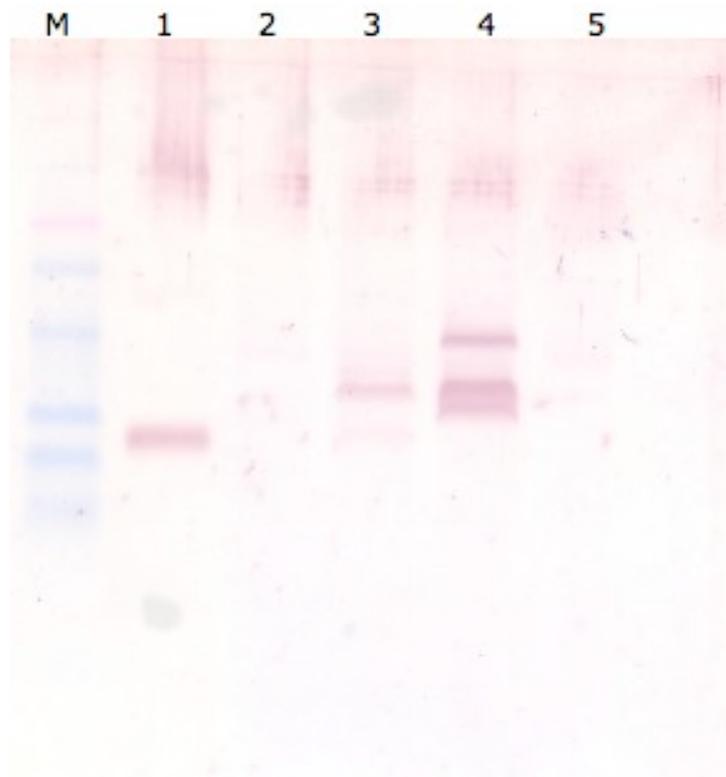


Figura 4. Inmunorréplica tipo Western, la transferencia se realizó a partir del gel que se muestra en la figura 3, con el anticuerpo  $\alpha$ -GCC-bOBP. M= Marcado de peso molecular, 1= GCC-bOBP, 2= ADH3, 3=CYC1, 4=ISP y 5=pCM182.

En ambos geles de poliacrilamida (Figuras 1 y 3) la concentración de acrilamida fue de 12.5 %, en los dos geles en el carril 1 se cargaron 10  $\mu$ g de la proteína GCC-bOBP recombinante. En la Figura 1 del carril 2 al 5 se colocaron 100  $\mu$ g de proteínas mitocondriales y el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se decoró con un anticuerpo  $\alpha$ -COXII (Figura 2), esto se hizo como un control de carga. En la Figura 3 del carril 2 al 5 se cargaron 200  $\mu$ g de proteínas de mitocondrias, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Figura 4) y se utilizó el  $\alpha$ -GCC-bOBP. Como se puede ver en la Figura 4, se pudo detectar la GCC-bOBP recombinante, así como la presencia de dos de las tres construcciones (carriles 3 y 4), una de ellas es la fusión de la OBP con la presecuencia mitocondrial del citocromo c isoforma 1 (CYC1), la cual se observa con un peso molecular mayor a la proteína recombinante. La fusión de la presecuencia mitocondrial con la bOBP, se encuentra en mayor proporción que la bOBP madura; es decir, la forma en la cual ya se procesó el péptido señal. La otra fusión que fue posible detectar fue la que presenta la presecuencia mitocondrial y un cruce transmembranal de la proteína Hierro-Azufre (ISP), que corresponde al péptido con mayor masa molecular. Sin embargo, también se pueden ver dos bandas de proteínas muy juntas, la que tiene un ligero mayor peso molecular corresponde al producto posterior al primer corte de la presecuencia mitocondrial que se lleva a cabo cuando el precursor ingresa a la matriz mitocondrial. La última banda corresponde a la proteína madura, es decir, la bOBP unida al extremo amino terminal del cruce transmembranal de la proteína Hierro-Azufre. No fue posible detectar la presencia de la fusión de la presecuencia mitocondrial de la alcohol deshidrogenasa isoforma 3 (ADH3) con la bOBP. Se esperaba que esta construcción era la que se importaría con mayor facilidad a la mitocondria, pues solamente debe ingresar directamente a la matriz mitocondrial, donde su péptido señal sería procesado.

## ANEXO 4

### ARTÍCULOS PUBLICADOS

Macedo-Márquez A. 2012. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializa en Ciencias Químico-Biológicas*. **15(2)** 97-103.

Macedo-Márquez, Alain; Vázquez-Acevedo, Miriam; Ongay-Larios, Laura; Miranda-Astudillo, Héctor; Hernández-Muñoz, Rolando; González-Halphen, Diego; Grolli, Stefano; Ramoni, Roberto. 2014. Overexpression of a monomeric form of the bovine Odorant-Binding Protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress. *Free Radic. Res.* 48(7) 814-22

## LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs) EN LAS MITOCONDRIAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Alain Macedo-Márquez**

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,  
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 70-243,  
C.P. 04510, Coyoacán, México, D.F. E-mail: amacedo@email.ifc.unam.mx

### RESUMEN

La mitocondria es el principal productor de especies reactivas de oxígeno durante los procesos normales oxidativos del metabolismo, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones. De particular interés, *Saccharomyces cerevisiae* no cuenta con el complejo I y en su lugar se encuentran tres deshidrogenasas alternas; sin embargo, sí contiene los complejos clásicos II, III y IV. Los últimos dos complejos (III y IV) bombean protones al espacio intermembrana para generar un gradiente electroquímico, el cual es utilizado por la ATP sintetasa para la formación de ATP.

Las deshidrogenasas alternas que se encuentran expuestas hacia el espacio intermembrana y el complejo III, son los componentes principales que generan los radicales superóxido. Para transformar el ión superóxido en un compuesto menos nocivo, la mitocondria contiene enzimas encargadas de convertirlo en moléculas menos reactivas.

**Palabras Clave:** EROs, mitocondrias, *Saccharomyces cerevisiae*, transporte de electrones.

### ABSTRACT

Mitochondria are the main producers of reactive oxygen species during the normal processes of oxidative metabolism, mainly through oxidation-reduction reactions occurring in the electron transfer complexes and having oxygen as the last electron acceptor. *Saccharomyces cerevisiae* lacks complex I, but has three alternative dehydrogenases, and the classic complexes II, III and IV. The latter two complexes (III and IV) pump protons towards the intermembrane space to generate an electrochemical gradient, which is used by the ATP synthase to synthesize ATP.

The alternative dehydrogenases that are exposed to the intermembrane space and complex III are the main components that generate superoxide radicals. To transform the superoxide ion into a less noxious compound, mitochondria contain enzymes that convert them into less reactive molecules.

**Key Words:** ROS, mitochondria, *Saccharomyces cerevisiae*, electron transport.

### ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

**E**l oxígeno molecular ( $O_2$ ) es uno de los gases más importantes de la Tierra, constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Por lo mismo, la mayor parte de los seres vivos utilizan el oxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs),

como el superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $OH\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales ( $O_2$  singulete y doblete). Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de EROs.

Las EROs regulan varios procesos celulares, en el caso de mamíferos son la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de

iones, por citar algunos<sup>1</sup>. Sin embargo, las EROs también resultan nocivas para los organismos cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular. Así, el estrés oxidativo generado por la sobreproducción de EROs está asociado al envejecimiento y patologías como la obesidad y la diabetes tipo 2, entre otras<sup>2</sup>. La molécula de oxígeno es un birradical libre, es decir, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital  $\pi$  de antiunión ( $\pi^*$ ) (Fig. 1).

En la molécula de oxígeno, los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el  $O_2$  oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro contrario o aceptar un solo electrón a la vez (limitación del giro o "spin"). Si un solo electrón se adiciona al  $O_2$ , éste se localizará en uno de los orbitales  $\pi^*$  de antiunión y el producto será el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido, el cual se protona rápidamente en el ambiente celular para producir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )<sup>3</sup>. El  $H_2O_2$ , producto de la dismutación del superóxido, puede cruzar las membranas biológicas y aunque es relativamente poco reactivo, a partir de éste y en presencia de metales de transición reducidos, la reducción parcial del peróxido genera el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), uno de los oxidantes más fuertes de la naturaleza<sup>4</sup>. Cuando el metal involucrado es el  $Fe^{2+}$ , la reacción es conocida como reacción de Fenton<sup>5</sup> (Fig. 2). En los sistemas vivos la reacción que genera radicales hidroxilos además de la reacción de Fenton, es conocida como la reacción de Haber-Weiss<sup>6</sup> (Fig. 2), en la cual en presencia de superóxido y peróxido de hidrógeno se generan más radicales hidroxilo<sup>7</sup>.

Es importante notar que las EROs son un término amplio usado para describir todos los intermediarios reactivos del oxígeno que incluyen oxirradicales (singuletes y dobletes) y no radicales ( $H_2O_2$ ). Los oxirradicales son dañinos cuando se producen en grandes cantidades porque indiscriminadamente pueden reaccionar con biomoléculas. Los principales objetivos para la oxidación por EROs son los dobles enlaces en los lípidos, los residuos de cisteína y metionina en las proteínas y la posición C8 en la desoxiguanosina (existen muchos otros objetivos, pero estos parecen ser los más comunes)<sup>8</sup>.

### LA COMPOSICIÓN DE COMPLEJOS ACARREADORES DE ELECTRONES EN LA MITOCONDRIA DE *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras presentan diferentes complejos enzimáticos encargados de las reacciones de transporte de electrones (Fig. 3), aunque no todos ellos son similares a los de bovino o humano.

*S. cerevisiae*, carece del complejo I, en su lugar contiene tres deshidrogenasas alternas insensibles a rotenona y que están asociadas a la membrana interna, una expuesta hacia la matriz mitocondrial (Ndi1) y las dos restantes expuestas hacia el espacio intermembrana (Nde1 y Nde2). Cabe mencionar que ninguna de estas deshidrogenasas bombea protones al espacio intermembrana, por lo cual no contribuyen a la generación del gradiente electroquímico en la mitocondria<sup>9</sup>.

El complejo II o succinato deshidrogenasa es responsable de oxidar el succinato producido en el ciclo de los ácidos

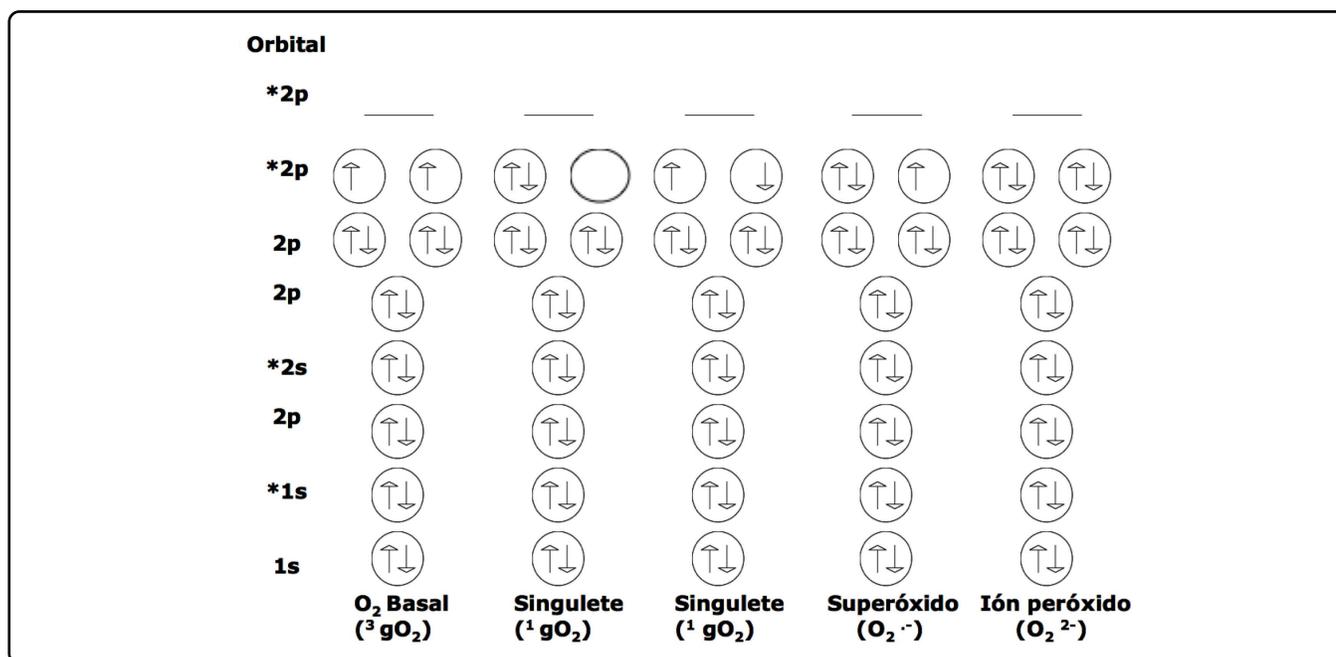


Figura 1. Estructura electrónica del  $O_2$  y de las diferentes especies reactivas de oxígeno.

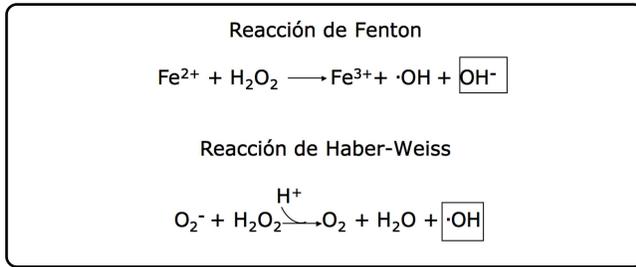


Figura 2. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las cuales se producen el radical hidroxilo.

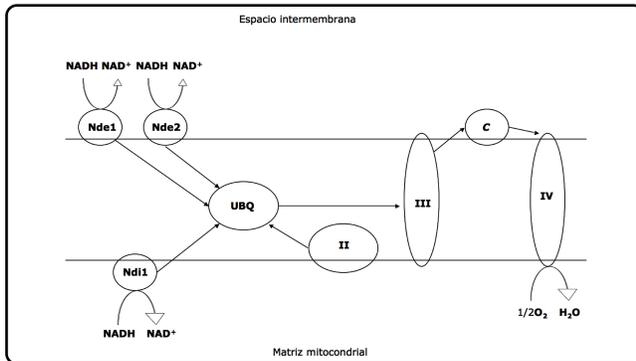


Figura 3. Composición de la cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae*, con la flecha (→) se indica el flujo de electrones a través de los complejos. Ndi1, Nde1 y Nde2 (deshidrogenasas alternas); UBQ (ubiquinona); complejos II, III y IV; C (citocromo c).

tricarboxílicos, para formar fumarato vía  $\text{FADH}_2^{10}$ . Al igual que las deshidrogenasas alternas presentes en *S. cerevisiae*, el complejo II no bombea protones y converge en transferir los electrones a la ubiquinona<sup>11</sup>. El ubiquinol a su vez se dirige hacia el complejo III o ubiquinol: citocromo *c* oxidoreductasa, en donde cede los electrones para reducir al citocromo *c*, con ello se bombean protones al espacio intermembrana. El citocromo *c* es oxidado por el complejo IV o citocromo *c* oxidasa, quien cataliza la transferencia de los electrones al oxígeno, acoplado la traslocación de protones a través de la membrana<sup>12</sup>.

**LOS COMPLEJOS QUE GENERAN ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LAS MITOCONDRIAS DE *S. cerevisiae***

Si bien es necesario el paso de los electrones a través de los complejos enzimáticos en la membrana para la generación de un gradiente electroquímico de protones y, por tanto, para producir energía, un efecto indeseado de las reacciones redox que ocurren en la mitocondria es la generación de especies reactivas de oxígeno (Figura 4).

En mitocondrias aisladas, el superóxido se puede generar en varios sitios en los complejos I y III<sup>13-15</sup>, en las deshidrogenasas de glicerol 3-fosfato, 2-oxaglutarato y piruvato y, probablemente, también en el complejo II. Sin embargo, los principales productores son complejo I y el III de la cadena transportadora de  $e^-$ .

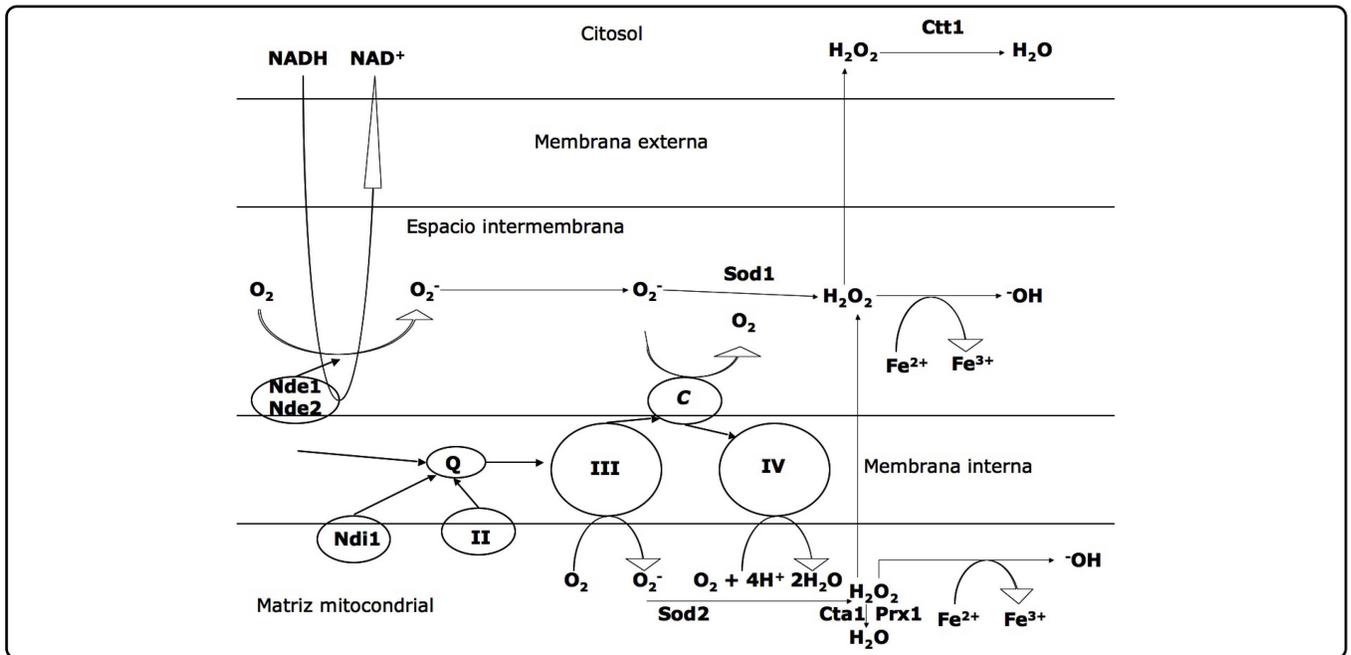


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de generación de especies reactivas de oxígeno y las enzimas que participan en la detoxificación en la mitocondria de *S. cerevisiae*. Ndi1, Nde1 y Nde2 (deshidrogenasas alternas); Q, (ubiquinona); complejos II, III y IV; cyt c (citocromo c); Prx1 (peroxiredoxina); Ctt1 y Cta1 (catalasas); Sod1 y Sod2 (superóxido dismutasas).

En *S. cerevisiae*, las deshidrogenasas alternas que miran hacia el espacio intermembrana son las que probablemente promueven la generación de superóxido en lugar del complejo I<sup>16</sup> (Fig. 3). En este sentido, se ha demostrado que mitocondrias de *Neurospora crassa*, mutantes en Nde1 y Nde2, muestran un decremento importante en la generación de EROs<sup>17</sup>. Esto sugiere que las deshidrogenasas podrían ser una fuente significativa de EROs en organismos que presentan cadenas transportadoras de electrones alternativas como la de *N. crassa*<sup>17</sup>.

La generación de superóxido en el complejo III se lleva a cabo a través del ciclo Q (Fig. 4), el cual acopla la transferencia de electrones de la ubiquinona (Fig. 5) al citocromo *c* con la translocación de protones.

El ciclo comienza cuando los electrones acarreados por las deshidrogenasas alternas y el complejo II son cedidos a la ubiquinona (Q), que al recibir dos electrones y dos protones se convierte en ubiquinol (QH<sub>2</sub>), el cual se dirige al centro Q<sub>o</sub> que está próximo al espacio intermembrana, en donde el complejo III transloca protones (2H<sup>+</sup>) y el ubiquinol cede un electrón a la proteína Hierro-Azufre para transformarse en semi-ubiquinona (un estado intermediario), que a su vez cede un electrón que pasa al citocromo *c*<sub>1</sub> y después al citocromo *c*, y finalmente al complejo IV. El electrón que porta la semi-quinona es cedido (para transformarse en ubiquinona) al citocromo *b* en donde pasa por dos grupos hemo (*b<sub>L</sub>* y *b<sub>H</sub>*), hasta el sitio Q<sub>i</sub> que está próximo a la matriz mitocondrial. Ahí se concentra una ubiquinona, la cual al recibir dos protones y dos electrones acumulados a partir de los que son transportados por las deshidrogenasas alternas y el complejo II, vuelve a iniciar de nuevo el ciclo Q<sup>18-20</sup>.

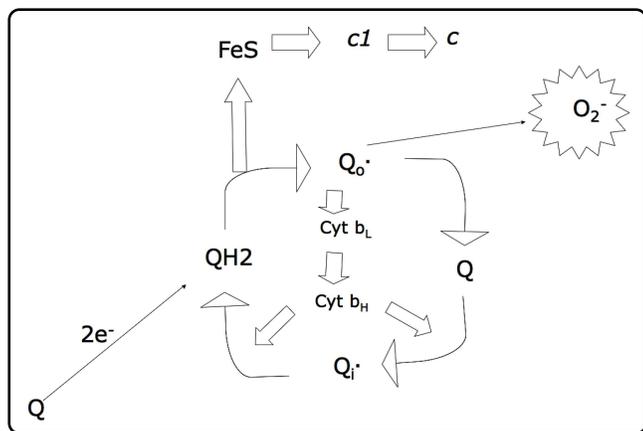


Figura 5. Esquema del flujo de electrones a través del complejo III. Las flechas indican el flujo de electrones. Ubiquinona (Q); ubiquinol (QH<sub>2</sub>); semiquinona (Q<sup>•</sup>); centro Q<sub>o</sub> (sitio que mira hacia el espacio intermembrana); Q<sub>i</sub> (sitio que mira hacia la matriz mitocondrial); proteína Hierro-Azufre (FeS); citocromo *c*<sub>1</sub> (*c*<sub>1</sub>); citocromo *c* (*c*); citocromo *b* (*cyt b<sub>L</sub>* y *cyt b<sub>H</sub>*) y la posible generación de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).

Se han sugerido 2 sitios en los cuales se pueden generar el superóxido dentro del mecanismo del ciclo Q, en los cuales se encuentran electrones desapareados y oxígeno. Uno de ellos es cuando la ubiquinona (Q<sub>i</sub>) recibe el electrón del citocromo *b<sub>H</sub>* y forma la semiquinona, un estado intermedio antes de formar el ubiquinol. El otro sitio es cuando el ubiquinol (Q<sub>o</sub>) pierde los protones y cede los electrones al citocromo *b<sub>L</sub>*, en este punto se vuelve a formar una semiquinona que puede llevar un electrón desapareado y, en contacto con el oxígeno, daría lugar a un radical superóxido<sup>16,21-23</sup>.

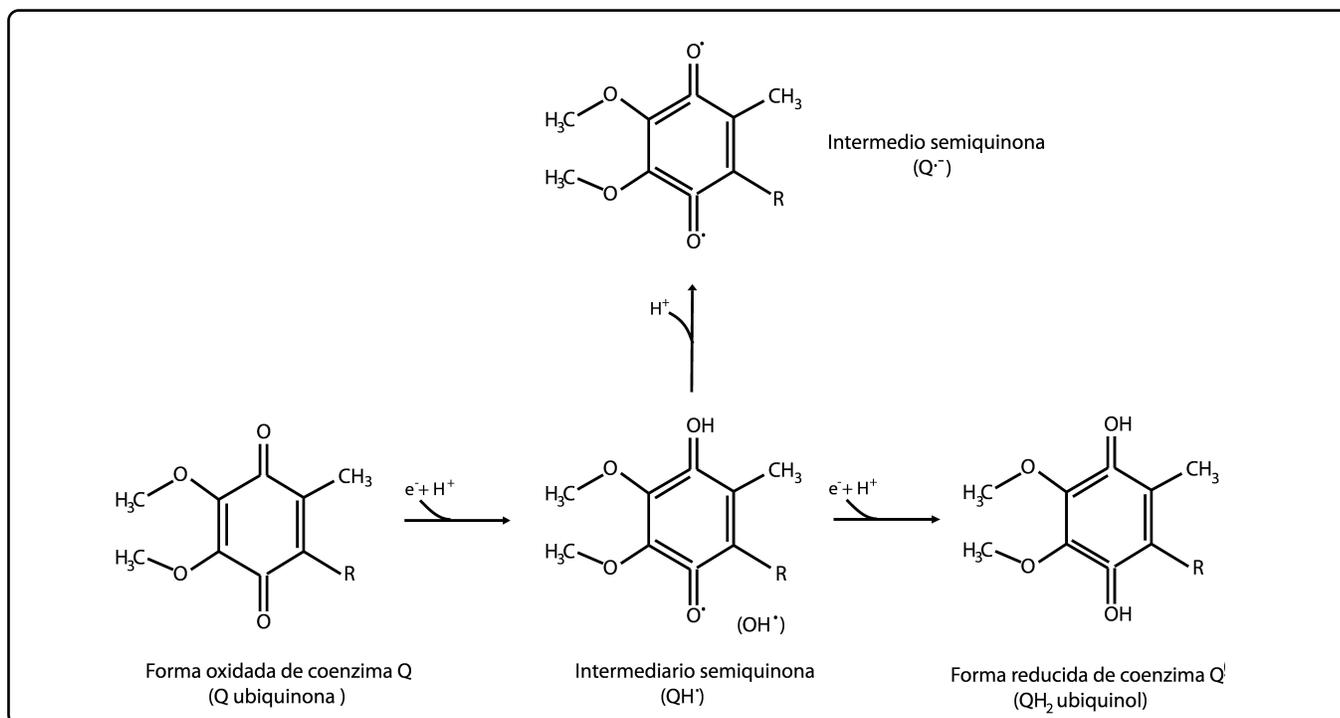
En el complejo IV, que lleva a cabo la reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, se generan una serie de intermediarios con electrones en forma de singletes, por lo que este complejo no es responsable de la generación de EROs en la mitocondria<sup>8</sup>. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, el complejo IV sí produce óxido nítrico (NO)<sup>24</sup>.

#### MECANISMOS DE DEFENSA ANTE LAS DIFERENTES ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, PRODUCIDAS EN LAS MITOCONDRIAS DE *S. cerevisiae*

La primera defensa enzimática para combatir la producción del superóxido es la superóxido dismutasa, o Sod, y su función consiste en formar peróxido de hidrógeno, a partir de superóxido y agua. *S. cerevisiae* presenta dos enzimas la primera la Cu/ZnSod o SOD1 que se ubica en el citosol<sup>25</sup> y en el espacio intermembrana<sup>26-27</sup> con una masa molecular de 25.7 kD. Las mutantes que carecen de esta enzima tienen un crecimiento pobre en medios respiratorios<sup>28</sup>, pierden la viabilidad en la fase estacionaria<sup>29</sup> y presentan una hipersensibilidad a la adición de oxidantes como el paraquat o la menadiona<sup>30</sup>. La otra superóxido dismutasa (Sod dependiente de Mn o SOD2) de *S. cerevisiae* se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial y su función es dismutar los superóxidos producidos por la cadena transportadora de electrones<sup>31-32</sup>. Se ha establecido que levaduras mutantes que carecen de esta enzima son sensibles al oxígeno<sup>33</sup> y son incapaces de crecer en medios respiratorios.

La sobre-expresión de ambas superóxido dismutasas, o de cada una de ellas, incrementa en un 30 % la longevidad de las células, de tal forma que los superóxidos que se encuentran en el citosol y en el espacio intermembrana son dismutados por la SOD1 y los que se producen en la respiración por la SOD2. Así se puede mantener un equilibrio en las reacciones de óxido-reducción que se realizan en la mitocondria y retardar el posible envejecimiento que ocasionan dichas reacciones<sup>34</sup>.

Para convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno<sup>35</sup>, *S. cerevisiae* contiene tres tipos de peroxiredoxinas, una de ellas se encuentra específicamente en la matriz mitocondrial. Esta enzima se denomina Prx1<sup>36</sup>, la cual se caracteriza por ser un monómero y presentar un solo sitio activo con una cisteína<sup>37</sup>. Las mutantes de esta enzima presentan una mayor



**Figura 6.** Estados de oxidación de las quinonas. La reducción de la ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH<sub>2</sub>) se realiza a través de un intermediario semiquinona (QH•).

susceptibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> agregado o producido en la respiración durante el cambio diaúxico<sup>36</sup>.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es más estable y es capaz de atravesar membranas, es degradado por una variedad de enzimas y moléculas de bajo peso molecular para prevenir el estrés oxidativo. Los sistemas que se encuentran en la mitocondria para la extinción de esta molécula, incluyen el sistema GSH/glutation peroxidasa (GPx), peroxiredoxinas, tioredoxinas y glutaredoxinas. Las catalasas también degradan el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero sólo se utilizan cuando los niveles de peróxido alcanzan concentraciones elevadas<sup>8</sup>.

*S. cerevisiae* contiene dos catalasas que transforman el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, Ctt1 y Cta1. Ctt1 se localiza exclusivamente en el citosol y Cta1 en los peroxisomas<sup>38</sup>. En condiciones de crecimiento usando medios en los cuales la fuente de carbono no es fermentable, o en medios de cultivo que contienen ácidos grasos como única fuente de carbono<sup>39</sup>, Cta1 se localiza en la matriz mitocondrial<sup>40</sup> para contener con la formación de peróxido. En ambos medios de cultivo se favorece la formación de especies reactivas de oxígeno en este organelo, por lo que el direccionamiento de Cta1 a la mitocondria tiene un efecto protector.

La teoría mitocondrial del envejecimiento propone que las especies reactivas de oxígeno generadas dentro de la célula conducirán, con el tiempo, a cantidades crecientes de daño

oxidativo a los diferentes componentes celulares. El sitio principal para la producción de EROs es la cadena respiratoria en la mitocondria y la acumulación de mutaciones del ADN mitocondrial (ADNmt) y alteraciones en la función de la cadena respiratoria se han asociado con enfermedades degenerativas y el envejecimiento. La teoría predice que la alteración de la función de la cadena respiratoria aumentará la producción de EROs y así incrementa la acumulación de mutación de ADNmt, que, a su vez, comprometerá la función de la cadena respiratoria y acelerará el envejecimiento de la célula<sup>41-43</sup>.

## CONCLUSIONES

El oxígeno es una molécula muy reactiva que se difunde libremente dentro de las mitocondrias de *S. cerevisiae* y es necesario como el aceptor final del flujo de electrones de la cadena transportadora de electrones. En este flujo de electrones se generan diferentes reacciones de óxido-reducción, en las cuales, en presencia de oxígeno y electrones desapareados, se puede generar el ión superóxido, una molécula también muy reactiva. Con las superóxido dismutasas se generan oxígeno y peróxido de hidrógeno, el peróxido se puede producir tanto en el espacio intermembrana como en la matriz mitocondrial. Para transformar el peróxido en agua y oxígeno, la mitocondria de *S. cerevisiae* presenta una peroxiredoxina que lleva a cabo dicha reacción, pero si el peróxido reacciona con un metal de transición, mediante la reacción de Haber-Weiss o Fenton, se forma el ión hidroxilo, uno de los oxidantes más fuertes de la

naturaleza. El hidroxilo puede reaccionar con el ADN, los lípidos o las proteínas presentes en la mitocondria y generar cambios en la forma, estructura y función de este organelo clave en el metabolismo.

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores que forman parte de mi comité tutorial de doctorado por sus críticas, sugerencias y observaciones para la mejora de este documento: Sobeida Sánchez-Nieto, Xóchitl Pérez-Martínez y Diego González-Halphen. A Alexa Villavicencio-Queijeiro por el apoyo en la edición de las imágenes. A los financiamientos económicos por parte del CONACyT (128110) y de la DGAPA (IN203311). A la Facultad de Química (UNAM) y al Instituto de Fisiología Celular (UNAM) por brindarme los espacios necesarios para mi formación. Al CONACyT por la beca (176940) otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

## REFERENCIAS

- Bartozs, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1303-1315 (2009).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press, London, 1999).
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. & Covarrubias Robles, A.A. Larespuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* (1-2), 24-46 (2004).
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. Oxigen toxicity oxigen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14 (1984).
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. & Cabisco, E. Redox control and oxidative stress in the yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1780**(11), 1217-1235 (2008).
- Kehrer, P.J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43-50 (2000).
- Czapski, G. & Goldstein, S. When do metal complexes protect the biological system from superoxide toxicity and when do they enhance it? *Free Rad. Res. Comms.* **1**(3), 157-161 (1986).
- Mailloux, J.R. & Harper, M.E. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. En prensa (2012).
- Bakker, M.B. *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 15-37 (2001).
- Lemire, D.B. & Oyedotun, S.K. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochem. Biophys. Acta.* **1553**, 102-116 (2002).
- Clarke, F.C., Williams, W. & Teruya, H.H. Ubiquinone Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266** (25), 16636-16644 (1991).
- Power, S.D., Lochrie, M.A., Severino, K.A., Patterson, T.E. & Poyton, R.O. The nuclear-coded subunits of yeast cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* **259**(10), 6564-6570 (1984).
- Grivenokova, V.G. & Vinogradov, A.D. Generation of superoxide by the mitochondrial complex I. *Biochem. Biophys. Acta* **1757**, 553-561 (2006).
- Hirst, J., King, M.S. & Pryde, K.R. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 976-980 (2008).
- Turrens, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports* **17**(1), 3-8 (1997).
- Fang, J. & Beattie, D.S. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **34**(4), 478-488 (2003).
- Carneiro, P., Duarte, M. & Videira, A. Disruption of alternative NAD(P)H dehydrogenases leads to decreased mitochondrial ROS in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine.* **52**, 402-409 (2012).
- Trumpower, B.L. The protonmotive Q cycle. *J. Biol. Chem.* **265**(20), 11409-11412 (1990).
- Quinland, L.C., Gerencser, A.A., Treberg, R.J. & Brand, D.M. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J. Biol. Chem.* **286**(36), 31361-31372 (2011).
- Hamanaka, B.R. & Chandel, S.N. Mitochondrial reactive species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences.* **35**, 505-513 (2010).
- Boveris, A., Cadenas, E. & Stoppani, A.O.M. Role of ubiquinone in the generation of Hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **156**, 135-144 (1976).
- Turrens, J.F., Alexandre, A. & Lehninger, A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**(2), 408-414 (1985).
- Nohl, H., Gille, L. & Staniek, K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 719-723 (2005).
- Castello, R.P., David, S.P., McClure, T., Crook, Z. & Poyton, O.R. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eucaryotes. *Cell Metabolism* **3**(4), 277-287 (2006).
- Birmingham-McDonogh, O., Gralla, E.B. & Valentine, S.J. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning, sequencing, and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4789-4793 (1988).
- Sturtz, A.L., Diekert, K., Jensen, T.L., Lill, R. & Culotta, C.V. A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**(41), 38084-38089 (2001).
- Han, D., Williams, E. & Cadenas, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* **353**, 411-416 (2001).
- Liu, X.F. *et al.* Yeast lacking superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **267**(26), 18298-18302 (1992).
- Costa, V., Amorim, A.M., Reis, E., Quintanilha, A. & Moradas-Ferreira, P. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143**, 1649-1656 (1997).
- Gralla, B.E. & Valentine, S.J. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn Superoxide dismutase: Characterization and spontaneous mutation rates. *J. Bacteriol.* **173**(18), 5918-5920 (1991).
- Guidot, D.M., McCord, J.M., Wright, R.M. & Repine, J.E. Absence of Electron Transport (Rho<sup>o</sup> State) Restores Growth of a Manganese-Superoxide Dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in Hyperoxia. *J. Biol. Chem.* **268**(35), 26699-26703 (1993).
- Marres, M.A.C. *et al.* Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast

- mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron-sulphur protein. *Eur. J. Biochem.* **147**, 153-161 (1985).
33. van Loon, A.P., Pesold-Hurt, B. & Schatz, G. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83(11)**, 3820-3824 (1986).
34. Fabrizio, P. *et al.* Sod2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**, 35-46 (2003).
35. Munhoz, D.C. & Soares Netto, L.E. Cytosolic Thioredoxin Peroxidase I and II Are Important Defenses of Yeast against Organic Hydroperoxide Insult. *J. Biol. Chem.* **279(34)**, 35219-35227 (2004).
36. Pedrajas, R.J., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, A.N. & Spyrou, G. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* Contain One-conserved Cysteine Type Peroxiredoxin with Thioredoxin Peroxidase Activity. *J. Biol. Chem.* **276(21)**, 16296-16301 (2000).
37. Park, G.S., Cha, M.K., Jeong, W. & Kim, I.H. Distinct Physiological Functions of Thiol Peroxidase Isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275(8)**, 5723-5732 (2000).
38. Hiltunen, K.J. *et al.* The biochemistry of peroxisomal  $\beta$ -oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 35-64 (2003).
39. Filipits, M., Simon, M.M., Rapatz, W., Hamilton, B. & Ruis, H. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates activation of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* **132**, 49-55 (1993).
40. Petrova, Y.V., Drescher, D., Kujumdzieva, V.A. & Schmitt, J.M. Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* **380**, 393-400 (2004).
41. Sohal, S.R., Mockett, J.R. & Orr, C.W. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine* **33(5)**, 575-586 (2002).
42. Rattan, S.I.S. Theories of biological aging: Genes, proteins and free radicals. *Free Radical Research* **40(12)**, 1230-1238 (2006).
43. Muller, L.F., Lustgarten, S.M., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology* **43**, 477-503 (2007).

ORIGINAL ARTICLE

## Overexpression of a monomeric form of the bovine odorant-binding protein protects *Escherichia coli* from chemical-induced oxidative stress

A. Macedo-Márquez<sup>1</sup>, M. Vázquez-Acevedo<sup>1</sup>, L. Ongay-Larios<sup>1</sup>, H. Miranda-Astudillo<sup>1</sup>, R. Hernández-Muñoz<sup>1</sup>, D. González-Halphen<sup>1</sup>, S. Grolli<sup>2</sup> & R. Ramoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico, and <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma, Via del Taglio, Parma, Italia

### Abstract

Mammalian odorant-binding proteins (OBPs) are soluble lipocalins produced in the nasal mucosa and in other epithelial tissues of several animal species, where they are supposed to serve as scavengers for small structurally unrelated hydrophobic molecules. These would include odorants and toxic aldehydes like 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), which are end products of lipid peroxidation; therefore OBP might physiologically contribute to preserve the integrity of epithelial tissues under oxidative stress conditions by removing toxic compounds from the environment and, eventually, driving them to the appropriate degradative pathways. With the aim of developing a biological model based on a living organism for the investigation of the antioxidant properties of OBP, here we asked whether the overexpression of the protein could confer protection from chemical-induced oxidative stress in *Escherichia coli*. To this aim, bacteria were made to overexpress either GCC-bOBP, a redesigned monomeric mutant of bovine OBP, or its amino-terminal 6-histidine-tagged version 6H-GCC-bOBP. After inducing overexpression for 4 h, bacterial cells were diluted in fresh culture media, and their growth curves were followed in the presence of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH), two reactive oxygen species whose toxicity is mainly due to lipid peroxidation, and menadione, a redox-cycling drug producing the superoxide ion. GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were found to protect bacterial cells from the insulting agents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tBuOOH but not from menadione. The obtained data led us to hypothesize that the presence of overexpressed OBP may contribute to protect bacterial cells against oxidative stress probably by sequestering toxic compounds locally produced during the first replication cycles by lipid peroxidation, before bacteria activate their appropriate enzyme-based antioxidative mechanisms.

**Keywords:** lipocalins, lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal, reactive oxygen species, unsaturated fatty acids

### Introduction

Oxygen is a highly reactive molecule that when partially reduced may give rise to the so-called reactive oxygen species (ROS) superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and hydroxyl radicals (HO<sup>•</sup>) [1,2]. ROS are formed inside cells as a consequence of oxidative metabolic processes and may cause chemical modifications in lipids, DNA, and proteins [2–5]. A large part of the chemical toxicity determined by ROS is due to the peroxidation of unsaturated fatty acids, whose main end products are reactive unsaturated aldehydes of 7–11 carbon atoms [3–6]. These unstable molecules inactivate the biological functionality of proteins and nucleic acids by reacting, in a Michael type addition, with nucleophilic groups (-SH, -NH<sub>2</sub>, and imidazole) of amino acids and nucleotides [3,4]. Of particular interest is 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), a molecule locally produced at millimolar levels during oxidative stress, which is involved in the pathogenesis of several acute and chronic diseases and cancer [3,4].

In eukaryotes, unsaturated aldehydes are generated through the peroxidation of membrane polyunsaturated fatty acids (PUFA) [3–6], which are compounds extremely

susceptible to the chemical reactivity of ROS. Although oxidative stress in bacteria has been extensively investigated [7], due to the lack of PUFAs in these microorganisms, the toxicity induced by ROS-derived unsaturated aldehydes was not considered of particular interest for a long time. Nevertheless, bacteria exhibit high levels of membrane monounsaturated fatty acids, and recent investigations on *Escherichia coli* have shown that these molecules can be subjected to ROS-driven lipid peroxidation and give rise to the same toxic aldehydes that have been found in eukaryotes [8,9].

Although the inactivation of ROS and of their toxic derivatives is mainly achieved enzymatically, some experimental evidences on the odorant-binding protein (OBP), namely a carrier for small hydrophobic molecules originally purified from nasal mucosa of several mammalian species, have suggested that scavenging proteins could also play a role *in vivo* against the toxic effects of oxidative stress [10]. The connections between OBPs, biological oxidation, and/or the molecular mechanisms that cells and tissues oppose to the activity of ROS can be summarized as follows: (i) in mammals OBPs are expressed at high levels by epithelial tissues which are either directly exposed

to molecular oxygen (nasal mucosa, lachrymal and salivary glands, and lung), or subjected to high levels of oxidative stress (prostate, mammary gland, male deferent ducts, and placenta) [11,12]; (ii) OBPs from different animal species can bind with similar affinities toxic molecules produced by ROS such as several aldehydes derived from lipid peroxidation, including HNE [10,13]; (iii) *in-vitro*, in a simplified model resembling nasal epithelium, a 6-His amino terminal tagged version of native dimeric bOBP, coupled at low millimolar concentrations to Ni-NTA agarose, was able to protect an epithelial cell line derived from bovine turbinates from the toxicity of HNE [10].

OBPs belong to a family of small (140–166 amino acid) extracellular soluble proteins, spread from bacteria to mammals, named lipocalins, that bind hydrophobic compounds with molecular masses ranging from 150 to 300 Da [14]. While the primary structure of lipocalins varies widely, their tertiary structures are highly conserved and exhibit a unique structural frame, named lipocalin folding, formed by the three-dimensional arrangements of two domains: an eight stranded  $\beta$ -barrel (constituted by the first 110–120 amino acid residues) and a short carboxy-terminal  $\alpha$ -helix. A short curved hinge (8–10 amino acid residues) connects the two domains, and their reciprocal position is stabilized through a disulfide bridge between two highly conserved cysteine residues [15]. The  $\beta$ -barrel gives rise to a cavity layered by hydrophobic residues that represents the ligand binding site, while the role of the conserved carboxy-terminal  $\alpha$ -helix still remains to be defined [15].

OBPs are considered to be multifunctional extracellular protein carriers/scavengers involved in several biological processes that may occur independently or simultaneously in a specific tissue. For example, in the nasal epithelia, OBP dissolved in the mucus is supposed to be involved in olfactory perireceptor events behaving either as carrier of odorous compounds to their receptors or as a scavenger of excess odors [11,16]. In addition to this function, taking into account its ligand-binding capacity for molecules derived from lipid peroxidation, OBP [10] might also contribute to the removal, from the mucus, of cytotoxic molecules produced as a consequence of oxidative stress, driving them into the first tract of the digestive system where they can be inactivated. Thus OBP may protect to some extent from oxidative damage the olfactory receptors, whose integrity is crucial for both individual (food research, danger perception, etc.) and social (reproduction, establishment of hierarchic positions inside a group, etc.) behaviors of the animals. Among OBPs, the bovine form (bOBP) is atypical, since it is a homodimer stabilized by domain swapping, where each of the two lipocalin folding units that constitute its three-dimensional structure is formed by the alpha helix of one subunit and the beta barrel of the other [17,18]. The reason for this structural organization of bOBP resides on one hand on the lack of a glycine in position 122, that in monomeric lipocalins is responsible for the flexibility of the hinge that allows the alpha helix to make contact with the external surface of the beta barrel; and on the other hand, on the absence of

two conserved cysteine residues in positions 64 and 155 that form the inter-domain disulfide bridge that stabilizes the overall architecture of the protein. Based on the role of these three residues and on the structural features of the monomeric native porcine OBP [19], the bovine dimeric form was redesigned as a monomer by introducing three-point mutations: the insertion of a glycine in position 122 and two amino acid substitutions, W64C and H155C [20]. The resulting structurally simplified mutant (GCC-bOBP), whose three-dimensional arrangement is coincident with that of all monomeric lipocalins, maintains the same binding properties of the native, dimeric bOBP [20].

Bovine OBP, porcine OBP, GCC-bOBP, and its amino terminal-6-His-tagged version (6H-GCC-bOBP) bind with relative high affinity (Kds in the range of 9.0  $\mu$ M) toxic compounds produced by ROS such as HNE and other 7–11 carbon atoms aldehydes and unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation, and can resist their deleterious chemical activity [10 and Grolli et al., manuscript in preparation]. In addition, as mentioned above, a simplified model resembling nasal epithelium showed that extra-cellular immobilized OBP could protect a cell line derived from bovine turbinates from toxic amounts of HNE added to the culture medium [10]. We therefore hypothesized that over-expression of monomeric GCC-bOBP as well as 6H-GCC-bOBP by properly transformed *E. coli* strains could preserve, to some extent, the viability of the bacterium subjected to externally chemical-induced oxidative stress. This would involve the removal by OBP of toxic compounds locally produced, some of which probably derived from lipid peroxidation, before bacteria synthesize and activate the appropriate detoxifying enzymes [21,22]. To this aim, after inducing overexpression of the OBPs for 4 h, bacterial growth curves were followed in the presence of increasing concentrations of three compounds that induce oxidative stress: menadione [23], a strong generator of the superoxide radical, and two ROS, that is, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *tert*-butyl hydroperoxide [21], which initiate the production of reactive toxic aldehydes and unsaturated aldehydes through lipid peroxidation with a similar chemical mechanism but a different reactivity, being the second more hydrophobic and therefore favored to react with membrane lipids.

## Materials and methods

### Strains

*E. coli* BL21-CodonPlus competent cells were obtained from Stratagene (La Jolla, California).

### Protein analysis

Denaturing gel electrophoresis was carried out in a Tricine-SDS-PAGE system [24], as indicated. Proteins were loaded on 12.5% polyacrylamide gels. The stacking gel contained 4% (w/v) polyacrylamide. Protein concentrations of the purified OBP samples were determined on

the spectrophotometer [20], while for the crude extracts or partially purified preparations, the protein contents were estimated following a modification of the Lowry procedure [25].

#### *Overexpression of recombinant proteins*

*E. coli* BL21-CodonPlus competent cells were transformed by heat shock at 42°C for 2 min with an empty pT7-7 vector or pT7-7 vectors containing the appropriate cDNA constructs required to express GCC-bOBP or 6H-GCC-bOBP [20,26]. Bacteria were grown in LB media supplemented with ampicillin (100 µg/mL). Proteins were over-expressed in the presence of the inducing agent isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) [27].

#### *Purification of recombinant proteins*

*E. coli* BL21-CodonPlus transformed with pT7-7 vector containing the cDNA of 6H-GCC-bOBP were grown in two liters of culture media at 37°C until an absorbance value of 0.6 at 600 nm was attained. Then IPTG was added to a 0.1 mM final concentration and the culture was incubated for 4 additional hours. The culture was then centrifuged at 6,000 g for 15 min, and the resulting pellet (4.0 mL/L of culture medium) was resuspended in 50 mM of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, pH 7.8. Cells were broken by sonication with six pulses of 1 min each followed by 1 min interruptions using a Branson-450 sonifier (settings: 5 watts, 50% output). From there on, all steps were carried out at 4°C. The broken cells were centrifuged at 12,000 g for 10 min and the supernatant containing 6H-GCC-bOBP recovered. Imidazole was added to the sample to a final concentration of 10 mM. Then, the sample was loaded on a 5 mL of HisTrap FF crude column (GE Healthcare) equilibrated with PBS. The column was washed with the same buffer containing 30 mM imidazole. Then, the protein was eluted with a 30–500 mM imidazole gradient in the same buffer. The fractions obtained from the column were analyzed using SDS-Tricine-PAGE, and the pure 6H-GCC-bOBP protein was collected, concentrated, and preserved at –70°C until used.

Untagged GCC-bOBP was purified using FPLC according to previously published procedures [20] starting from a soluble bacterial extract prepared like that of 6H-GCC-bOBP (see above, this same paragraph).

#### *Antibody production and immunoblotting*

Antibodies were generated against 6H-GCC-bOBP. Twenty microgram of the recombinant, isolated protein were resolved using Tricine-SDS-PAGE (14% acrylamide) in the presence of 25 mg/L of Serva Blue G in the upper buffer as described [24]. 6H-GCC-bOBP was excised from the gel, grinded in the presence of 20 mM Tris (pH 7.0), mixed with Freund's complete adjuvant and injected into rabbits for antibody production. For Western blot analysis, samples were subjected to SDS-Tricine-PAGE, and gels were electro-transferred

onto a nitrocellulose Trans-Blot membrane (BioRad) for immune-detection [28]. Membranes were washed, blocked, and incubated with the antibody raised against the 6H-GCC-bOBP. An alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (diluted 1:3000 for 2 h) was used as a secondary antibody. Protein colorimetric detection was carried out with 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt and nitro-blue tetrazolium chloride. The images of the polypeptide bands decorated with the insoluble black-purple precipitates were recorded using a HP Scanjet G4050.

#### *Growth curves*

Bacterial growth curves were followed in a BIOSCREEN C apparatus that allows monitoring bacterial growth in culture volumes of 300 µl under controlled temperature and agitation. Where indicated, cultures were subjected to increasing concentrations of chemical agents known to induce ROS production. For this purpose, 10 mL cultures of the three strains of *E. coli* were grown overnight at 37°C in 50-mL flasks in LB media containing 100 µg/mL ampicillin, until they reached an O.D. at 600 nm between 0.8 and 1.0. One mL of each culture was diluted with 9.0 mL of LB media and induced for 4 h at 37°C in the presence of 0.1 mM IPTG. Then, 700 µl of the induced culture were transferred to sterile 15 mL Falcon tubes, to reach an O.D. (600 nm) of 0.2 in a final volume of 10 mL of LB media containing 100 µg/mL ampicillin but lacking IPTG. Thus, the IPTG concentration of the samples was diluted down to only 7 µM, a level that is ineffective to induce significant amounts of newly synthesized heterologous protein. Aliquots of the culture were transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes to which increasing concentrations of the selected insulting agent were added. Finally, triplicates of 300 µl of each culture media were transferred to a 100-well plate and growth followed at 40-min intervals at 37°C in a BIOSCREEN C apparatus at maximum agitation for up to 15 or 20 h. Growth curves for representative experiments were collected. The absorbance values at 600 nm obtained for the same experiment were normalized taking the maximal value as 1.0. Each experiment (with different cultures in different days) was also carried out by triplicate.

## **Results**

In order to address the effects of OBP in *E. coli* under oxidative stress stimuli, two proteins, namely monomeric GCC-bOBP and its histidine tagged version 6H-GCC-bOBP were first overexpressed in the BL21-Codon Plus strain as already reported [20,26]. Figure 1A shows a Coomassie Blue-stained acrylamide gel of samples of the same amounts of bacteria transformed with pT7-7 vectors bearing the different OBP constructs at 0, 4, 6, and 8 h after induction with IPTG. A control with bacteria containing an empty vector (EV) is also shown. Both GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were overexpressed, being

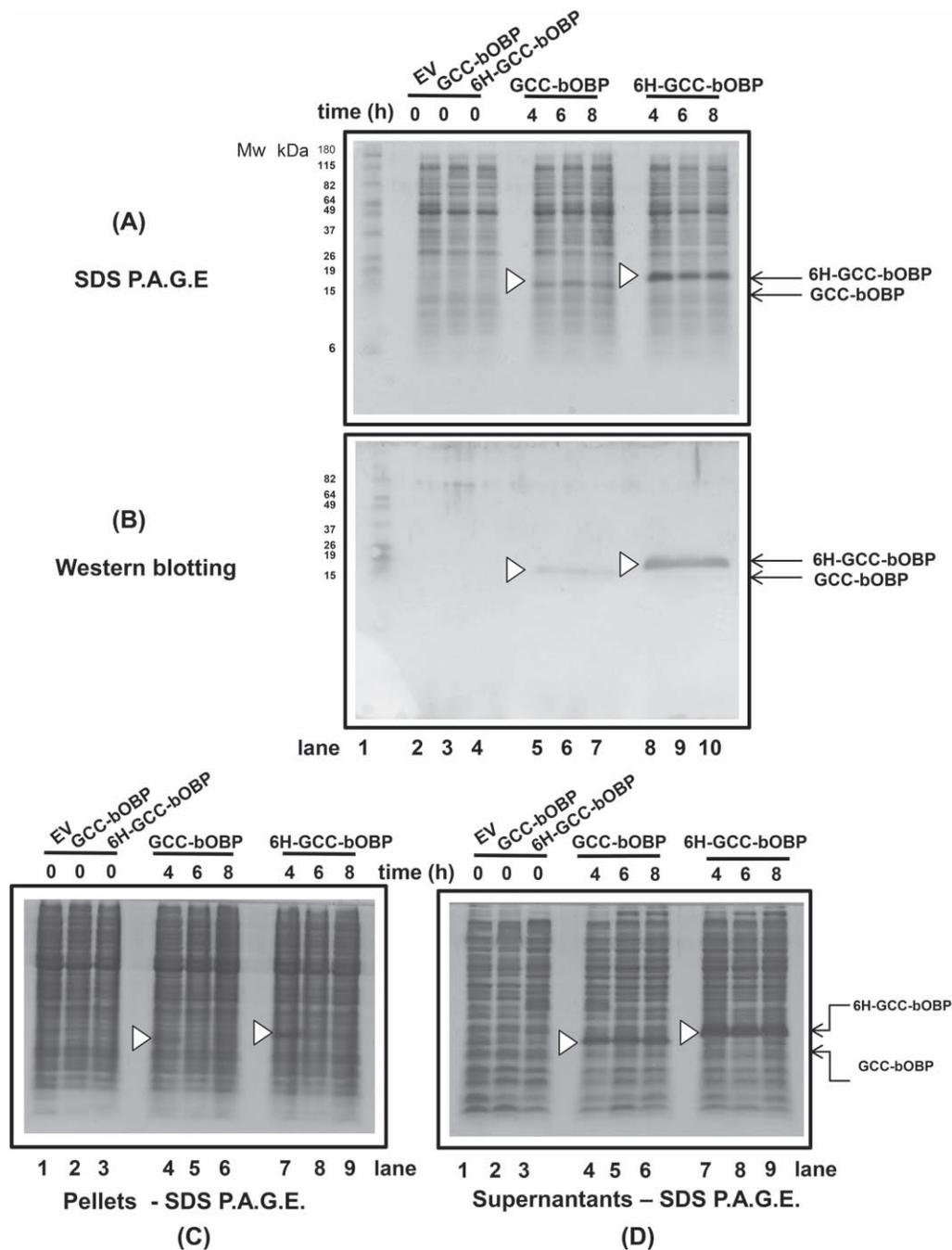


Figure 1. Overexpression of GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP. (A) Tricine-SDS polyacrylamide gel showing the polypeptide pattern of bacterial crude extracts overexpressing GCC-bOBP (lanes 3 and 5–7) and 6H-GCC-bOBP (lanes 4 and 8–10) at 0, 4, 6, and 8 h. The crude extract of control cells containing the EV are shown for comparison (lanes 2). The identities of the two overexpressed proteins are indicated (white arrows and labels on the right hand side). The apparent molecular masses (in kDa) of the protein markers resolved in the same gel (Mw, lane 1) are indicated in the left part of the panel. 6H-GCC-bOBP exhibits a slightly higher apparent molecular mass (~18 kDa) than GCC-bOBP (~17 kDa) due to the presence of the 6His-tag. (B) Western blot analyses carried out on bacterial crude extracts carrying the EV (EV, lanes 2), or overexpressing GCC-bOBP (lanes 3 and 5–7) or 6H-GCC-bOBP (lanes 4 and 8–10) at 0, 4, 6, and 8 h. The apparent molecular masses of the protein markers resolved in the same gel (Mw, lane 1) are indicated in the left part of the panel. (C) and (D) Bacterial cells carrying the EV (EV, lane 1), or overexpressing GCC-bOBP (lanes 2 and 4–6) or 6H-GCC-bOBP (lanes 3 and 7–9) at 0, 4, and 6, and 8 h, were broken, subjected to differential centrifugation and separated into pellets (panel C) and supernatants (panel D), which were resolved in Tricine-SDS polyacrylamide gels.

overexpression of 6H-GCC-bOBP five times higher than that of GCC-bOBP, as judged by densitometric analysis. As expected, no OBP protein band was observed when induction was carried out in the presence of an EV. The higher molecular mass of 6H-GCC-bOBP revealed by

SDS PAGE under reducing conditions can be ascribed to the six histidine residues at the amino terminal, that contribute by an extra 930 Da value to the mass of the protein. In order to unambiguously identify the presence of the two overexpressed proteins, Western blot analysis was carried

out. A similar gel to the one shown in Figure 1A was transferred to a nitrocellulose membrane and revealed with an anti-6H-GCC-bOBP antibody. Figure 1B shows the Western blot of bacterial total protein extracts obtained at 0, 4, 6, and 8 h after induction with IPTG. Four hours of IPTG induction were used in subsequent experiments. In order to assess whether the overexpressed proteins were in soluble form or in inclusion bodies, the bacterial cells expressing GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP were homogenized, centrifuged, and the resulting pellets and supernatants were subjected to SDS-PAGE. The largest amount of the overexpressed proteins could be recovered in the supernatants, indicating that they are present mainly in a soluble form (Figure 1C and D).

The two OBP forms that were purified from the bacterial supernatants after 4 h IPTG induction, gave production yields of 8.0 and 40.0 mg/liter of bacterial culture media for GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP, respectively. These data substantially confirm the ratio between the concentration levels obtained by densitometric analysis on the crude bacterial extracts after SDS-PAGE and, more qualitatively, from the immunoblotting (Figure 1B). It must be underlined that, due to the loss of protein during the chromatographic step and to the underestimation of the volume of the bacterial cytosol obtained either from the volume of the cell pellets (about 4.0 mL/liter of culture media) and from the optical density at 600 nm of the bacterial suspension (about 1.1 OD units) [29], the real amounts of protein expressed in bacteria must have been higher than those obtained after purification. Just focusing on the volumes of the wet pellets of 4.0 h induced bacterial cultures, which were about 4.0 mL/liter of culture media, it can be estimated that the intracellular concentrations of the two protein forms were certainly higher than 0.13 and 0.55 mM for GCC-bOBP and GCC-bOBP-6H, respectively. Therefore, taking into account that the dissociation constants of the OBP-ligand binding complexes are in the micromolar range, the presence of at least low-millimolar levels of both OBP forms in the *E. coli* cytosol allowed us to explore the possible protective scavenging effects by these proteins on toxic ligands eventually produced by the activity of ROS in cells subjected to insults with different chemical oxidizing agents.

To this aim GCC-bOBP or 6H-GCC-bOBP were overexpressed in properly transformed *E. coli* for 4 h, and then after removal of IPTG by dilution, bacterial growth curves were followed in the presence of increasing concentrations of insulting agents that induce oxidative stress. Control cells containing the empty expression vector were also subjected to induction in the presence of IPTG for 4 h and then treated as those overexpressing the two OBP forms. Three insulting agents were used: menadione, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and *tert*-Butyl hydroperoxide (tBuOOH). Several bacterial growth curves were carried out in order to establish the range of concentrations in which the different agents affected growth in the three bacterial strains. The established ranges of concentrations to be assayed were: for menadione, from 125 to 225  $\mu$ M; for  $H_2O_2$ , from 0.6 to 1.0 mM; and for tBuOOH, from 175 to 275  $\mu$ M.

Figure 2A shows representative examples of growth curves obtained for the control cells (with the EV) in the absence of menadione and in the presence of increasing concentrations of the quinone (from 125 to 225  $\mu$ M). Growth curves for the cells expressing GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP are shown in Figure 2B and C, respectively. The growth curves of cells expressing GCC-bOBP exposed to increasing concentrations of quinone were similar to the growth curves of cells expressing only the EV, while 6H-GCC-bOBP overexpression seems to have a deleterious effect on the bacterial cells, and no growth was observed at concentrations of 175, 200, and 225  $\mu$ M menadione. Figure 3A shows the growth curves obtained for the control cells (with the EV) in the absence of  $H_2O_2$  and in the

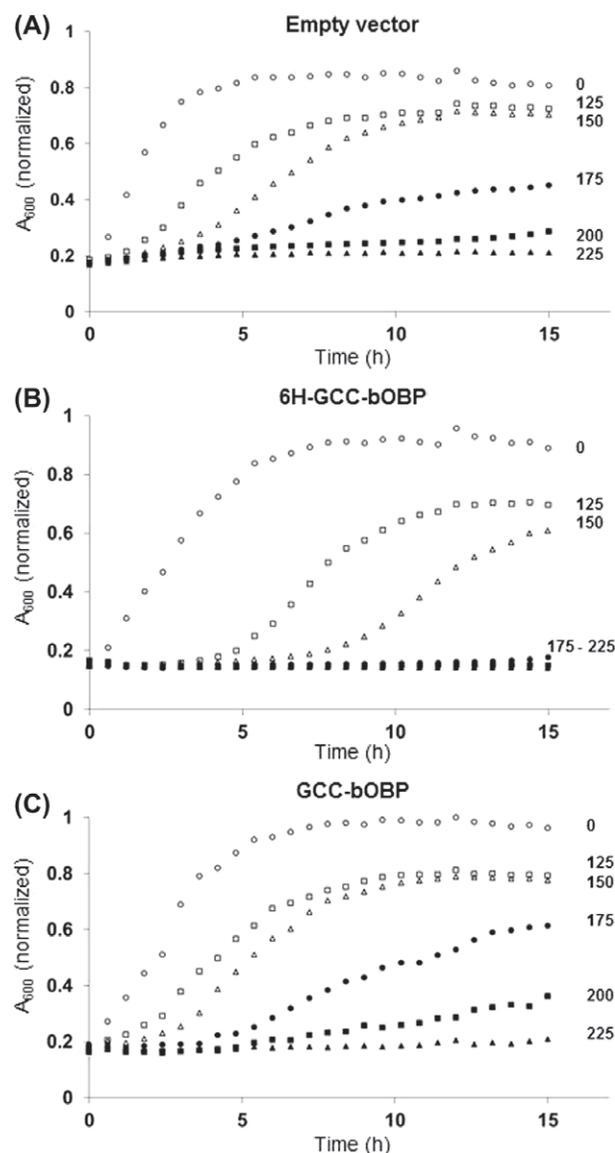


Figure 2. Bacterial growth curves at increasing concentrations of menadione. Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitoring their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of menadione as indicated ( $\mu$ M concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing only empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

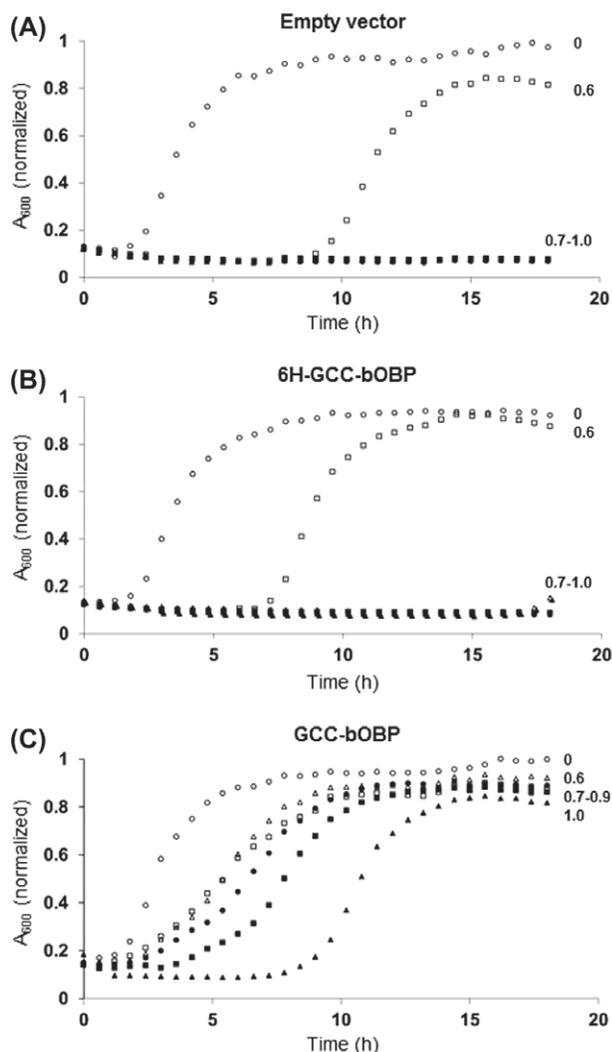


Figure 3. Bacterial growth curves at increasing concentrations of  $H_2O_2$ . Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitoring their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of hydrogen peroxide as indicated (mM concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

presence of increasing concentrations of the oxidizing agent (from 0.6 to 1.0 mM). Growth curves for the cells expressing 6H-GCC-bOBP and GCC-bOBP are shown in Figure 3B and C, respectively. Cells with the EV or cells overexpressing 6H-GCC-bOBP showed a strong lag phase in the growth curves in the presence of 0.6 mM  $H_2O_2$ , and were unable to grow at concentrations above 0.6 mM of the oxidizing agent. In contrast, the cells overexpressing GCC-bOBP, although they also exhibited lag phases progressively longer, were able to grow at concentrations as high as 1.0 mM  $H_2O_2$ . Thus, GCC-bOBP overexpression could significantly protect bacterial cells from the deleterious effects of hydrogen peroxide.

We explored the effects of a third chemical agent, tBuOOH. Figure 4A shows the growth curves obtained for the control cells (EV) in the absence of tBuOOH and in the presence of increasing concentrations of the oxidizing agent (from 175 to 275  $\mu M$ ). Growth curves for the cells

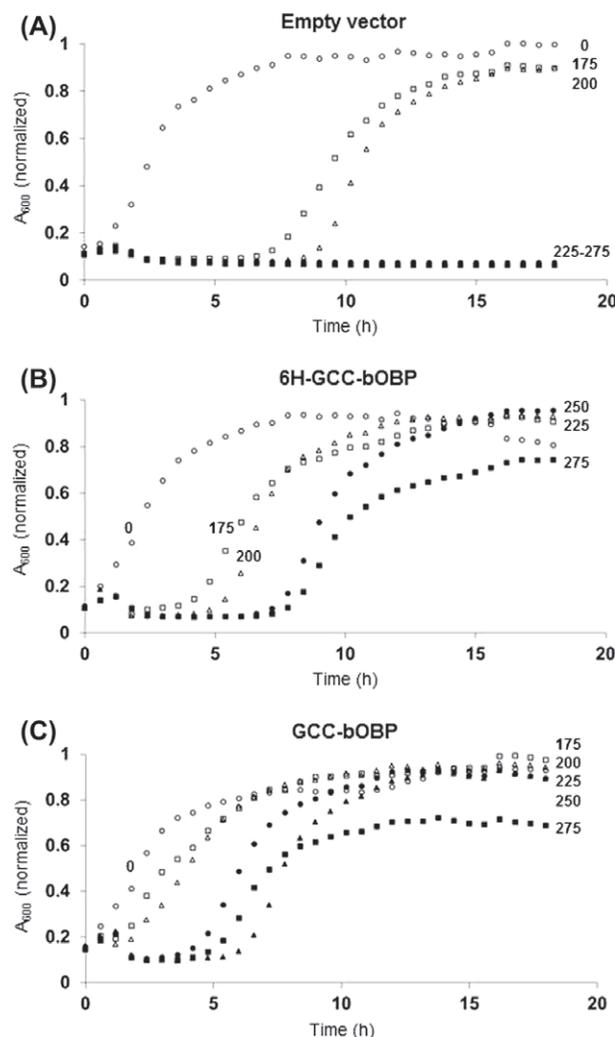


Figure 4. Bacterial growth curves at increasing concentrations of tBuOOH. Bacteria were induced with IPTG for 4 h previous to monitor their growth at 600 nm. The three samples were exposed to increasing concentrations of tBuOOH as indicated ( $\mu M$  concentrations). (A) Growth of *E. coli* cells containing empty vector. (B) Growth of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. (C) Growth of *E. coli* cells overexpressing GCC-bOBP.

expressing 6H-GCC-bOBP and GCC-bOBP are shown in Figure 4B and C, respectively. Control cells carrying the EV exhibited a long lag phase but were able to grow at concentrations of 175 and 200  $\mu M$  tBuOOH. Cells expressing 6H-GCC-bOBP were able to grow at 250  $\mu M$  of tBuOOH, while those expressing GCC-bOBP grew up to 275  $\mu M$  tBuOOH. Thus, a moderate protective effect of both GCC-bOBP and 6H-GCC-bOBP is exerted when bacterial cells are exposed to the oxidative agent tBuOOH.

## Discussion

ROS are short-lived radical intermediates generated as a consequence of oxidative metabolism that are believed to damage, following different chemical pathways, cells subjected to oxidative stress [2]. Among these mechanisms,

a relevant role is played by the lipid peroxidation of membrane unsaturated fatty acids, a complex process that produces several toxic low molecular mass reactive aldehydes that can damage and inactivate proteins and nucleic acids by attacking their nucleophilic groups and forming covalent adducts [3].

Since several data from the literature (tissue expression *in-vivo* and biochemical properties) allowed to hypothesize an involvement of OBP in the molecular mechanisms that tissues and cells oppose to biological oxidation, we tested if high expression levels of this protein were able to protect, to some extent, a living organism subjected to ROS and ROS-inducing chemicals. Our chosen biological model was *E. coli*, whose lipid membrane composition has 50% unsaturated and 50% saturated fatty acids [21,30]. We worked with BL21-CodonPlus, a commercial strain commonly employed to produce recombinant proteins including OBPs [10,20]. *E. coli* cells were transformed with pT7-7 expression vectors containing either the cDNA of the monomeric mutant of bovine OBP (GCC-bOBP), or that of its 6-His amino terminal tagged version (6H-GCC-bOBP). GCC-bOBP was chosen because it is a structurally simplified version of the dimeric swapped bOBP with a 3D-structure resembling that of all monomeric lipocalins [20] that might exhibit a facilitated folding mechanism *in vivo*, and also because it retains the same ligand-binding specificities and affinities of bOBP [20].

As judged by Coomassie-Blue stained gels and Western blot analysis (Figure 1), competent cells over-expressed 6H-GCC-bOBP around five-fold more than the untagged protein. Although significantly different, both clones produced more than 8.0 mg of OBP/L of culture medium, a reasonable high level reached by recombinant proteins expressed in *E. coli*. Even if the average concentration of OBP/single *E. coli* cell after 4-h IPTG induction cannot be accurately determined, both from the volume of the bacterial pellets (about 4.0 mL/liter of culture media) and from the optical density at 600 nm of the bacterial suspension (about 1.1 OD units) [29], it can be estimated that it must be in the low millimolar range. Taking into account that the dissociation constants of the OBP ligands are generally in the micromolar range [23,30], it can be concluded that the concentration of OBP present in a soluble form in the *E. coli* cells, is high enough to guarantee that the protein can effectively scavenge from the cytoplasm equimolar amounts of toxic molecules and/or chemical intermediates produced by the activity of ROS (either derived from lipid peroxidation or of different chemical nature), that can fit its ligand binding site. In addition, it must be considered that an extra antioxidant function might also be played by the two cysteine residues of GCC-bOBP. The purified recombinant GCC-bOBP exhibits the interdomain disulfide bridge characterizing the lipocalin folding, as shown by X-ray diffractometry [20]. Nevertheless, it cannot be excluded that in the reducing environment of *E. coli* cytoplasm a fraction of the cysteines residues, that would be eventually exposed on the protein surface as free thiols, might contribute to mitigate the noxious effects of oxidative stress by reacting either with ROS or with their oxida-

tion end products. A similar behavior has been hypothesized in mitochondria, where protein thiols may play a role in intracellular antioxidant defenses against oxidative damage [31]. Thus, the protective effect played by the reduced protein cysteine residues would not be alternative, but rather complementary, to the OBP-driven scavenging activity of toxic molecules. In fact, previous experiments have shown that the stabilization of the two domains that constitute the protein, (the beta barrel and the carboxy-terminal alpha helix) either by domain swapping or disulfide bridge formation leaves unmodified the ligand binding properties of the monomeric bOBP mutant [32].

OBP over expression could protect, to some extent, *E. coli* cells from the oxidative injuries of hydrogen peroxide and tBuOOH, but not from those induced by menadione (Figures 2–4). Hydrogen peroxide and organic peroxides, including tBuOOH, primarily exert their cytotoxicity in living cells by inducing peroxidation of unsaturated fatty acids, whose main end products are short-chain reactive aldehydes and, in particular, 2-alkenals (including HNE) [2,9]. Therefore, the resistance observed in *E. coli* cells expressing GCC-bOBP might be due mainly to the removal of the toxic end products of lipid peroxidation and eventually to the reactivity of those reduced cysteine residues exposed to the solvent as free thiols [31]. A direct scavenging effect of OBP on tBuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be excluded just on the basis of their molecular weights, which are by far smaller than those of the typical ligands of the protein (150–300 Da). The lower protective effect played by OBP in the case of tBuOOH could be due to the chemical nature of this substance, and in particular to the presence of a tert-butyl radical that provides the molecule with a certain degree of hydrophobicity which is completely lacked in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. This physical property, in fact, might significantly contribute to drive most of the tBuOOH to the cell membrane, where the direct contact with the hydrophobic tails of the unsaturated fatty acids might facilitate their peroxidative transformations.

With regard to the redox-cycling drug menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone), also named vitamin K<sub>3</sub>, its cytotoxicity is due to the production of intracellular superoxide, a reactive radical that, if not transformed immediately into hydrogen peroxide by superoxide dismutase (SOD), can be deleterious for both eukaryotic and bacterial cells also at picomolar concentration levels [33,34]. The mechanisms of superoxide toxicity are the result of a combination of different reactive pathways including reduction of high-potential ferric-cytochromes [35], oxidation of low-potential iron-sulfur clusters [33–37] and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-driven chemical reactions, whose cellular damages, as demonstrated here by the treatments with this same compound discussed above, can be mitigated, at some extent, by OBP. Because iron oxidation is considered the main pathway of biological superoxide it can be hypothesized that the amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by exposure to menadione might be much lower than those produced when cells are directly exposed to hydrogen peroxide itself or to tBuOOH. This may be especially true immediately after the exposition to menadione, when SOD, whose

synthesis is driven by the SoxRS regulon [38,39], is absent or present in low concentrations.

Surprisingly, cells over-expressing GCC-bOBP, although accumulating less recombinant protein, showed more resistance to peroxide-induced oxidative stress than those over-expressing 6H-GCC-bOBP (Figures 2 and 3). Since the binding specificities and affinities of both untagged and tagged GCC-bOBP are super imposable [26,40 and Grolli et al., manuscript in preparation], we assume that the different resistance to oxidative stress of the two strains of bacteria should not be ascribed to the amino terminal hexa-histidine tag impeding HNE and/or other toxic molecules to access the ligand binding site by steric hindrance. We rather hypothesize that, because the metabolism of *E. coli* cells overexpressing 6H-GCC-bOBP is committed almost exclusively to the production of the protein, bacterial cells are unable to activate rapidly enough the appropriate enzymatic protective mechanisms before chemically induced oxidation has produced enough damage to drive most of the cells to death.

Surprisingly, the control cells with EV resisted higher concentrations of menadione than cells overexpressing 6H-GCC-bOBP. We suggest, based on the same reasons stated above, that producing very high levels of 6H-GCC-bOBP may be stressful for the bacterial cells to begin with, and thus they become more prone to the detrimental effects induced by the ROS-generating quinone than the cells that are not overexpressing proteins.

In conclusion, the data from the present investigation show that, although nasal mucosa and the *E. coli* cells transformed with cDNAs expressing OBP are two extremely different biological systems, in both cases sufficient amounts of OBP are present to exert the role of an effective scavenger for toxic ligands, thereby produced by the chemical activity of ROS. Further research, and in particular the characterization of the chemical nature of the ligands bound to GCC-bOBP purified from *E. coli* treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tBuOOH, will aid to shed light on the molecular details of the protective role played physiologically by the protein in living organisms subjected to oxidative stress conditions.

### Acknowledgments

We thank Dr. Héctor Malagón (IFC, UNAM) for his help in antibody production and Dr. Virna Conti (Univ. of Parma) for technical assistance.

### Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This work was partially supported by grants Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Mexico) 128110 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, Mexico) IN203311-3 to D.G.-H. The work was also supported by the bilateral research

project 'MX11MO10' funded by CONACyT (Mexico) and the Italian Minister of Foreign Affairs (MAE, Italy). CONACyT also supported with a fellowship the Ph.D. studies of A.M.-M. (Biochemical Sciences Graduate Program at UNAM, fellowship No 176940).

### References

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC (eds.). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2006.
- [2] Miwa S, Muller FL, Beckman KB. The basics of oxidative biochemistry. In: Miwa S, Beckman KB, Muller FL (eds.). Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
- [3] Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress (review). *Prog Lipid Res* 2003;42:318–343.
- [4] Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes (review). *Free Radic Biol Med* 1991;11:81–128.
- [5] Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products (review). *Free Radic Res* 2010;44:1098–1124.
- [6] Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58:459–481.
- [7] Inlay JA. "Pathways of oxidative damage". *Ann Rev Microbiol* 2003;57:395–418.
- [8] Pérez JM, Arenas FA, Pradenas GA, Sandoval JM, Vásquez CC. Escherichia coli YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *J Biol Chem* 2008;283: 7346–7353.
- [9] Pradenas GA, Díaz-Vásquez WA, Pérez-Donoso JM, Vásquez CC. Monounsaturated fatty acids are substrates for aldehyde generation in tellurite-exposed Escherichia coli. *Biomed Res Int* 2013;2013:563756.
- [10] Grolli S, Merli E, Conti V, Scaltriti E, Ramoni R. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS J* 2006;273:5131–5142.
- [11] Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318:1–14.
- [12] Flower DR, North ACT, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:9–24.
- [13] Lacazette E, Gachon AM, Pitiot G. A novel human odorant-binding protein gene family resulting from genomic duplicons at 9q34: differential expression in the oral and genital spheres. *Hum Mol Genet* 2000;9:289–301.
- [14] Mitchell GB, Clark ME, Siwicki M, Caswell JL. Stress alters the cellular and proteomic compartments of bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;125: 111–125.
- [15] Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH. Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *J Biol Chem* 1990;265:6118–6125.
- [16] Briand L, Eloit C, Nespoulous C, Bézirard V, Huet JC, Henry C, et al. Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* 2002;41: 7241–7252.
- [17] Tegoni M, Ramoni R, Bignetti E, Spinelli S, Cambillau C. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat Struct Biol* 1996; 3:863–867.
- [18] Bianchet MA, Bains G, Pelosi P, Pevsner J, Snyder SH, Monaco HL, Amzel LM. The three-dimensional structure of bovine

- odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat Struct Biol* 1996;3:934–939.
- [19] Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Bonicel J, Cambillau C, Tegoni M. The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry* 1998;37:7913–7918.
- [20] Ramoni R, Spinelli S, Grolli S, Conti V, Merli E, Cambillau C, Tegoni M. Deswapping bovine odorant binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:651–657.
- [21] Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008;77:755–776.
- [22] Mongkolsuk S, Helmann JD. Regulation of inducible peroxide stress responses (review). *Mol Microbiol* 2002;45:9–15.
- [23] Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J Biol Chem* 1982;257:12419–12425.
- [24] Schägger H, Link TA, Engle WD, Von Jagow G. Isolation of the eleven protein subunits of the bcl complex from beef heart. *Methods Enzymol* 1986;126:224–237.
- [25] Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206–210.
- [26] Ramoni R, Bellucci S, Gryczynski Z, Grolli S, Staiano M, De Bellis G, et al. The protein scaffold of the lipocalin odorant-binding protein is suitable for the design of new biosensors for the detection of explosive components. *J Phys-Condens Matt* 2007;19:1–7.
- [27] Studier FW, Moffat BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986;189:113–130.
- [28] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350–4354.
- [29] Volkmer B, Heinemann M. Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *PLoS One* 2011;6:e23126.
- [30] Morein S, Andersson AS, Rilfors L, Lindblom G. Wylde-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “window” between gel and non-lamellar structures. *J Biol Chem* 1996;271:6801–6809.
- [31] Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J* 2010;277:1465–1480.
- [32] Ramoni R, Vincent F, Ashcroft AE, Accornero P, Grolli S, Valencia C, et al. Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *Biochem J* 2002;365:739–748.
- [33] Gort AS, Imlay JA. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J Bacteriol* 1998;180:1402–1410.
- [34] Imlay JA. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* 2006;59:1073–1082.
- [35] Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of  $\text{HO}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$  radicals in aqueous solution. *J Phys Chem* 1985;14:1041–1091.
- [36] Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* 2000;275:29187–29192.
- [37] Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7:55–57; author reply 59–60.
- [38] Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD, Dimple B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6181–6185.
- [39] Tsaneva IR, Weiss B. *saxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1990;172:4197–4205.
- [40] Polverini E, Lardi P, Mazzini A, Sorbi RT, Conti V, Ramoni R, Favilla R. Characterization of a deswapped triple mutant bovine odorant binding protein. *Int J Mol Sci* 2011;12:2294–2314.

## REFERENCIAS

- Aslund F., Zheng M., Beckwith J. and Storz G. 1999. Regulation of the OxyR transcriptional factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 616-65
- Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. (1995). "3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly". *Protein Sci* 4 (12): 2455-68
- Benov L. T. and Fidovich I. 1994. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 269: 25310-14
- Bianchi F., Basini G., Grolli S., Conti V., Bianchi F., Grasselli F., Careri M. and Ramoni R. 2013. An innovative bovine odorant binding protein-based filtering cartridge for the removal of triazine herbicides from water. *Anal. Bioanal. Chem.* 405(2-3): 1067-1075
- Bielski B. H. J. 1985. Reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 14(4): 1041-1091
- Chiang S. M. and Schellhorn E. H. 2012. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. 525(2): 161-69
- Christman M. F. S. and Ames B. N. 1989. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 3484-88
- Choi H., Kim S., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J., Storz G. and Ryu S. 2001. Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell.* 105: 103-13
- Cort A. S. and Imlay I. 1998. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J. Bacteriol.* 180: 1402-10
- Eichinger A., Nasreen A., Kim H. J. and Skerra A. 2007. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of Apolipoprotein D. *J. Biol. Chem.* 282: 31068-75
- Flower D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1-14
- Flower D. R., North A. C. T. and Sansom C. E. 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482: 9-24
- Ganfornina M. D., Do Carmo S., Lora J. M., Torres-Schumann S., Vogel M., Allhorn M., Gonzalez C., Bastiani M. J., Rassart E. and Sanchez D. 2008. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* 7: 506-515
- Greeberg J. T., Monach R., Chou J. H., Josephy P. D. and Demple B. 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 6181-85
- Grolli S., Merli E., Conti V., Escaltriti E. and Ramoni R. 2006. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS J.* 273: 5131-42

- Grzyb J., Latowski D. and Strzalka K. 2006. Lipocalins – a family portrait. *J. Plant Physiology*. 163: 895-915
- Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. 2006. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Hawkes R., Niday E. and Gordon J. 1982. A Dot-Immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem*. 119: 142-7
- Herrmann J. M., Fölsch H., Neupert W. and Stuart R. A. 1994. Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In: Cell Biology: A Laboratory Handbook. Academic Press, San Diego. 538-44
- Imlay J. A. and Fidovich I. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. 266: 6957-65
- Imlay J. A. 2008. Cellular defense against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem*. 77: 755-76
- Imlay J. A. 2013. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol*. 11(7): 443-54
- Jamieson D. J. 1998. Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14: 1511-27
- Korshunov S. and Imlay J. A. 2006. Detection and quantification of superoxide formed within periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 188: 6326-34
- Liochev S. I. and Fridovich I. 2002. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox. Rep*. 7(1): 55–7
- Mailloux J. R., Harper M-E. 2012. Mitochondrial proteotoxicity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 23(9): 451-8
- Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L. and Tolbert N. E. A. 1978. modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 87(1): 206-210
- Miwa S., Muller F. L. and Beckman K. B. 2008. The Basics of Oxidative Biochemistry. En: Miwa S, Beckman K.B, Muller FL editors. Oxidative Stress in Aging: From Model Systems to Human Diseases. Humana Press
- Morein S., Andersson A-S., Rilfors L. and Lindblom G. 1996. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a “Window” between gel and non-lamellar structures. *J. Biol. Chem*. 271(12): 6801-09
- Pomposiello P. J., Bennik M. H. and Demple R. 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to superoxide stress and sodium salicylate. *J. Bacteriol*. 183: 3890-3902
- Pradenas GA, Díaz-Vásquez WA, Pérez-Donoso JM, Vásquez CC. Monounsaturated Fatty Acids Are Substrates for Aldehyde Generation in Tellurite-Exposed *Escherichia coli*. 2013. *Biomed Res Int*. 2013:563756
- Ramoni R., Vincent F., Grolli S., Conti V., Malosse C., Boyer F. D., Nagnan-Le Meillour P., Spinelli S., Cambillau C. and Tegoni M. 2001. The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein. *J. Biol. Chem*. 276: 7150-55

- Ramoni R., Spinelli S., Grolli S., Conti V., Merli E., Cambillau C. and Tegoni M. 2008. Deswapping bovine odorant binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784: 651-57
- Sanchez D., Ganfornina M. D. and Bastiani M. J. 2000. Lazarillo, a neuronal lipocalin in grasshoppers with a role in axon guidance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482: 102-9
- Schägger H., Link T. A., Engle W. D., and von Jagow G. 1986. Isolation of the eleven protein subunits of the *bc<sub>1</sub>* complex from beef heart. *Methods Enzymol.* 126: 224-37
- Schellhorn H. E. and Hassan H. M. 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 170: 4286-92
- Seaver L. C. and Imlay J. A. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 7173-81
- Srinivasan C., Liba A., Imlay J. A., Valentine J. S. and Gralla E. B. 2000. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 275(38): 29187-29192
- Studier F. W. and Moffat B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-30
- Tardat B. and Touati D. 1991. Two global regulators repress the anaerobic expression the MnSOD in *Escherichia coli*: Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic regulation control). *Mol. Microbiol.* 5: 455-65
- Tegoni M., Ramoni R., Bignetti E., Spinelli S. and Cambillau C. 1996. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nat. Struct. Biol.* 3: 8663-67
- Tegoni M., Pelosi P., Vincent F., Spinelli S., Campanacci V., Grolli S., Ramoni R. and Cambillau C. 2000. Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482: 229-40
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-54
- Tzaneva I. R. and Weiss B. 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 4197-4205
- Uchida K. 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 42(4): 318-43
- Walker D. W., Muffat J., Rundel C. and Benzer S. 2006. Overexpression of a *Drosophila* homolog of Apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr. Biol.* 16(7): 674-79
- Zheng M., Wang X., Templeton L., Smulski D., LaRossa R. and Storz G. 2001. DNA microarray-mediated transcriptional of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183(15): 4562-70