



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Purificación y caracterización de la enzima glutatión reductasa de levadura

Alumno: Juan Carlos López Quesada

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUTATIÓN REDUCTASA DE LEVADURA

Alumno: Juan Carlos López Quesada

Julio, 2018

RESUMEN

La Glutatión reductasa (GR) se encuentra presente en la mayoría de los organismos eucariotas y procariotas, siendo una enzima casi universal. Su función es la de catalizar la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), en una reacción dependiente de NADPH.

El presente trabajo aborda el proceso de purificación de la enzima GR a partir de un producto comercial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante procesos de cromatografía líquida y el estudio de su estabilidad a los cambios producidos mediante pruebas de caracterización. Se emplea para su detección su actividad reductora dependiente de NADPH.

ABSTRACT

Glutathione reductase (GR) is present in most eukaryotic and prokaryotic organisms, being an almost universal enzyme. Its function is to catalyze the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to reduced glutathione (GSH), in a NADPH-dependent reaction.

This work approaches the purification process of the GR enzyme from a commercial product of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by means of liquid chromatography processes and the study of its stability to the changes produced by characterization tests. Its NADPH-dependent reducing activity is used for its detection.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Estrés oxidativo y efectos sobre las células.....	5
1.1.1. <i>Efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre la célula.....</i>	<i>5</i>
1.2. Defensa contra estrés oxidativo.....	6
1.3. Glutatión (GSH).....	7
1.4. Glutatión reductasa (GR).....	8
1.4.1. <i>Mecanismo de reacción.....</i>	<i>11</i>
1.5. Purificación de glutatión reductasa.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Reactivos.....	13
3.2. Lisado celular y homogeneización.....	14
3.3. Fraccionamiento proteico con sulfato amónico.....	14
3.4. Cromatografías líquidas en columna.....	15
3.5. Diálisis y concentración de muestras.....	16
3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	16
3.7. Ensayo de actividad GR.....	17
3.8. Determinación de la concentración de proteínas.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Primera purificación.....	18
4.2. Segunda purificación.....	24
4.3. Pruebas de caracterización.....	30
4.3.1. <i>Concentración óptima de glutatión oxidado.....</i>	<i>31</i>
4.3.2. <i>Medida de pH óptimo de la disolución tampón.....</i>	<i>32</i>
4.3.3. <i>Temperatura óptima del extracto de purificación de levadura.....</i>	<i>33</i>

4.3.4. Ciclos de congelación con nitrógeno líquido.....	34
5. CONCLUSIONES.....	36
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés oxidativo y efectos sobre las células.

El estrés oxidativo se produce por la exposición de un organismo a moléculas altamente oxidantes como los radicales libres de oxígeno, pudiendo también ser generadas por el metabolismo de la propia célula. Aunque en menor medida el estrés oxidativo también puede ser generado por la disfunción de los mecanismos de control y señalización celular mediados por los circuitos redox tiólicos (Jones, 2006).

Los radicales libres de oxígeno, conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), son derivados del oxígeno muy reactivos, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$), el radical perhidroxilo ($HO_2^{\cdot}$) y el radical peroxil ($ROO^{\cdot}$), así como también el productor de estos radicales, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies reactivas de oxígeno son producidas por:

- a) Procesos metabólicos normales, como la respiración aeróbica.
- b) El sistema immune, para destruir patógenos.
- c) Sustancias químicas externas.

La toxicidad de estos radicales es debida a su capacidad de dañar diferentes componentes celulares, siendo los más dañinos, el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno.

1.1.1. Efectos de las especies reactivas de oxígeno sobre la célula.

Los resultados de estudios realizados sobre la oxidación de aminoácidos de las proteínas por las ROS indican que dicha oxidación puede ocasionar fragmentación de la cadena polipeptídica, oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos y la formación de uniones proteína-proteína (Stadtman,

2006). Las oxidaciones de los aminoácidos dan lugar a derivados carbonilados, derivados hidroxilados y otros aminoácidos. La oxidación de estos aminoácidos puede producir cambios conformacionales en las proteínas, de tal forma que se altere la funcionalidad de las mismas.

El estrés oxidativo también causa la peroxidación de los lípidos produciendo una pérdida de la integridad de la membrana celular (Coyle y Puttfarcken, 1993). La peroxidación lipídica comprende una serie de reacciones oxidativas en cadena que afectan en mayor medida a los ácidos grasos insaturados, que debido a la presencia de dobles enlaces reaccionarán en mayor medida con las ROS.

El ADN nuclear y mitocondrial es otro de los componentes celulares clave que es susceptible a las especies reactivas de oxígeno, especialmente el radical hidroxilo produce roturas en la doble cadena, así como pérdida de las bases nitrogenadas (Storz et al., 1987). La mitocondria es el orgánulo principal de la célula donde se genera anión superóxido. El daño que se produce sobre el ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear.

1.2. Defensa contra estrés oxidativo

Para protegerse contra el daño causado por estrés oxidativo las células poseen sistemas antioxidantes celulares, entre los que se encuentran enzimas antioxidantes y moléculas antioxidantes reparadoras del daño. Algunas actividades reparadoras se expresan durante el crecimiento normal de la célula, mientras que otras se expresan en respuesta a estrés oxidativo.

Las moléculas antioxidantes son un grupo de moléculas de naturaleza muy diversa entre las que se incluyen el tripéptido glutatión y la tioredoxina (Valko et al., 2006).

Las enzimas antioxidantes están formadas por un grupo de enzimas que actúa de forma coordinada y que se encuentran implicadas en la inactivación del radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. Entre ellas se encuentran la

superóxido dismutasa, la catalasa, las peroxidasas, la tiorredoxina reductasa y la glutatión reductasa.

Dentro de estos grupos de moléculas y enzimas antioxidantes nos centraremos en el glutatión, y más específicamente en la glutatión reductasa por su implicación en este trabajo.

1.3. Glutatión (GSH)

El glutatión (GSH) (Figura 1) es el principal compuesto tiólico no proteico, que se encuentra presente en todos los organismos aerobios desde las bacterias (Fahey, 2001) hasta los animales (Meister y Anderson, 1983). El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por los aminoácidos, glutamato, cisteína y glicina. Se suele encontrar en una concentración de en torno a 5 mM en las células y más del 90 % se encuentra en su forma reducida. El GSH presenta dos importantes características estructurales:

- Un enlace tipo γ entre los residuos de ácido glutámico y de cisteína, el cuál le protege de las proteasas (Meister y Anderson, 1983).
- Un grupo tiól libre del residuo de cisteína, que al oxidarse el glutatión forma un puente disulfuro entre dos moléculas de glutatión, que da lugar al disulfuro de glutatión, o glutatión oxidado (GSSG). Debido a que el potencial de reducción del par GSH/GSSG es tan bajo, el glutatión tiene gran tendencia a oxidarse y por tanto se le confiere un elevado carácter reductor.

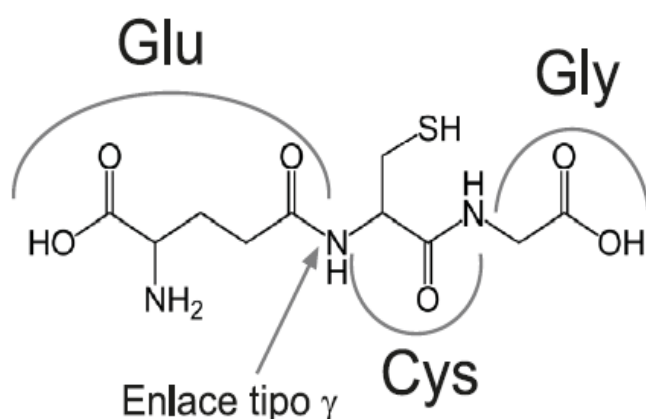


Figura 1: Estructura del glutatión (GSH). Glu: residuo del ácido glutámico, Cys: residuo de cisteína, Gly: Residuo de glicina. El sulfhidrilo (tiol), sirve como donador de electrones y es responsable de la actividad biológica del glutatión.

Además del mantenimiento de la homeostasis celular redox como molécula antioxidante, también desempeña otras funciones en la célula, como son:

- Mantenimiento del equilibrio redox intracelular: El glutatión está involucrado en la formación y protección de los grupos tiólicos de proteínas y enzimas, además de otras moléculas no proteicas.
- Formación de desoxirribonucleótidos precursores del ADN.
- Transporte y almacenamiento de ciertos aminoácidos.
- Detoxificación de compuestos xenobióticos y otros agentes tóxicos.
- Detoxificación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

1.4. Glutatión reductasa (GR)

La glutatión reductasa (EC 1.8.1.7) es una enzima ubicua que se localiza en todos los organismos que poseen glutatión (Meister y Anderson, 1983).

El glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la glutatión reductasa en una reacción dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), a glutatión reducido (Collinson y Dawes, 1995), como se muestra en

la figura 2, el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de lipoperóxidos (L-OOH) (Figura 3). La primera vez que se observó la actividad de esta enzima fue hacia 1930, y posteriormente se ha aislado de diversas fuentes desde bacterias hasta animales (Avval y Holmgren, 2009).



Figura 2: Reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) a glutatión reducido (GSH) dependiente de NADPH.

La GR (Figura 3) de levadura es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro, cada subunidad contiene 467 aminoácidos con un peso molecular de 51578 Daltons, y en su estructura presenta un segmento N-terminal flexible de 18 aminoácidos con un residuo de cisteína en la posición 2 y 4 dominios estructurales bien definidos (Pinto et al, 1985):

- Dominio unido al flavín adenín dinucleótido (FAD).
- Dominio de unión al NADPH.
- Dominio central.
- Dominio de interfase.

Ambos monómeros presentan residuos de unión al glutatión oxidado (GSSG), por lo que ninguno de ellos presenta actividad enzimática por sí mismo ya que su sitio de unión para el sustrato y su sitio catalítico están compuestos por residuos de ambas subunidades (Cisneros, 1995).

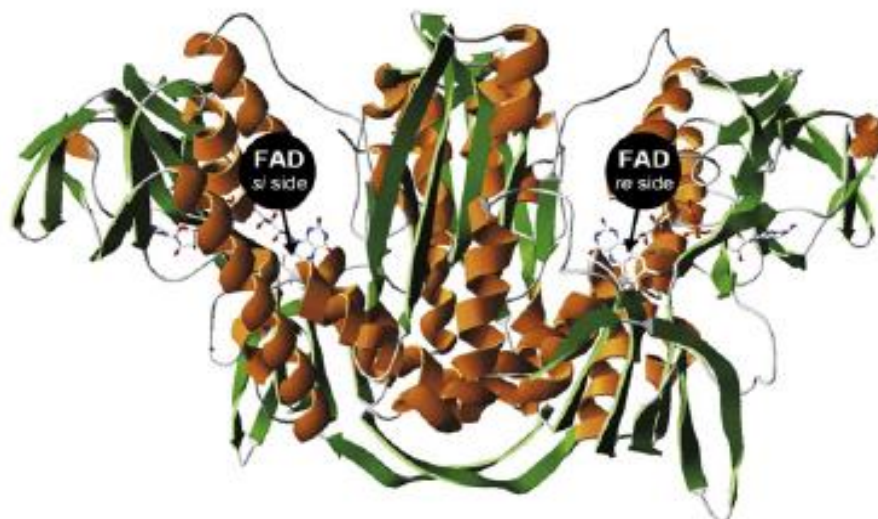


Figura 3: Estructura de GR. Vista frontal de la GR con una molécula de FAD unida a cada subunidad. (Deponte, 2013).

Existen diferentes isoformas de la GR en el citosol de la célula tanto en procariotas como en eucariotas, por lo que existen diferencias estructurales dependiendo del organismo en el que se encuentran. Las subunidades de GR en humanos están unidas por un enlace disulfuro de cisteína (Savvides y Karplus, 1996) en contraste con las isoformas de GR de la levadura y *E. coli* (Yu y Zhou, 2007). Otros restos de cisteína mal conservados como por ejemplo el residuo Cys239 de la GR de la levadura a menudo están expuestos al disolvente y podrían desempeñar una función reguladora (Deponte, 2013).

Además de las isoformas de GR que se encuentran en el citosol también existen otras isoformas de esta enzima en la matriz mitocondrial y en los cloroplastos (Kelner y Montoya, 2000). Estas isoformas a menudo están codificadas por codones de inicio alternativos en el marco del mismo gen. En la levadura, el equilibrio entre las isoformas parece depender de la secuencia de ARNm que flanquea el codón de inicio (Outten y Culotta, 2004).

1.4.1. Mecanismo de reacción

El mecanismo de catálisis que se produce en la GR, también denominado mecanismo de ping-pong (Deponete, 2013), se produce gracias a la separación existente entre el sitio de unión del NADPH y el del GSSG. Este mecanismo comprende una semirreacción reductora y una oxidativa (Figura 4). Primero, la enzima se reduce por NADPH para después transferir los electrones al GSSG, regenerando la enzima oxidada.

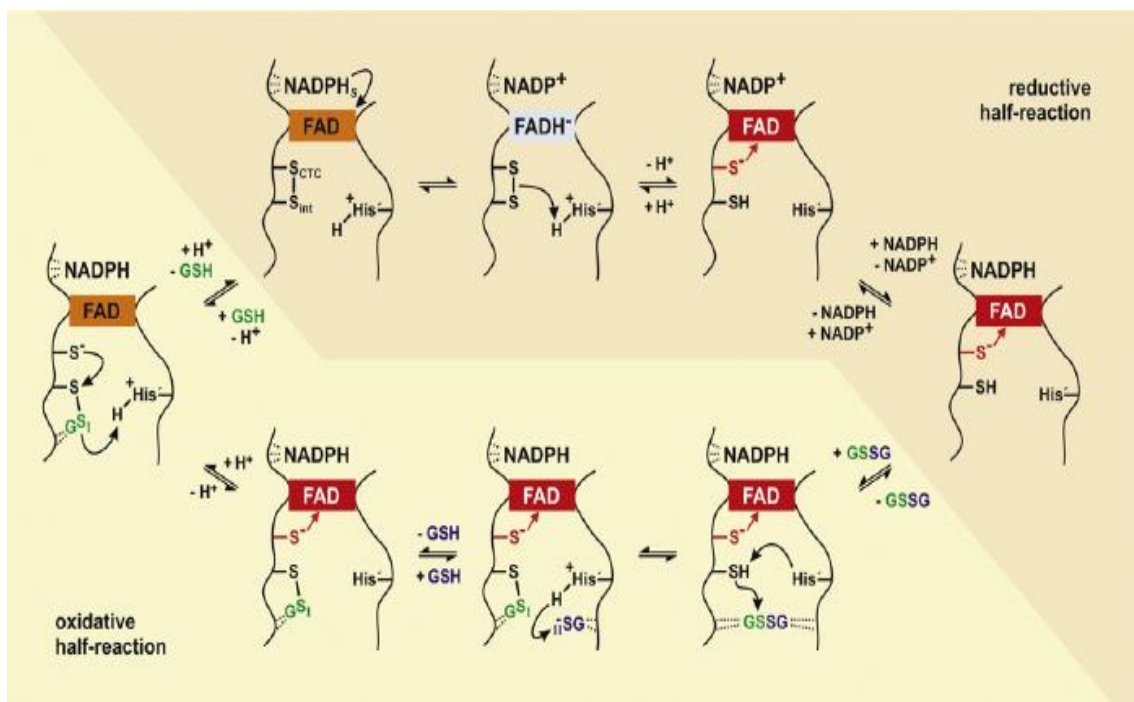


Figura 4: Modelo de catálisis de GR. El sitio de unión de NADPH está en la parte superior y el sitio de unión de GSSG está en la parte inferior. El complejo de transferencia de carga se resalta en rojo.(Deponete, 2013)

Para que se pueda producir la reacción catalítica se requiere que se produzca la reducción del sitio activo por el NADPH, produciendo una semiquinona del FAD, un radical sulfuro y un tiol. Por esto, la enzima adopta un papel central en el metabolismo del glutatión al unir el grupo de NADPH celular con el conjunto de tiol / disulfuro.

La síntesis de GR está inducida especialmente por estrés oxidativo y nitrosativo (Minami et al., 2003; Seo et al., 2006; Tekman et al., 2008). Además se ha demostrado que la sobreexpresión de esta enzima protege frente al daño producido por ROS en microorganismos, animales y plantas (Grant et al., 1996; Mockett et al., 1999; Fujii et al., 2000; Li et al., 2003).

Se ha demostrado que el sistema GPx/GR está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasas/catalasa (SOD/CAT), aunque ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ y a bajas concentraciones actúa la GPx (Cisneros, 1995).

1.5. Purificación de glutatión reductasa

Como ya se ha dicho anteriormente, la primera vez que se observó la actividad de la glutatión reductasa fue hacia 1930, aunque fue purificada por primera vez en 1955 en el departamento de Bioquímica de la Universidad de Yale (Racker, 1955). Esta primera purificación se realizó a partir de levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*) y hígado de vaca, y en ella se estudió el efecto de diferentes sales sobre la disolución de enzima, la estabilidad en presencia o ausencia de ellas y se hizo un test colorimétrico a la disolución de enzima purificada (Racker, 1955).

Desde la primera purificación, se han realizado muchas otras purificaciones, empezando a usar el fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía líquida (Mavis y Stellwagen, 1967; Mize y Langdon, 1961).

En la actualidad los métodos cromatográficos han mejorado, consiguiendo así mejores purificaciones. Se ha demostrado que la cromatografía de afinidad (Ulus, 2005) da buenos resultados de enriquecimiento, consiguiendo ser la más usada.

En este trabajo se ha tratado de purificar Glutatión reductasa a partir de una muestra comercial de levadura de pan (*S. cerevisiae*) utilizando diferentes procedimientos de purificación, centrándose en los métodos cromatográficos.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo Fin de Grado trata la purificación de la enzima glutatión reductasa a partir de una muestra comercial de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando para su detección su actividad reductora de GSSG dependiente de NADPH y se estudiarán las condiciones más adecuadas y efectivas para la obtención de la máxima cantidad de proteína y pureza.

Los objetivos específicos propuestos para este proyecto son principalmente:

- Purificación de la enzima glutatión reductasa mediante métodos de cromatografía líquida.
- Caracterización de la actividad de la glutatión reductasa purificada en función de la concentración de sustrato, resistencia a la temperatura y actividad a diferentes valores de pH.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Reactivos.

Persulfato amónico (PSAM), albumina de suero bovino (BSA), cocktail de inhibidores de proteasas (Ref. P-9599), Trizma Base ($\geq 99.9\%$), Triton X-100, fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, 98%) y L-glutatión oxidado (GSSG, $\geq 98\%$) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Tetrametiletilendiamida (TEMED), ditioneitol (DTT) y disolución acrilamida-bisacrilamida (30% p/v, 19:1) fueron de Bio Rad. Zimoliasa 20T fue suministrada por US Biologicals. EDTA ($\geq 99\%$) y Sulfato amónico ($\geq 99.5\%$) fueron suministrados por Panreac AppliChem. NADPH ($\geq 97\%$ (HPLC)) y fosfato potásico dihidratado ($\geq 99.5\%$) fueron suministrados por Merck Millipore, y la levadura prensada sólida (500g, Cinta Roja Artesana) fue suministrada por AB Mauri.

3.2. Lisado celular y homogeneización.

25g de levadura solida prensada, marca CINTA ROJA, se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron en mortero de porcelana. A este pulverizado se le añadió una disolución de 100 mL a pH 7,5 que contiene Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, PMSF 1 mM, DTT 0,1 mM y Triton X-100 0,1 % p/v. Junto a ésta disolución se le añadió 25 µL de inhibidores de proteasas y 25 mg de Zimoliasa 20T. Esta disolución se sonicó inmersa en baño de hielo utilizando un sonicador (Bandelin Sonopuls HD 2070) durante 1 hora. Después de éste proceso, la disolución se centrifugó a 10000xg durante 30 min a una temperatura de 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, que corresponde a lo que se denomina el extracto libre de células (ELC).

3.3. Fraccionamiento proteico con sulfato amónico.

El extracto libre de células (ELC) se puso en un baño de hielo a 4 °C y en agitación. A esta disolución se le añadió lentamente sulfato de amonio hasta un determinado porcentaje de saturación siguiendo las indicaciones de un programa informático (Ammonium Sulfate Calculator; www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm). Tras la adición de la correspondiente cantidad de sulfato amónico, la disolución se centrifuga a 10000xg y 4°C durante 10 min, se recupera el sobrenadante y se reserva el precipitado. Al sobrenadante se le mide la actividad enzimática y si la actividad es considerable, se continúa añadiendo sulfato amónico hasta otro porcentaje, repitiendo dicha acción para tener datos sobre la cantidad de enzima deseada que ha precipitado. Los precipitados con mayor actividad fueron disueltos en el tampón correspondiente para la próxima etapa de cromatografía.

3.4. Cromatografías líquidas en columna.

Las cromatografías usadas en los distintos pasos de purificación fueron:

- Cromatografía hidrofóbica. Una columna de Fenil-sefarosa (GE Healthcare) de 1x15 cm fue equilibrada con tampón Tris-HCl 50mM a pH 7,5 y 1,2 M de sulfato amónico. Tras la aplicación de la muestra en la columna, la proteína retenida se eluyó con tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 o con dicho tampón en gradiente de concentración de 1,2 a 0 M de sulfato amónico. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min, regulado por una bomba peristáltica (GILSON minipuls 3) y se recolectaron las fracciones con un colector automático (Redifrac de Pharmacia Biotech).
- Cromatografía líquida de intercambio iónico. Una columna de DEAE sefarosa de 2x4 cm fue equilibrada con tampón Tris-HCl 20mM a pH 8. Tras la aplicación de la muestra en la columna, la proteína retenida se eluyó con dos disoluciones de tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8 con 0,1 y 0,5M de NaCl, consecutivamente. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min, regulado por una bomba peristáltica (GILSON minipuls 3) y se recolectaron las fracciones con un colector automático (Redifrac de Pharmacia Biotech).
- Cromatografía líquida de intercambio iónico en columna Q-UNO (BioRad), acoplada en un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) Bio Logic DuoFlow. La columna fue equilibrada con tampón Tris-HCl 20mM a pH 8. Tras la aplicación de la muestra en la columna, la proteína retenida se eluyó con tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8 en gradiente de concentración de 0 a 1 M de NaCl. El flujo de la cromatografía fue de 1 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 mL con el colector automático del propio equipo.
- Cromatografía líquida de exclusión molecular de alta resolución en columna Superose 6HR (Amersham BioSciences), acoplada a un equipo FPLC Bio Logic DuoFlow. La columna fue equilibrada con tampón Tris-HCl 20mM a pH 8. El flujo de la cromatografía fue de 0,2 ml/min. Se

recolectaron fracciones de 1 mL con el colector automático del propio equipo.

3.5. Diálisis y concentración de muestras.

Para cambiar las características químicas del disolvente de las muestras se empleó la diálisis, consistente en introducir la muestra en una membrana tubular (Spectra/Por 1 Dialysis Membrane) y sumergirla en un volumen de tampón mucho mayor al de la muestra durante al menos 12 horas a 4°C.

Para concentrar muestras se utilizaron tubos Spin-X UF Concentrator (CORNING) sometidos a 3000xg a 4°C durante 35 min.

3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para la electroforesis de proteínas se fabricó gel de poliacrilamida con dos partes bien diferenciadas:

- El gel separador que contiene un 12% p/v de acrilamida, 4,6 % p/v Tris-HCl, 0,1 % p/v dodecilsulfato sódico (SDS), pH 8,8.
- El gel concentrador con 5% p/v de acrilamida, 1.5% p/v Tris-HCl, 0,1% p/v dodecilsulfato sódico, pH 6,8.

La polimerización de la acrilamida se produjo añadiendo 10 µL de PSAM al 10% p/v y 3µL de TEMED por mililitro de disolución.

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

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

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

40 % v/v metanol) y desteñidos con la misma disolución pero sin el colorante.

3.7. Ensayo de actividad GR.

El ensayo enzimático de actividad consistió en una disolución de 100 μL que contiene 0,1 mM NADPH y 1mM de Glutation oxidado (GSSG) en tampón fosfato potásico 20mM a pH 7,2. Tras la adición de la muestra, se analiza por espectrofotometría el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH y reducción del GSSG a GSH.

Se define una unidad enzimática (U) de éste proceso, como la actividad catalítica necesaria para consumir 1 μmol de NADPH por minuto considerando un coeficiente de extinción para el NADPH de $6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mL}} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{340}}{\text{min}}\right) \times V \times 10^6}{v \times \epsilon \times d}$$

Figura X: Ecuación de cálculo de la actividad enzimática. V: volumen de reacción (L); ϵ : coeficiente de extinción molar; d: paso de luz de la cubeta de espectrofotometría (1cm); v: volumen de muestra (ml).

3.8. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración proteica de las diferentes muestras ensayadas en el estudio se determinó siguiendo el método de Bradford, utilizando el reactivo Protein Assay Dye Concentrate Solution (BioRad) y una disolución estándar de BSA (1 mg/ml) para establecer un patrón de referencia proteína-absorbancia. La medida se hizo por espectrofotometría de absorbancia a 595 nm de longitud de onda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Éste estudio plantea la purificación de la enzima Glutatión reductasa a partir de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando para su detección su actividad reductora sobre el glutatión oxidado (GSSG).

Las células fueron obtenidas de un producto comercial de levadura de pan y tratadas como se describe en Materiales y Métodos. Para la rotura celular se intentó que el medio de homogeneización tuviera una serie de compuestos que contribuyeran a preservar la estructura de las proteínas y la actividad enzimática de la enzima en cuestión. Se incluyó PMSF y EDTA como compuestos inhibidores de proteasas. El Tritón-X100 ayuda a la disolución de las membranas celulares y el DTT se incluyó en el medio de homogeneización para evitar que se formen enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de las proteínas. La Zimoliasa 20T se añadió ya que contribuye a la degradación de la pared celular. La lisis celular se produjo por sonicación, ya que produce burbujas de cavitación en la disolución que provocan la rotura celular. La disolución final se centrifuga para precipitar partículas insolubles y el sobrenadante, constituye el extracto libre de células (ELC) que es considerado el material de partida de la purificación.

A dicho extracto se le realizaron una primera serie de medidas de actividad enzimática por espectrofotometría y de determinación de concentración de proteínas, para tener una idea de la cantidad inicial de enzima antes de iniciar la purificación.

4.1. Primera purificación

El primer paso de purificación fue el fraccionamiento proteico mediante la adición de sulfato de amonio al extracto libre de células. En primer lugar se hicieron pruebas para saber en qué rango de saturación

de sulfato amónico precipita la GR, debido a que el sulfato amónico se rodea de moléculas de agua, disminuyendo así la solubilidad de las proteínas, lo que provoca la interacción entre ellas y su precipitación. Por tanto, se llevó a cabo la precipitación a distintos porcentajes de saturación de sulfato de amonio y se analizó la actividad GR en la fracción soluble remanente tras cada paso de precipitación.

Como se muestra en la Figura X, los resultados de estas pruebas muestran un aumento de actividad enzimática en la fracción soluble tras la precipitación proteica a bajos porcentajes de saturación. Esto puede ser debido a la posible precipitación de alguna proteína o molécula enmascarante de dicha actividad. Conforme se aumenta el porcentaje de saturación de sulfato de amonio y la consiguiente precipitación de la GR, se observa un descenso de actividad en la fracción soluble debido a la precipitación de la enzima.

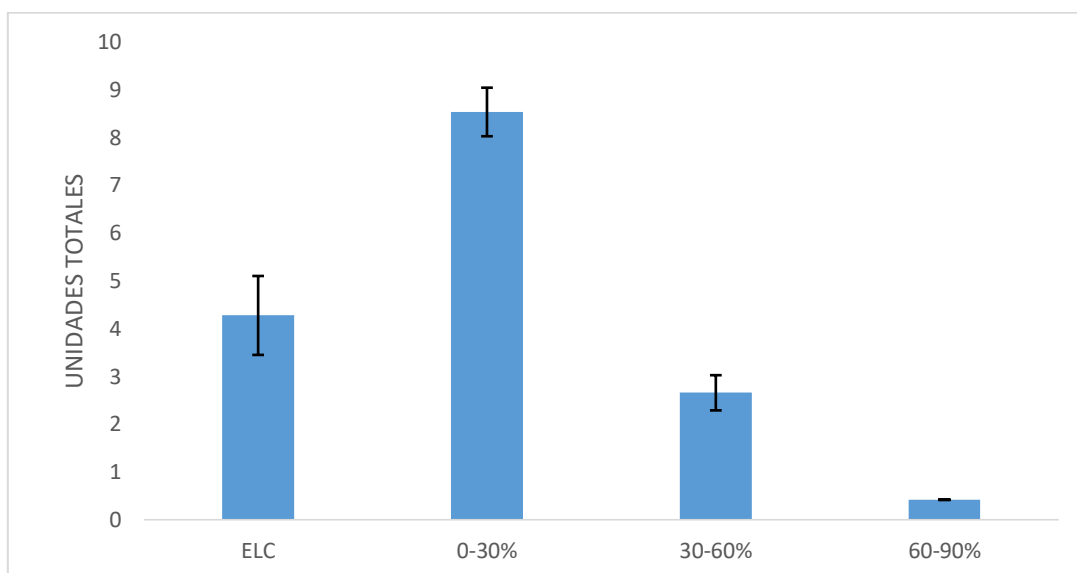


Figura X: Actividad GR mostrada por el ELC y por las fracciones solubles tras distintos rangos de saturación de sulfato de amonio. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres medidas realizadas a cada muestra.

En el rango 30-60% la actividad permanece soluble a aproximadamente un 70% con respecto al ELC. En el rango del 60-90%, la actividad soluble fue aproximadamente un 10% con respecto a la inicial.

Por tanto, se reunieron los precipitados proteicos del fraccionamiento entre el 30-60% y el 60-90%, que se disolvieron en tampón Tris-HCl 50mM, pH 7,5 y 1M de sulfato amónico.

El siguiente paso de la purificación fue la cromatografía líquida hidrofóbica. La muestra resultante del fraccionamiento con sulfato amónico se pasó a través de una columna de fenil sefarosa, equilibrada con tampón Tris-HCl 50mM, pH 7,5 y 1M de sulfato amónico. La retención en esta columna se produce debido a interacciones hidrofóbicas con las proteínas, ya que el sulfato amónico se rodea de moléculas de agua, disminuyendo así la solubilidad de éstas en agua.

Tras lavar la columna con el tampón de equilibrio, se cambió la fase móvil a tampón sin sulfato amónico, por lo que la solubilidad de las proteínas en agua aumentó y se eluyeron.

Se recolectaron fracciones de 5 ml a las que se les midió su actividad y la cantidad total de proteína por absorbancia a 280 nm. El cromatograma resultante se muestra en la Figura X.

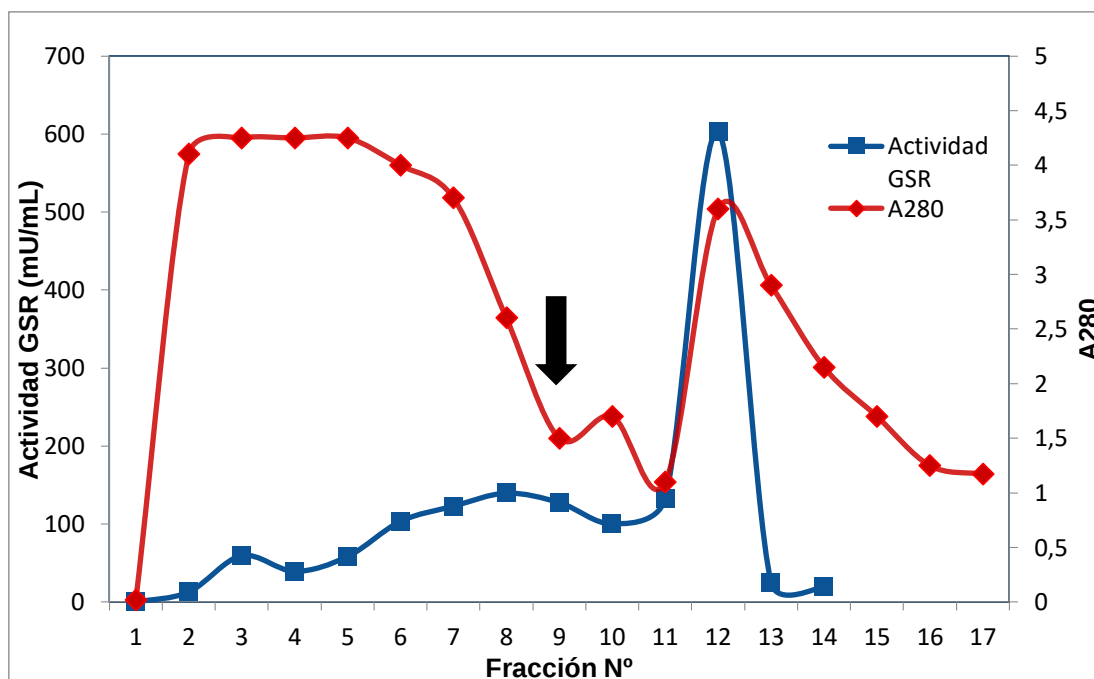


Figura X: Cromatografía hidrofóbica. La línea roja muestra la absorbancia a 280 nm y la línea azul muestra la actividad de la glutatión reductasa. La flecha indica el cambio de fase móvil.

Como se muestra en el cromatograma, la enzima glutatión reductasa quedó retenida en la columna hidrofóbica y fue eluida en un único pico bien definido al suprimir el sulfato amónico de la fase móvil.

Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de actividad eluido en el gradiente, conformando la muestra para la siguiente cromatografía y cuya concentración de proteína y actividad se muestran en la Tabla 1.

A continuación de la cromatografía hidrofóbica se intentó probar con una cromatografía de intercambio iónico en columna Q-UNO equilibrada en Tris-HCl 20 mM a pH 8 acoplada a un equipo FPLC.

Como paso preparatorio para la cromatografía de intercambio iónico, la muestra debe ser tratada para eliminar la alta concentración de sales, por este motivo la muestra proveniente de la cromatografía hidrofóbica fue dializada en 1L de tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8.

Tras la diálisis, se determinó la concentración de proteína y la actividad GR, destacándose una considerable pérdida de actividad en la muestra (Tabla 1).

Tras el paso por la columna, se aplicó un gradiente de 0-1M de NaCl y se regeneró con el mismo tampón a alta concentración de NaCl. Se recolectaron fracciones de 5 ml a las que se les midió su actividad y la cantidad total de proteína por absorbancia a 280 nm. En este paso se observó que la actividad no quedó retenida por lo que se recuperó en el flow-through. Al fallar este paso de purificación, se decidió para la siguiente purificación utilizar una columna de DEAE sefarosa. El resultado de esta cromatografía se muestra en la Tabla 1.

La tabla de purificación muestra los resultados y el enriquecimiento obtenido en todos los pasos de este primer proceso de purificación.

Purificación y caracterización de la enzima glutatión reductasa de levadura.

	Volumen (mL)	proteína (mg/mL)	Act. (mU/mL)	Act. Total (mU)	Act. Esp. (mU/mg)	R (%)	E (%)
ELC	100	4,16	136,7	13670	32,86	100	1
FSA	25	12,7	648,4	16210	51,05	118,5	1,5
CH	40	1,9	534,4	21376	281,26	156,3	8,5
Diálisis	52	0,49	71	3692	144,89	27,0	4,4
Q-UNO	50	0,58	75	3750	129,31	27,4	3,9

Tabla 1: Balance de purificación de la actividad glutatión reductasa de levadura. R: Rendimiento, muestra el porcentaje de actividad total de la muestra resultante con respecto a la muestra original. E: Enriquecimiento, indica el número de veces que es más pura en actividad con respecto a la muestra original.

Como se observa en la tabla, en la precipitación con sulfato amónico no se produce un gran aumento en el rendimiento por lo que para un próximo proceso de purificación se decide aplicar un rango de saturación más ajustado. La cromatografía hidrofóbica muestra un gran aumento en el enriquecimiento y en la actividad, por ello se decidió que para el próximo proceso de purificación se hará en gradiente de concentración de sulfato amónico. En el proceso de diálisis de la muestra, se observó una gran pérdida de actividad y rendimiento. Una posible explicación a este detrimento podría ser que debido a la presión osmótica la muestra contenida en la bolsa de diálisis aumentó tanto en volumen que podría haber afectado a la turgencia de la membrana de diálisis y a su porosidad, por lo que podría haber escapado gran parte de la enzima glutatión reductasa contenida en la muestra. La cromatografía de intercambio iónico en columna Q-UNO no resultó satisfactoria porque no retuvo a la enzima, por lo que se decidió usar para el próximo proceso de purificación otra matriz cromatográfica de intercambio iónico, la DEAE sefarosa.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para analizar el contenido en proteínas de las muestras implicadas en la purificación (Figura X). En la electroforesis se aprecia una disminución en el número de bandas de proteína en las sucesivas muestras purificadas. Por otro lado, se puede observar una

destacada banda de proteína de tamaño en torno a 50 kDa que pudiera corresponder al monómero de la enzima GR.

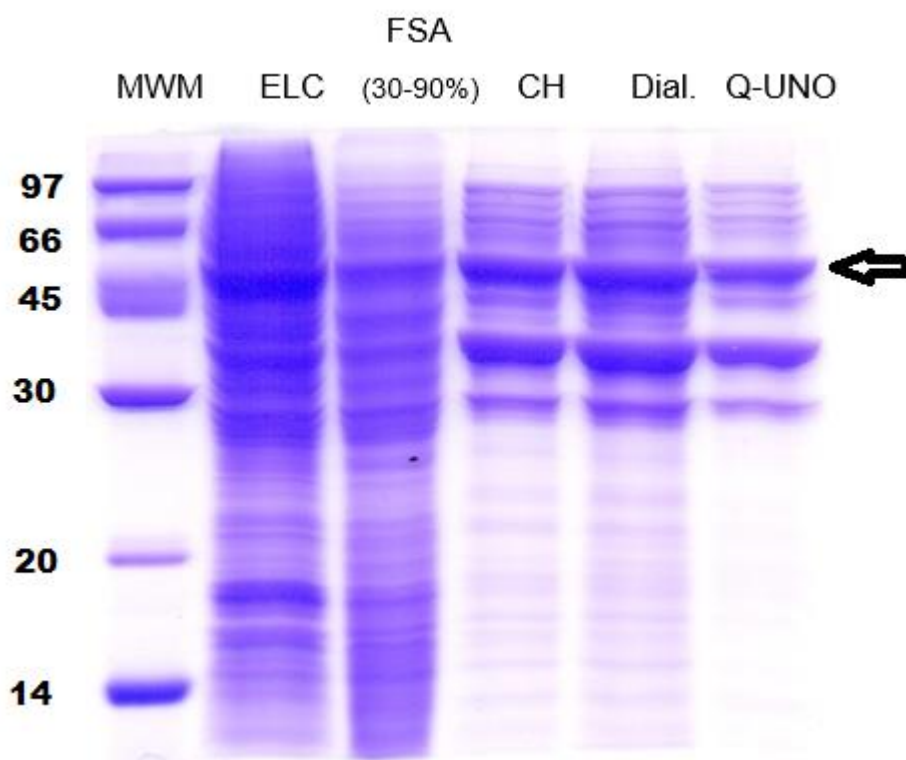


Figura X: SDS-PAGE de las muestras del primer proceso de purificación. MWM: Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (kDa) se indica al lado de cada banda (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare). La flecha negra indica la banda correspondiente al monómero de la enzima glutatión reductasa.

El fraccionamiento con sulfato amónico tuvo un resultado discreto en cuanto a la exclusión de proteínas del ELC. La cromatografía hidrofóbica supuso una exclusión muy significativa de bandas de bajo peso molecular, así como la concentración de dos bandas proteicas, de 40 y 60 KDa. La diálisis no supuso un cambio significativo en la exclusión de proteínas. La cromatografía de intercambio iónico en columna Q-UNO, aunque resultó ser insatisfactoria al no poder retener la enzima, supuso una significativa pérdida de bandas, particularmente las de bajo peso molecular.

4.2. Segunda purificación

Se realizó otro proceso de fraccionamiento con sulfato de amonio usando otros rangos de saturación (Figura X) con el fin de obtener un precipitado enriquecido en enzima GR con el que continuar el proceso de purificación.

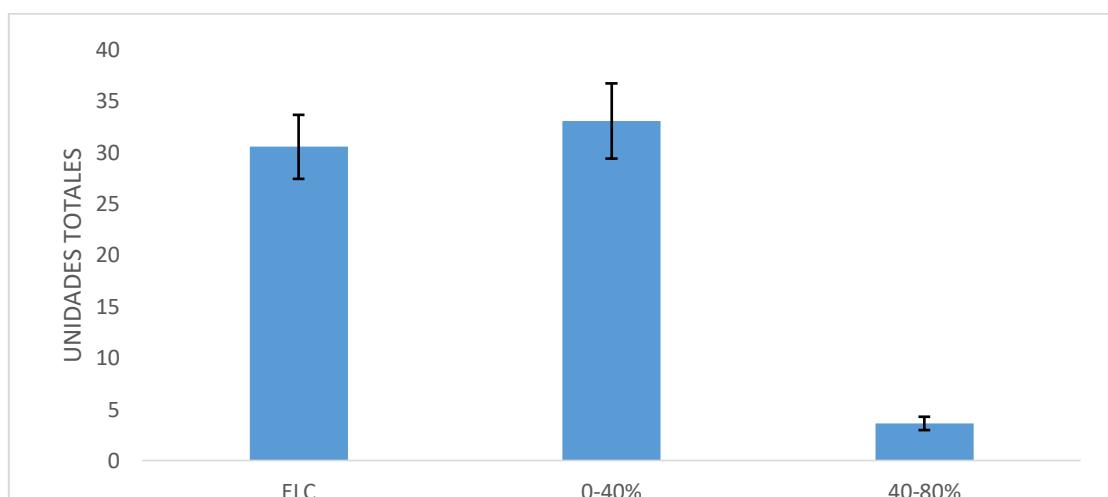


Figura X: Actividad mostrada por el ELC a distinta saturación de sulfato de amonio desde el punto inicial. Se muestra un aumento de la actividad a bajos porcentajes de saturación. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres medidas realizadas en cada caso.

En el rango del 40-80%, la actividad soluble fue aproximadamente un 10% con respecto a la inicial, consiguiéndose un mayor porcentaje de actividad en el precipitado. Por tanto, se continuó la purificación con el precipitado proteico del fraccionamiento entre el 40-80%, que se disolvió en tampón Tris-HCl 50mM, pH 7,5 y 1M de sulfato amónico.

Similar al proceso de purificación anterior, se realizó una cromatografía líquida hidrofóbica en columna de fenil sefarosa, con las mismas condiciones de equilibrado que en el caso anterior, esto es, con tampón Tris-HCl 50mM, pH 7,5 y 1M de sulfato amónico. Sin embargo, en este caso, tras pasar la muestra a través de la columna y lavarla con dicho tampón, se aplicó un gradiente decreciente de sulfato de amonio, de 1 a 0 M,

para eluir la enzima absorbida en la columna. Para terminar de eluir y regenerar la columna, se aplicó el tampón de equilibrio sin sulfato de amonio. Se recolectaron fracciones de 5 ml a las que se les midió su actividad y la cantidad total de proteína por absorbancia a 280 nm. El cromatograma resultante se muestra en la Figura X.

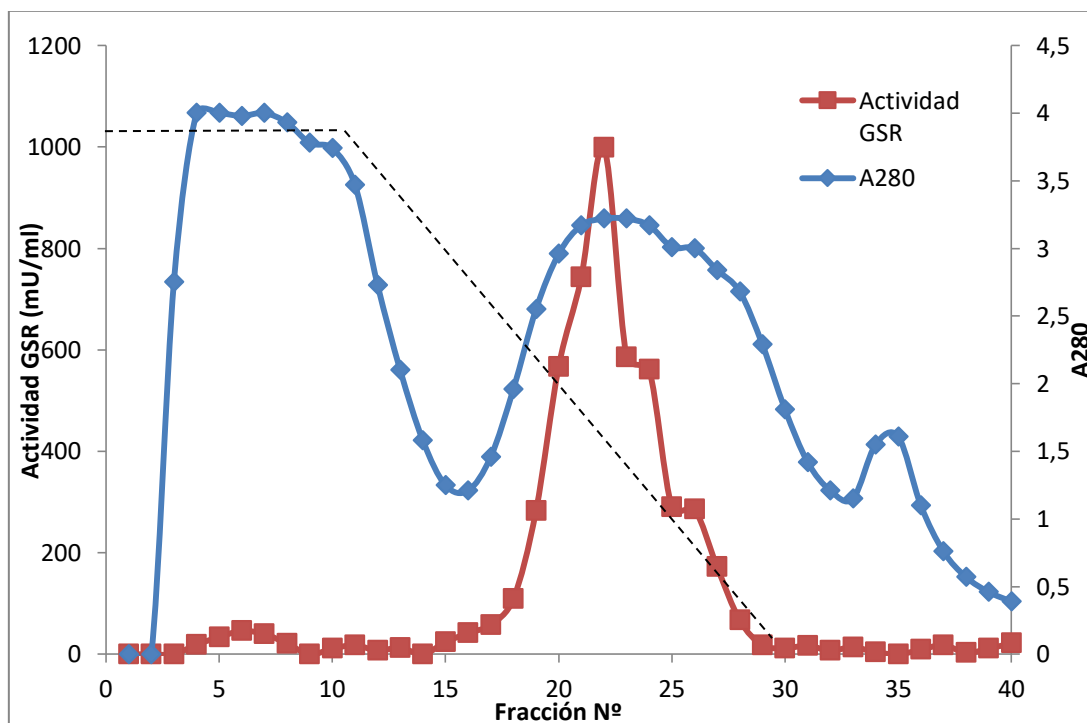


Figura X: Cromatografía hidrofóbica. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm y la línea roja muestra la actividad de la glutatión reductasa. La línea discontinua indica el gradiente de concentración de sulfato de amonio.

Como se muestra en el cromatograma, la enzima glutatión reductasa fue eluída en un único pico bien definido hacia mitad del gradiente. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de actividad eluido, conformando la muestra para la siguiente cromatografía. La concentración de proteína y actividad enzimática de la muestra resultante se muestran en la Tabla 2.

A continuación de la cromatografía hidrofóbica se realizó una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE sefarosa. No obstante, antes de realizar dicha cromatografía se dializó la muestra en tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8, teniendo en cuenta que el posible

incremento de volumen de la muestra por presión osmótica no afectase a la turgencia de la bolsa de diálisis.

La columna de DEAE sefarosa se equilibró con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8. Tras introducir la muestra en la columna de DEAE, se lavó con el tampón de equilibrio y se pasó un gradiente creciente de 0 a 0,5 M de cloruro sódico para eluir las proteínas adsorbidas en la columna. Posteriormente, se aplicó un tampón de mayor concentración de cloruro sódico para regenerar la columna. Se recolectaron fracciones de 5 ml a las que se les midió su actividad y la cantidad total de proteína por absorbancia a 280 nm. El cromatograma resultante se muestra en la Figura X.

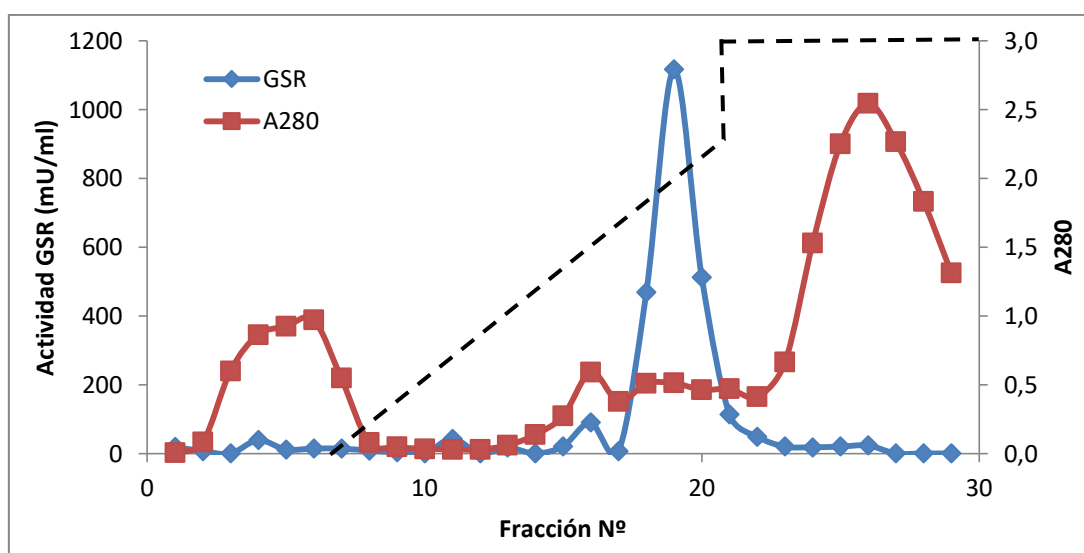


Figura X: Cromatografía de intercambio iónico. La línea roja muestra la absorbancia a 280 nm y la línea azul muestra la actividad de la glutatión reductasa. La línea discontinua indica el gradiente de concentración de NaCl.

La enzima glutatión reductasa fue eluída en un único pico bien definido hacia mitad del gradiente. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de actividad, conformando la muestra para el siguiente paso de purificación, y cuya concentración de proteína y actividad se muestran en la Tabla 2.

Como último paso se realizó una cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6HR (Amersham Biosciences), acoplada a un equipo FPLC. En las cromatografías de exclusión molecular, la retención

se produce en función del tamaño de los poros de la matriz cromatográfica. Las moléculas más pequeñas, al acceder al espacio de los poros, permanecen más retenidas en su paso a través de la columna, las moléculas grandes sin embargo pasan más rápido al no quedarse retenidas. Esta cromatografía presenta la limitación de que el volumen de muestra máximo que se puede introducir en la columna no debe exceder del 1% del volumen de la columna, por lo que debido a esto el volumen de la muestra debe ser reducido.

Para reducir el volumen de muestra se utilizaron tubos de centrífuga Spin-X UF Concentrator (CORNING), que contienen una membrana porosa que permite el paso del disolvente y moléculas de bajo peso molecular, reteniendo y concentrando así a las de mayor peso molecular. La muestra perdió mucha actividad enzimática (datos no mostrados), posiblemente debido a cierto grado de ineficacia en la retención de la enzima de la membrana del dispositivo. Tras introducir la muestra por la columna se continuó aplicando tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, a un flujo de 0,2 mL/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml a las que se le midió su actividad y se les analizó el contenido en proteína. El cromatograma resultante se muestra en la Figura X.

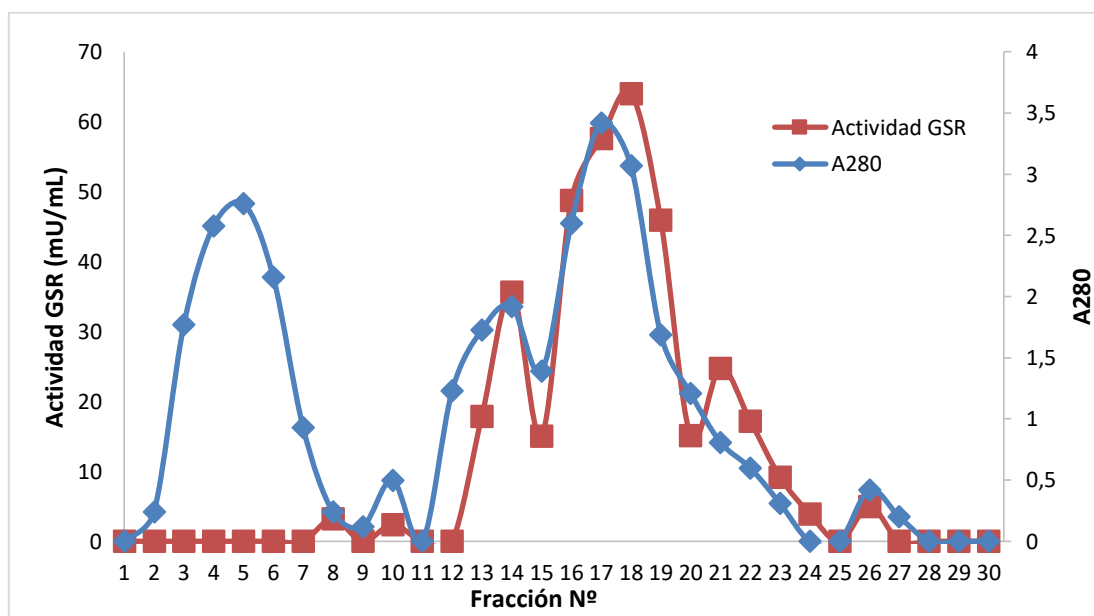


Figura X: Cromatografía de exclusión molecular. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm y la línea roja muestra la actividad de la glutatión reductasa.

Como se ve en el cromatograma, la elución de la muestra se ha producido en tres picos continuos, recolectando como muestra resultante final de la purificación solamente el pico de mayor magnitud.

Los resultados de la cantidad de proteína y actividad se muestran en la Tabla 2.

	Volumen (mL)	proteína (mg/mL)	Act. (mU/mL)	Act Total (mU)	Act. Esp. (mU/mg)	R (%)	E (%)
ELC	100	5,7	305,77	30577	53,64	100	1
FSA	20	16,8	1586,35	31727	94,42	103,7	1,7
CH	40	2,47	513,75	20550	207,99	67,2	3,8
DEAE	15	0,54	738,66	11079,9	1367,89	36,2	25,5
EM	4	0,08	34,50	138,004	431,26	0,45	8,0

Tabla 2: Balance del segundo proceso purificación de la actividad glutatión reductasa de levadura. R: Rendimiento, muestra el porcentaje de actividad total de la muestra resultante con respecto a la muestra original. E: Enriquecimiento, indica el número de veces que es más pura en actividad con respecto a la muestra original.

Al observar los resultados de ambas tablas para la precipitación con sulfato amónico, podemos constatar que se obtiene un grado de purificación similar, si acaso ligeramente superior, al de la primera purificación, por lo que el ajuste del rango de fraccionamiento no ha sido muy eficaz.

Los cromatogramas de las cromatografías hidrofóbicas realizadas en este trabajo son similares en cuanto al perfil de elución de la enzima. No obstante, no hubo mejora en cuanto al enriquecimiento de la enzima al aplicar un gradiente de concentración de sulfato amónico.

Las cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE sefarosa supuso un significativo avance en el proceso de purificación ya que se logró incrementar el grado de enriquecimiento en gran magnitud, aunque supuso la pérdida de más del 50% de la actividad total inicial.

Aparentemente, la cromatografía de exclusión molecular no fue efectiva para el proceso de purificación ya que disminuyó el grado de enriquecimiento con respecto a la muestra precedente, aunque este hecho puede ser debido a la pérdida de enzima en el proceso de concentración de la muestra.

En este caso también se realizó una electroforesis SDS-PAGE para analizar el contenido en proteínas de las muestras implicadas en la purificación (Figura X).

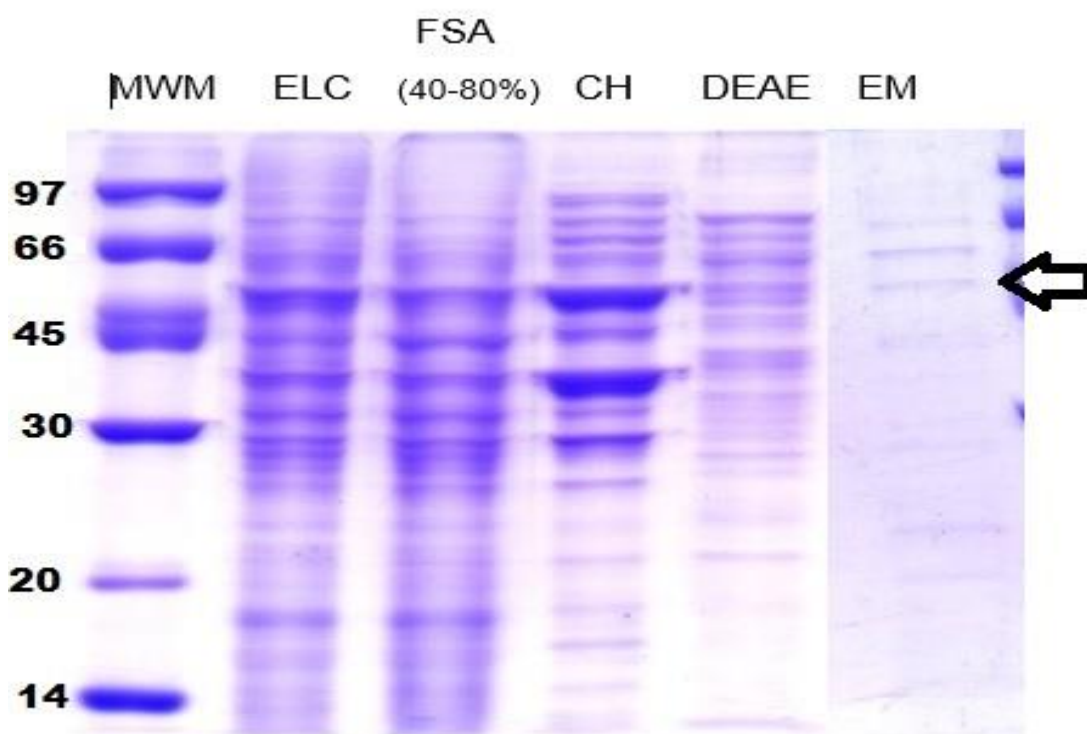


Figura X: SDS-PAGE de las muestras de la segunda prueba de purificación. MWM: Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (kDa) se indica al lado de cada banda (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare). La flecha negra indica la banda posiblemente correspondiente a la enzima glutatión reductasa.

En el fraccionamiento proteico con sulfato amónico no se observa una significativa exclusión de proteínas con respecto al ELC. Igual que en el anterior proceso de purificación, en la cromatografía hidrofóbica aparecen concentradas dos proteínas de peso molecular entre 40 y 60 KDa, junto con una significativa pérdida de bandas de bajo peso molecular. Sin embargo, dichas bandas de proteína parecen desaparecer con la cromatografía de

intercambio iónico. En la cromatografía de exclusión molecular se observa la desaparición de numerosas bandas de proteínas, destacando dos bandas de proteína más intensas, de tamaño de 50 y 60 kDa. En base al tamaño del monómero de la enzima glutatión reductasa, la banda de proteína de tamaño 50 kDa pudiera ser la enzima objeto de purificación.

Con los pasos de purificación realizados y los resultados obtenidos, se ha podido destacar que aun siendo usado en anteriores purificaciones (Mavis y Stellwagen, 1967; Williams et al., 1967), el fraccionamiento con sulfato de amonio no aporta casi enriquecimiento a la purificación, pero si ha conseguido concentrar la cantidad de proteína del extracto libre de células, además de mostrar un aumento de actividad a bajos porcentajes de saturación.

Conociendo los resultados de éste trabajo y de anteriores investigaciones realizadas sobre ésta enzima (Racker, 1955; Mize, 1962; Ulusu 2005), se destaca el hecho de que la cromatografía líquida se establece como uno de los procedimientos con mejores resultados del proceso total de purificación, siendo la cromatografía de intercambio iónico la que supuso un gran avance en el proceso de purificación.

4.3. Pruebas de caracterización

Para constatar la degradación de la enzima debido a los cambios de temperatura y comprobar los puntos óptimos de medida de los reactivos usados para la medida de actividad, se hicieron una serie de pruebas de caracterización utilizando como muestra una preparación purificada por fraccionamiento con sulfato amónico de la enzima glutatión reductasa, que tenía una actividad media de 137,1 mU/mL.

4.3.1. Concentración óptima de glutatión oxidado.

La primera prueba se basó en la medida de actividad disminuyendo la concentración de glutatión oxidado en un 50% consecutivamente desde la concentración de 1mM utilizada en los ensayos de actividad de las pruebas de purificación realizadas. Los resultados se muestran en la Figura X.

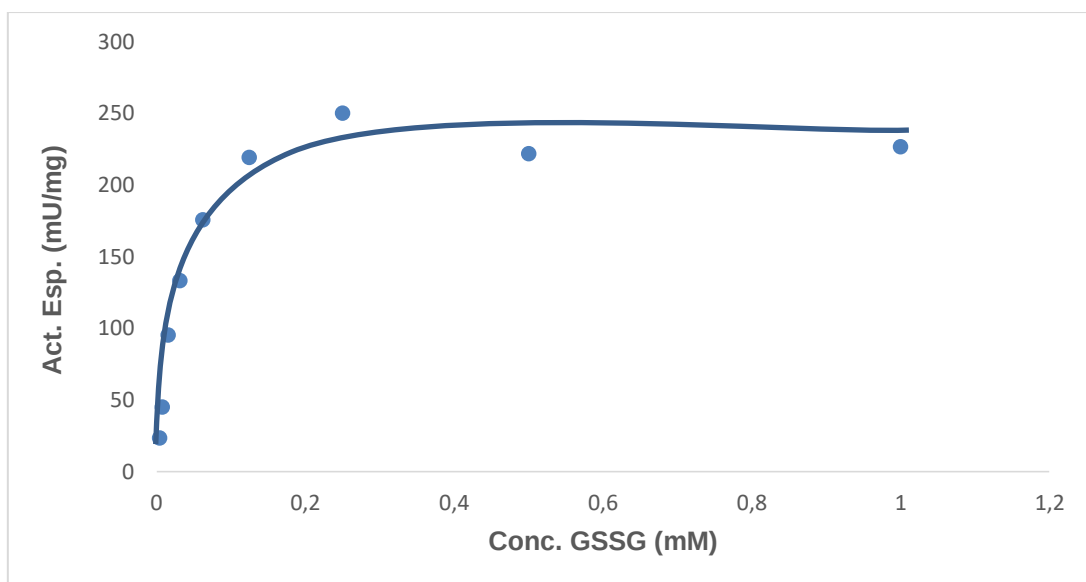


Figura X: ensayos de actividad glutatión reductasa, modificando la concentración de sustrato (GSSG). Los resultados medios se muestran en medida de actividad específica (mU/mg).

La tendencia de la curva parece seguir la cinética de Michaelis Menten, mostrando un mayor valor de actividad específica a concentración de 0,25 mM de glutatión oxidado (GSSG), sin modificar la concentración de los demás reactivos ni de la enzima en la medida.

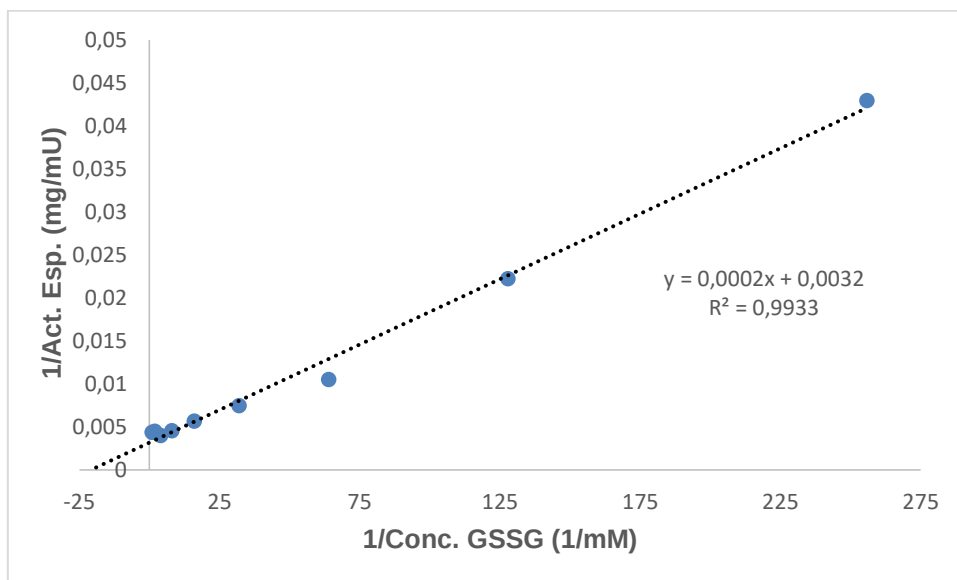


Figura X: Representación Lineweaver-Burk a partir de los datos de ensayos de actividad glutatión reductasa modificando la concentración de sustrato (GSSG).

A partir de la representación de Lineweaver-Burk (Figura X) se determinó el valor del punto de corte de la recta con el eje de abscisas, siendo éste, $-1/K_m$. Con dichos datos se calculó la constante de Michaelis (K_m), con un valor de 0,05 mM.

4.3.2. Medida de pH óptimo de la disolución tampón.

Esta prueba se basó en la medida de actividad modificando el pH del tampón fosfato potásico utilizado en los ensayos de actividad de las pruebas de purificación realizadas. Los resultados se muestran en la Figura X

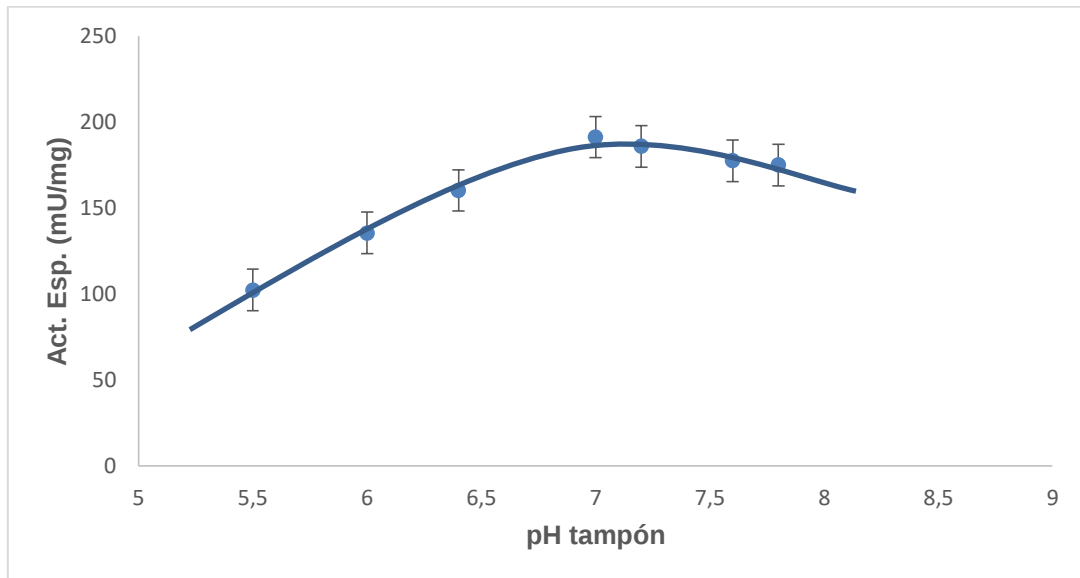


Figura X: ensayos de actividad glutatión reductasa, modificando el pH del tampón fosfato potásico. Los resultados medios se muestran con barras de error indicando la desviación estándar de tres medidas realizadas.

En éste caso la tendencia de la curva sigue pareciéndose a la cinética de Michaelis Menten, teniendo el valor de actividad mayor a pH 7.

4.3.3. *Temperatura óptima del extracto de purificación de levadura.*

Para ésta prueba se modificó la temperatura del extracto de purificación utilizado, partiendo desde la temperatura ambiente hasta temperaturas mayores. Los resultados. Los resultados se muestran en la Figura X.

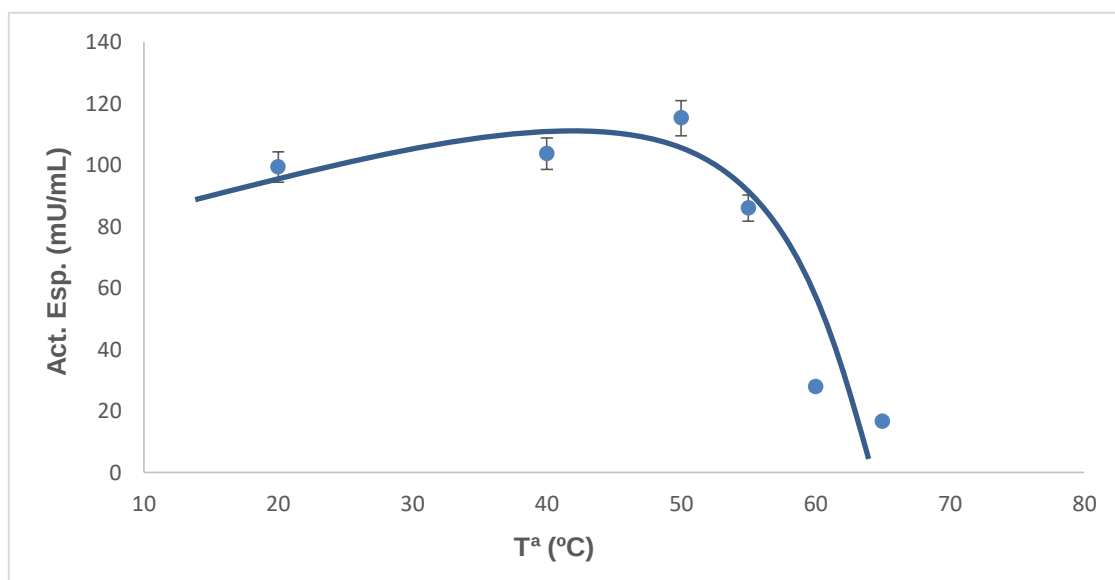


Figura X: ensayos de actividad glutatión reductasa, modificando la temperatura del extracto de purificación de levadura utilizado. Los resultados medios se muestran con barras de error indicando la desviación estándar de tres medidas realizadas.

La gráfica muestra un aumento de actividad en torno a 50 °C, el cuál disminuye rápidamente a temperaturas mayores, debido a la degradación de la enzima. Para cada medida, se observa un efecto de recuperación de actividad después de introducir la muestra en hielo.

4.3.4. Ciclos de congelación con nitrógeno líquido.

Ésta prueba se realizó debido a la degradación de la muestra observada al realizar la cromatografía líquida de exclusión molecular. Se tomaron tres alícuotas de 100 µL del extracto de purificación utilizado y se introdujeron en viales eppendorf de 1mL, los cuales se sumergieron parcialmente durante 10 segundos en nitrógeno líquido hasta congelación de la muestra y se descongelaron a temperatura ambiente, simulando el uso diario de la muestra. Al descongelarse se les midió su actividad glutatión reductasa a cada vial y se repitió el proceso, mostrando los resultados en la figura X.

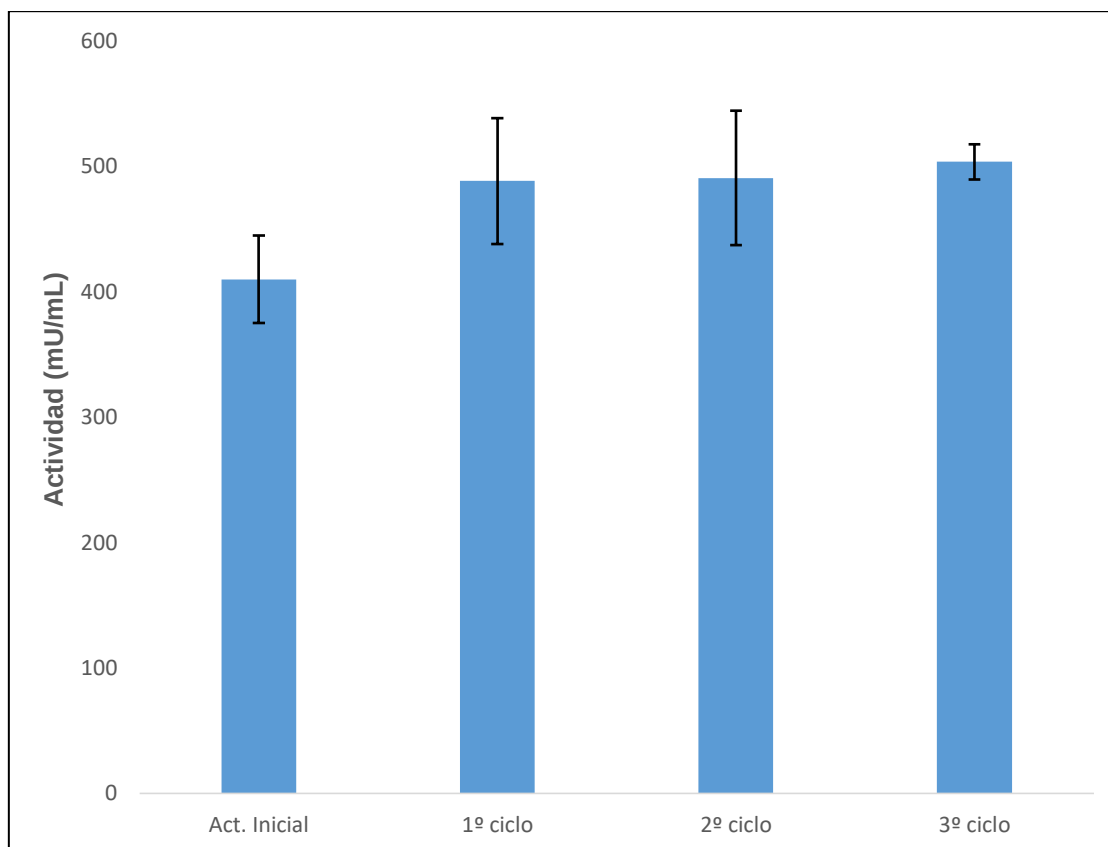


Figura X: ensayos de actividad glutatión reductasa, tras 3 ciclos de congelación en nitrógeno líquido del extracto de purificación de levadura utilizado. Los resultados se muestran con barras de error indicando la desviación estándar de tres medidas realizadas.

Al contrario de lo que se supuso, la actividad de la enzima glutatión reductasa no se degrada después de varios ciclos de congelación y descongelación, sino más bien se nota un ligero incremento de actividad, siendo significativo el aumento entre la actividad inicial y la actividad después del tercer ciclo.

Las pruebas de caracterización realizadas al purificado de prueba han mostrado resultados ya antes vistos (Pinto et al. 1985; Anderson et al., 1990), siendo el aumento de actividad de la enzima después de congelación en nitrógeno líquido, un resultado no constatado en otros estudios de purificación.

5. CONCLUSIONES

- El fraccionamiento con sulfato amónico constituye un paso de purificación poco eficaz, obteniéndose sólo un pequeño aumento en cuanto a la actividad enzimática.
- Las diálisis y la concentración por centrifugación han resultado puntos críticos de fallo debido a la pérdida de enzima ocurrida mediante su realización, siendo pasos poco útiles para el proceso de purificación.
- Como muestra la electroforesis, no se ha obtenido una purificación a homogeneidad, quedando bandas de proteínas no deseada para esta purificación, siendo necesaria la realización de otra cromatografía para conseguir dicha purificación a homogeneidad.
- Las pruebas de caracterización han establecido la estabilidad de la GR purificada con respecto a distintos cambios realizados, siendo el más útil la estabilidad de dicha enzima a los procesos de congelación y descongelación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. V; Hess, J. L; Chevone, B. I. (1990). Purification, characterization, and immunological properties for two isoforms of glutathione reductase from eastern white pine needles. *Plant Physiology*, 94(3), 1402-1409.
- Avval, F. Z; Holmgren, A. (2009). Molecular mechanisms of thioredoxin and glutaredoxin as hydrogen donors for Mammalian s phase ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (13), 8233-8240.
- Cisneros Prego, E. (1995). La glutatión reductasa y su importancia biomédica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14 (1), 0-0.

- Collinson, L.P; Dawes, I.W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1, encoding glutathione reductase. *Gene*, 156 (1), 123-127.
- Coyle, J.T; Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262 (5134), 689-695.
- Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830 (5), 3217-3266.
- Fahey, R. C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 55, 333-356.
- Fujii, T; Hamaoka, R; Fujii, J; Taniguchi, N. (2000). Redox capacity of cells affects inactivation of glutathione reductase by nitrosative stress. *Archives of biochemistry and biophysics*, 378(1), 123-130.
- Grant, C. M; Collinson, L. P; Roe, J. H; Dawes, I. W. (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular microbiology*, 21(1), 171-179.
- Jones, D.P. (2006). Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 163 (1–2), 38-53.
- Kelner, M. J; Montoya, M. A. (2000). Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(2), 366-368.
- Li, Y; Hugenholtz, J; Abee, T; Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5739-5745.
- Mavis, R. D; Stellwagen, E. (1968). Purification and subunit structure of glutathione reductase from bakers' yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 243(4), 809-814.
- Meister, A; Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711-760.
- Minami, Y; Kohama, T; Sekimoto, Y. J; Akasaka, K; Matsubara, H. (2003). Isolation and Characterization of Glutathione Reductase from

- Physarum polycephalum and Stage-Specific Expression of the Enzyme in Life-Cycle Stages with Different Oxidation-Reduction Levels. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5), 317-323.
- Mize, C. E; Langdon, R. G. (1962). Hepatic glutathione reductase I. Purification and general kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 237(5), 1589-1595.
 - Mockett, R. J; Sohal, R. S; Orr, W. C. (1999). Overexpression of glutathione reductase extends survival in transgenic *Drosophila melanogaster* under hyperoxia but not normoxia. *The FASEB journal*, 13(13), 1733-1742.
 - Outten, C. E; Culotta, V. C. (2005). Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 388(1), 93-101.
 - Pinto, M. C; Mata, A. M; López-Barea, J. (1985). The redox interconversion mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase. *European Journal of Biochemistry*, 151, 275-281.
 - Racker, E. (1955). Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem*, 217(2), 855-865.
 - Savvides, S. N; Karplus, P. A. (1996). Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 8101-8107.
 - Seo, J. S; Lee, K. W; Rhee, J. S; Hwang, D. S; Lee, Y. M; Park, H. G; Lee, J. S. (2006). Environmental stressors (salinity, heavy metals, H₂O₂) modulate expression of glutathione reductase (GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic toxicology*, 80(3), 281-289.
 - Stadtman, E.R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40 (12), 1250-1258.
 - Storz, M; Christman, F; Sies, H; Ames, B.N (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (24), 8917-8921.
 - Tekman, B; Ozdemir, H; Senturk, M; Ciftci, M. (2008). Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(2), 117-121.
- Ulusu, G; Erat, M; Çiftçi, M; Şakiroğlu, H; Bakan, E. (2005). Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(5), 1109-1117.
 - Valko, M; Rhodes, C.J; Moncol, J; Izakovic, M; Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1), 1-40.
 - Williams, C. H; Zanetti, G; Arscott, L. D; McAllister, J. K. (1967). Lipoamide Dehydrogenase, Glutathione Reductase, Thioredoxin Reductase, and Thioredoxin a simultaneous purification and characterization of the four proteins from *Escherichia coli* b. *Journal of Biological Chemistry*, 242(22), 5226-5231.
 - Yu, J; Zhou, C. Z. (2007). Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(4), 972-979.