



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Purificación de Tiorredoxina Reductasa de mamífero

Alumno/a: María José Maya Flores

Julio, 2021



Trabajo Fin de Grado

PURIFICACIÓN DE TIOREDOXINA REDUCTASA DE MAMÍFERO

Alumno/a: María José Maya Flores

JAÉN, Julio 2021

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT.....	4
1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Características y función de la tiorredoxina reductasa.....	5
1.2. Sistema tiorredoxina	8
1.3. Tiorredoxina	9
1.4. Funciones de la tiorredoxina	12
1.5. Tiorredoxina y sus principales funciones biológicas	14
2. OBJETIVO GENERAL.....	15
2.1. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	15
3.1. Reactivos	15
3.2. Preparación del extracto Libre de Células (ELC)	16
3.3 Técnicas de purificación de la Tiorredoxina reductasa. Cromatografías.....	16
3.4. Diálisis y concentración de la Tiorredoxina reductasa: Método de Bradford .	17
3.5. Técnicas de catacterización de la tiorredoxina reductasa.....	17
3.5.1. Ensayo de actividad enzimática	17
3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5. CONCLUSIÓN.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28
7. ABREVIATURAS.....	32
8. Anexo I. Certificado participación charla “Prevención de Riesgos Laborales y Seguridad en Laboratorios para estudiantes de Trabajo Fin de Grado”	34

RESUMEN

La Tiorredoxina reductasa (TRR), junto con el NADPH y la tiorredoxina (TR) forma el sistema tiorredoxina (TR). Este sistema es antioxidante y es clave por su contribución para la defensa contra el estrés oxidativo, y en cuanto a respuesta inmunitaria, juega un papel importante en lo que refiere a muerte celular.

Esto es posible por su cooperación en reacciones redox mediante la oxidación de su centro activo entre sus estados diatómico y disulfuro, este sistema está presente en todos los organismos como bacterias, virus, plantas...

La TRR de mamífero es una selenoproteína, estas proteínas se caracterizan por tener un residuo de selenocisteína, el cual es el principal responsable de la actividad enzimática.

En la actualidad, la purificación de proteínas se realiza mediante ingeniería genética, pero su proceso es costoso y requiere de mucho tiempo.

En este estudio se va a tratar de purificar dicha proteína, utilizándose para ello diferentes técnicas de purificación para obtener la máxima cantidad posible de proteína.

Abstract

Torredoxin reductase (TRR) together with NADPH and thioredoxin (TR) forms the thioredoxin system (TR). This system is antioxidant and it is the key contributor to defense against oxidative stress, and in terms of immune response, plays an important role in cell death.

This is posible due to its cooperation in redox reactions by oxidation of its active center between its diaryl and disulfide states.

This system is present in all organisms such as bacteria, viruses, plants...

Mammalian TRR is a selenoprotein, these proteins are characterized by having a selenocysteine residue, which is mainly responsible for enzymatic activation.

Currently, protein purification is performed by genetic engineering, but the process is expensive and time- consuming.

In this study we are going to try to purify this protein, carrying out different purification techniques to obtain the maximum possible amount of protein.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características y función de la tiorredoxina reductasa

La Tiorredoxina reductasa (EC 1.8.1.9), es un homodímero compuesto por 316 residuos, actúa como antioxidante junto con el NADPH. Su principal función es reducir a la tiorredoxina, ya que es la única proteína capaz de hacerlo, a este conjunto de proteínas se le conoce como el sistema tiorredoxina.



Fig 1. Forma tetramérica de selenoproteína de tiorredoxina reductasa en rata. (Base de datos Pubmed).

La tiorredoxina reductasa es una potente proteína disulfuro oxidoreductasa, y pertenece a la familia de piridina nucleótido, la cual está presente en todos los organismos. (Arnér y Holmgren, 2000).

También cabe destacar que es una flavoproteína homodímera, dependiente de FAD, en la que además utiliza el NADPH como donador de electrones. Los miembros de la familia más conocidos son la lipoamida deshidrogenasa, la glutatión reductasa, el mercúrico reductasa y peroxirredoxinas. (Arnér y Holmgren, 2000).

En cuanto a estructura y mecanismo, se recalca que las TRRs se clasifican en dos grupos, puesto que difieren entre sí en dichos aspectos. Por una parte se encuentra la TRR de bajo peso molecular.

Contiene dos dominios globulares con 35 KDa por subunidad, conocidos como dominio de unión al cofactor FAD y dominio de unión al NADPH. A este grupo pertenecen las arqueas, bacterias, hongos y plantas. Estos dominios se encuentran unidos por dos hebras beta antiparalelas. El sitio activo, contenido en el dominio de unión a NADPH, incluye al motivo CxxC, ampliamente distribuido y presente en numerosas enzimas con actividad redox, considerando dicha proteína. (Arnér y Holmgren, 2000).

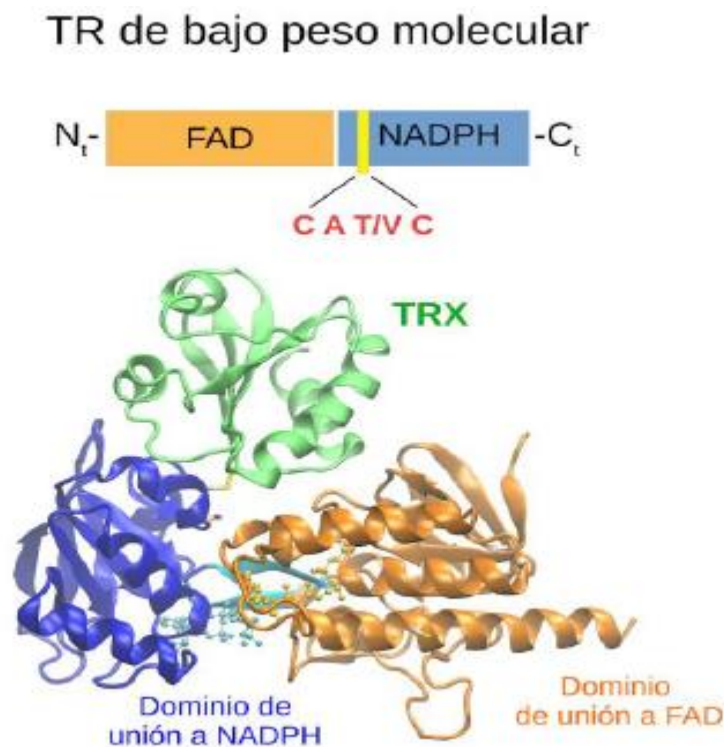


Fig.2. Estructura de la TRR de bajo peso molecular en *Echerichia coli*. (Velázquez, D. 2018)

Por otro lado, la TRR de alto peso molecular se encuentra principalmente en mamíferos y son dependientes de selenocisteína. (Williams et al., 2000), (Zhong y Holmgren, 2000).

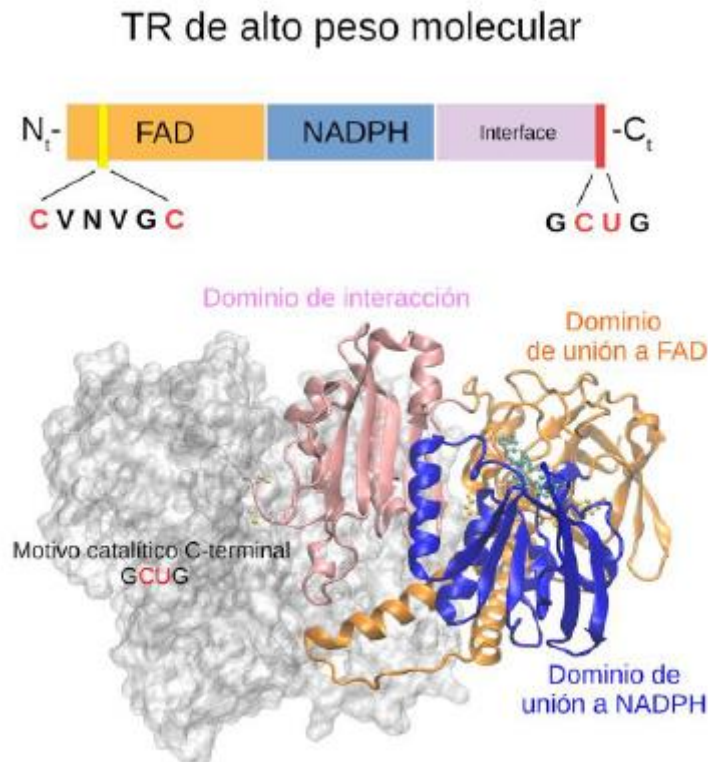


Fig.3. TRR de Rata parda, en la que se observa los dominios de unión al FAD y NADPH. (Velázquez, D.2018).

En mamíferos hay tres tipos de TRR como son las peroxirredoxinas, glutarredoxinas y la tiorredoxina reductasa.

En este estudio nos centraremos en la TRR, pero hablaremos de forma puntual sobre las PRDXs y GRXs.

La TRR es una selenoproteína, las selenoproteínas se caracterizan porque contienen en el aminoácido número 21 un residuo de selenocisteína (Sec). Este residuo es esencial para la actividad enzimática pero presenta un problema a la hora de la inserción de este residuo. (Sun et al., 2009).

La selenocisteína está codificada por un codón de parada UGA, lo que hace que la traducción de mRNA de estas proteínas se requiera tantas secuencias en cis transcrito como factores que se dedican a la incorporación de selenocisteína que actúa en trans. Este hecho dificulta la identificación de selenoproteínas, por lo que se ha tenido que requerir de la ingeniería genética. (Cheng y Arnér, 2017).

En la actualidad, las proteínas se purifican a través de proteínas recombinantes de fusión, pero hay que destacar que las bacterias no disponen de la

maquinaria adecuada para la inserción de selenocisteína, por lo que resulta necesario utilizar la ingeniería genética. (Fujiwara et al., 1999).

Una proteína recombinante de fusión es aquella que se obtiene al expresar un gen distinto al de la célula original.

La ingeniería genética es la encargada de diseñar fragmentos de ADN para formar la llamada proteína recombinante. Esta técnica se realiza mediante la utilización de un gen como huésped. Numerosos estudios de purificación de proteínas se han realizado utilizando genes de la bacteria *Echerichia coli*.

La ingeniería genética ha sido la encargada de hacer posible la inserción de selenocisteína, mediante un codón TGA codificado para selenoproteínas, pero hay que tener en cuenta que para que esto ocurra tiene que existir elementos

SECIS (Selenocystein insertion sequence) en el extremo 3' del mRNA. (Kryukov et al., 2003).

1.2. Sistema tiorredoxina

Como se ha descrito anteriormente, el sistema TR está formado por dicha proteína junto con la flavoproteína TRR y el NADPH, actuando este último como donador de electrones y a su vez, dicho sistema actúa como un antioxidante protegiendo a las células de los radicales libres y de las especies de ROS. (Lu y Holmgren, 2014).

La TR es reducida por la TRR a través de los electrones del NADPH (figura 4), la TR en su estado reducido es activa, reduce a numerosas proteínas entre las que destacan las PRDXs, las cuales hablaremos más adelante. (Lu y Holmgren, 2014).

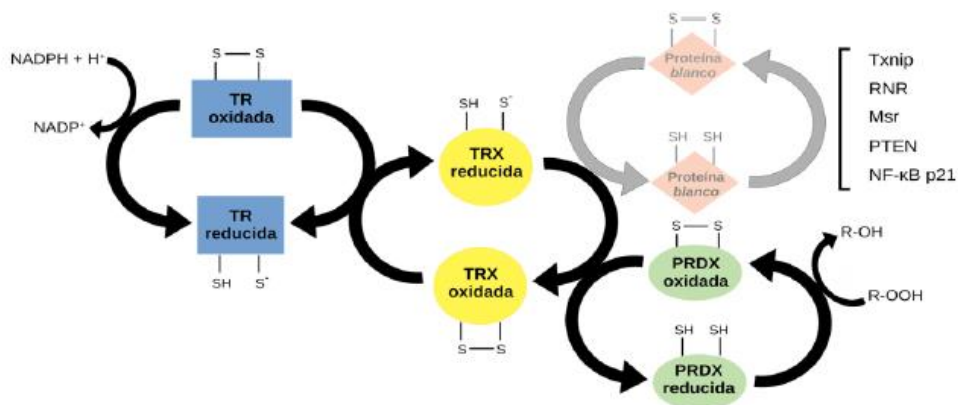


Fig.4. Reducción de proteínas oxidadas mediante los electrones del NADPH, a través de la TRR.
(Velázquez, D.2018).

1.3. Tiorredoxina

LA TR es una proteína pequeña, ubicua y con un sitio activo redox que posee dos residuos de cisteína (Cys-Gly-Pro-Cys). Puede existir tanto en forma diatómica o reducida Trx-(SH)₂, como en forma oxidada Trx-S₂, cuando los residuos de cisteína forman un puente disulfuro intramolecular. (Holmgren, 1985).

La actividad disulfuro reductasa de la TR es un proceso reversible, y va a depender de los potenciales redox de los tioles y disulfuros de la reacción. Es capaz de transferir equivalentes de reducción desde una proteína reducida hasta el NADP⁺ mediante la tiorredoxina reductasa, este paso es la clave para la formación de disulfuros en proteínas sintetizadas.

Dicha proteína fue descrita por primera vez en levaduras, como donador de electrones, en la reducción de metionina sulfóxido (Black et al., 1960), (Wilson et al., 1961).

Está presente en casi todos los organismos y cobra mucha importancia en los ciclos de vida y en las relaciones hospedador-virus de bacteriófagos.

La TR de Echerichia coli, es necesaria para el ensamble de ciertos fagos filamentosos como f1 y M13 (Russel y Model, 1985), además ésta TR es una de las subunidades de la ADN polimerasa, codificada por el fago T7 (Adler y Modrich, 1983).

En mamíferos, se descubrió un factor idéntico a la TR en células adultas T con actividad de crecimiento del receptor de la interleucina 2 (Tagaya et al., 1989).

Organismo	Función de la Trx
Todos los organismos	• Síntesis de ADN • Reducción de disulfuros proteicos
Algunos organismos	• Reducción de H₂O₂ a través de la reducción de las Prxs • Reparación proteica por reducción de la MSR
Fagos de <i>E. coli</i> (T7, f1, M13)	• Aumenta la procesividad de la DNA polimerasa formando parte de una subunidad
Bacterias y levaduras	• Dador de equivalentes de reducción para la PAPS reductasa
Plantas	• Regulación de enzimas fotosintéticas en cloroplasto
Mamíferos	• Regulación redox de factores de transcripción • Regulación de la apoptosis • Inmunomodulación • Embarazo (asiste en la implantación y en el establecimiento del embarazo) • Nacimiento (prevención de hiperoxia) • Sistema nervioso central (promueve supervivencia neuronal en isquemia/reperfusión)

Tabla 1. Funciones de la tioredoxina en diferentes organismos. (Elias y Holmgren, 2000).

Las TR son óxido reductasas pequeñas con alrededor de 100 residuos de aminoácidos, formadas por un núcleo β rodeado de hélices α (M.L. y Chaffotte, 1998).

La TR de *E. coli*, tiene dos tioredoxinas TRX1 Y TRX2, las cuales están codificadas por los genes *trxA* y *trxC*, con lo cual la TRX1, ha sido la más estudiada a lo largo de la historia en estudios enzimáticos. (Miranda A. et al., 1997).

En su estado oxidado, se le atribuyen características como ser estable termodinámicamente, sin embargo, las trxs en su estado reducido suelen ser menos estables termodinámicamente.

En el equilibrio la TRX1 presenta un comportamiento de dos estados N-U, donde se da los estados de desplegado y nativo.

El replegado in vitro de la TRX1, desde el punto de vista cinético, cabe destacar que es un proceso complejo, en el que se llevan a cabo isomerizaciones

cis/trans de prolínas y una fase que se da muy rápida en el núcleo β , algunos estudios han revelado el desplegado cinético mediante una única fase, en los que a su vez recalcan la importancia de la función que juega la hélice C-terminal en el plegado y funcionalidad de las TRXs, en cuanto a la consolidación del ensamblaje nativo y la funcionalidad de las TRX1. (Santos, J. et al., 2009).

En los años 70, Arnér Holmgren resolvió la secuencia completa de la TRX1 (Holmgren, 1968), y desde entonces, esta proteína ha sido objeto de estudio por numerosos investigadores en cuanto a mecanismo de plegado, actividad enzimática y estudios biofísicos.

Años más tarde, fue resuelta por cristalografía de rayos X en su estado oxidado a 2,8 Å (Holmgren et al., 1975), posteriormente otro grupo de investigadores la resolvió a 1,68Å. (Katti, S.K. et al., 1990).

En cuanto a la actividad catalítica oxido-reductasa de las TRs (figura 5), se establece el acercamiento a una proteína oxidada, donde se provoca una interacción entre las dos cadenas, perturbando así el microambiente y la energía del puente disulfuro de la proteína oxidada.

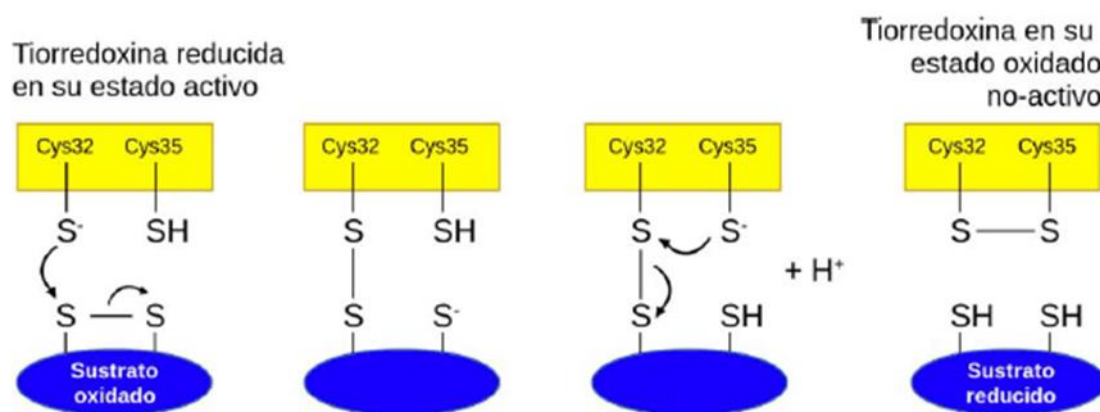


Fig.5. Reducción del enlace R-S-S-R, de una proteína diana y posterior formación del puente disulfuro entre las cisteínas catalíticas Cys32 y Cys35.

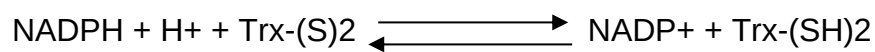
La Cys32, se localiza en la base de la hélice α H2 siendo altamente reactiva y la Cys 35 actúa como cisteína resolutive. La reacción entre TRX y el sustrato, da lugar porque la Cys32 desempeña un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de azufre (Pérez-Jiménez et al., 2009). La forma reactiva desprotonada de Cys32,

(tiolato R-S-), da lugar a un enlace disulfuro mixto, donde un electrón es de la TRX, y el otro de la proteína. Dicho enlace es atacado posteriormente por el Cys35. (Katti, S.K. et al 1990).

1.4. Funciones de la tiorredoxina

- **Donadora de hidrógeno**

La TR en su forma oxidada Trx-S₂, es reducida por los electrones del NADPH y la TRR para dar Trx-(SH)₂, dicho proceso se muestra en la siguiente ecuación:



La TR participa en un sistema cíclico de oxidorreducción en el que se transfieren los electrones desde el NADPH hasta las proteínas específicas. Así pues, la forma reducida de la TR actúa como donadora de hidrógeno de enzimas reductoras como metionina sulfóxido reductasa o ribonucleótido reductasa, entre otras.

- **Reducción de ribonucleótidos**

En E. coli, la ribonucleótido reductasa es considerada como una enzima especial, por ser la encargada de la transformación de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos. Esta enzima necesita ditiolos como donadores de electrones. Conviene dejar claro que hay investigadores que defienden posturas contrarias a que la tiorredoxina actúe como donadora de electrones sobre la ribonucleótido reductasa, como es el caso de la tiorredoxina de *Corynebacterium nephridii* y la médula de hueso de conejo (Meng y Hogenkamp, 1981), (Hopper e Iurlano, 1983).

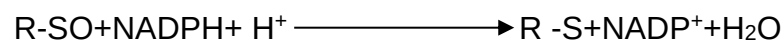
- **Reducción de sulfato**

La E.coli agrega sulfato del medio en el que crece y, tras una serie de procesos enzimáticos forma cisteína, ésta actúa como iniciadora de otros compuestos con azufre reducido como metionina, coenzima A o glutatión (fig.5). (Kredich, 1987).

Un paso crítico en esta ruta es la transformación de PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato) en sulfito, interviniendo en este proceso la enzima PAPS como reductora, y a su vez también intervienen tanto como la tioredoxina como la glutarredoxina como donador de electrones. (Tsang y Schiff, 1976), (Tsang, 1981).

- **Reducción de metionina sulfóxido**

El sulfóxido es reducido mediante las sulfóxidos reductasas a través del NADPH, actuando éste como donador de electrones, según la reacción:



En células de mamífero se ha contractado que estas enzimas están implicadas en la reparación de proteínas dañadas por agentes oxidantes (Holmgren, 1985).

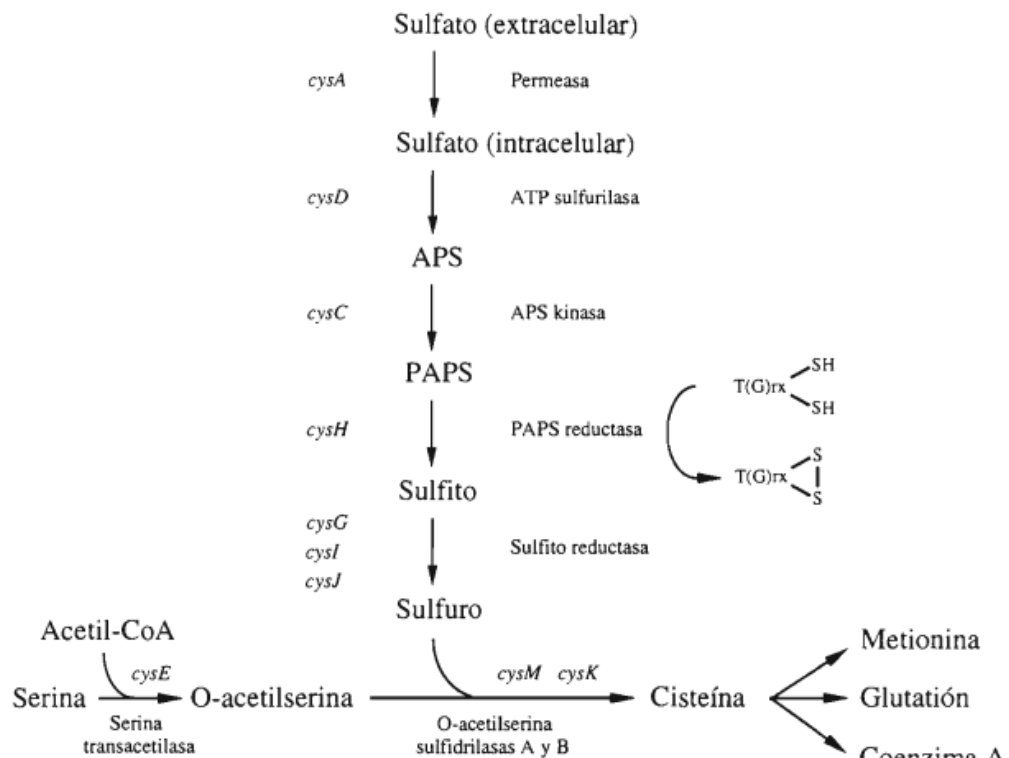


Fig.6. Ruta de asimilación de sulfato en *E.coli*. (Tesis Antonio Miranda Vizuite, 1994).

1.5. Tiorredoxina y sus principales funciones biológicas

El sistema TR se ha convertido en la principal fuente de protección frente a daños oxidativos producidos por el H_2O_2 , y otros radicales libres, los cuales son subproductos de la respiración aeróbica en mitocondrias con lo que se convierte en la principal fuente de ROS. (Nordberg y Arnér, 2001).

Estas especies reactivas son necesarias, pero a su vez son destructivas. Ejercen funciones con niveles bajos o normales como la proliferación celular y expresión de genes, y en niveles altos, causan daños irreversibles a diversas biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Este desajuste óxido-reductor recibe el nombre de estrés oxidativo, y está asociado a diferentes patologías como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas. (Jastrzaba y Skrzydlewska, 2020).

Numerosos estudios han evidenciado la necesidad para hacer frente a estas especies reactivas de diferentes maquinarias celulares como son la tiorredoxina reductasa, peroxirredoxinas y glutarredoxinas y no proteicas como glutatión y ácido ascórbico.

Como ya hemos descrito anteriormente, las células están provistas de números sistemas proteicos y no proteicos frente a la ROS, entre la que destacan las peroxirredoxinas, las cuales son las responsables de eliminar casi un 90% de peróxido de hidrógeno producido por la respiración celular convirtiendo el H_2O_2 en H_2O . Las peroxirredoxinas son dependientes de cisteína.

Otra proteína de la familia son las glutaredoxinas, son proteínas con actividad rédox y dependientes de GSH como agente reductor.

El sistema glutaredoxina está implicado en numerosas vías de señalización, procesos fisiológicos y regulación celular. Además se ha comprobado que una disminución de células beta puede provocar diabetes tipo II. (Bruning, D. et al., 2019).

2. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio es la purificación de la proteína tioredoxina reductasa en hígado de cordero mediante una serie técnicas cromatográficas, utilizando ensayos de caracterización y purificación.

Esta proteína contiene selenocisteína, como hemos descrito anteriormente es de gran interés por sus destacables funciones a nivel biológico.

En este estudio se va a obviar el hacer uso de la ingeniería genética y se procederá a realizar el tratamiento de la muestra para después purificar la proteína por las distintas técnicas cromatográficas y poder comprobar si las técnicas utilizadas son las más adecuadas para purificar dicha proteína y obtener una mayor cantidad de ella.

2.1. Objetivos específicos

- Comprobar que los reactivos utilizados son los más eficaces para la separación de la proteína en las distintas columnas cromatográficas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

- Fosfato de potasio (tampón) pH 7.0, suministrado por la casa comercial Sigma.
- EDTA, pH 7.5, suministrado por Sigma.
- DTNB, administrado por Sigma.
- BSA, suministrado por la casa comercial Fisher Scientific.
- PMSF suministrado por Sigma.
- NADPH, suministrado por Sigma.
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (reactivo de Bradford), el cual se suministró de Bio Rad.
- Para equilibrar las columnas cromatográficas se utilizó (TrisHCl), proporcionado por Sigma.

3.2. Preparación del extracto Libre de Células (ELC)

Se parte de 2.9 g de hígado de cordero (comprado en una carnicería del pueblo), se congela en nitrógeno líquido, se pulveriza y se resuspende en 15mL de TrisHCl 50mM, pH 7.8, 10mM EDTA y 1mL de PMSF.

Se homogeniza con Polytron y se mete en un baño de hielo durante 10 minutos, seguidamente se centrifuga a 16000xg durante una hora a 4°C.

Se recupera el sobrenadante que se dializa durante una noche a 4°C en bolsas Spectra/Por nº1 frente a 1L de TrisHCl 20mM, pH 8.1 mM EDTA.

Se continua filtrando con un filtro de jeringa FilterLab 0.22µm, la muestra resultante constituye el Extracto Libre de Células (ELC, 15mL).

3.3 Técnicas de purificación de la Tiorredoxina reductasa. Cromatografías

Para la purificación de tiorredoxina reductasa se utilizaron los siguientes métodos:

- Cromatografía de intercambio aniónico a través de una columna DEAE-fast flow (GE Healthcare) de 5 mL de volumen, equilibrada con TrisHCl 20mM, pH 8, 1mM EDTA, acoplada a un equipo FPLC (BioRad), a un flujo de 2 mL/min.
- Cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono-S (Pharmacia) equilibrada con MES 10mM, pH,6,2, acoplado a un equipo FPLC (BioRad) a un flujo de 1 mL/min. Tras aplicar muestra y lavar la columna con el tampón de equilibrio, se aplicó 20mL de CNa en gradiente 250mM, después 5 mL de CNa 250mM y finalmente 5 mL de NaCl 1M para regenerar la columna cromatográfica.
- Cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6 (Pharmacia), equilibrada con TrisHCl 20mM, pH 8, 0.1 M de NaCl.

3.4. Diálisis y concentración de la Tiorredoxina reductasa: Método de Bradford

Para conocer la concentración de proteína que hay en las muestras, se utilizó el método colorimétrico de Bradford, en el cual se utilizó el reactivo Protein Assay Dye Reagent Concentrate de (BioRad), este colorante se une a las proteínas.

Este método se basa en el cambio de color en respuesta a distintas concentraciones de proteínas. Seguidamente se miden las muestras en un cromatógrafo a una absorbancia de $\lambda=595\text{nm}$, para ello se hace una curva de calibración de las distintas concentraciones de la solución BSA. Con esta recta patrón se obtuvieron las siguientes concentraciones proteicas de la proteína purificada.

ELC: 32.0 ± 3.1

DEAE-2: 1.92 ± 0.05

MS-2: 1.75 ± 0.02

cTRR: 1.58 ± 0.40

3.5. Técnicas de catacterización de la tiorredoxina reductasa

3.5.1. Ensayo de actividad enzimática

El ensayo enzimático consiste en una disolución que contiene 0.25mM de NADPH, 5 mM DTNB, 0.2 mg/mL BSA, fosfato sódico 100mM, 10mM EDTA, pH 7. Posteriormente se midió por espectrofotometría a $\lambda=412\text{nm}$ durante 1 minuto.

El coeficiente de extinción para el DTNB es de $13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (Holmgren y Björnstedt, 1995).

$$\text{Unidad/ML} = \frac{(\Delta A_{412}/\text{min}) * \text{dil} * 0.6}{(\text{enzvol})}$$

Donde;

- 0.6: volumen de ensayo

- $\Delta A_{412}/\text{MIN}$: diferencia entre la muestra y el control de lectura de absorbancia por minuto.
- Enzvol: volumen de la muestra de enzimas en mL
- Dil: factor de dilución de la muestra

La actividad de esta reacción se determina midiendo la oxidación de NADPH.

Una unidad de tiorredoxina reductasa, utilizando tiorredoxina de mamífero en suero bovino se define como un micromol de NADPH oxidado por minuto, basándose en la siguiente reacción:

$$\text{Una unidad de NADP} = \frac{\text{Unidades de DTNB}}{13.6 \times 2}$$

Donde;

- 13.6 como hemos dicho anteriormente es el coeficiente de extinción en Mm del DTNB, del cual se producen dos moles por cada mol de NADPH oxidado.
- El DTNB presenta un color amarillo, y se puede medir a 412nm.

3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para realizar la electroforesis, las muestras fueron desnaturalizadas, en las que se mezclaron 3 partes de muestra cTRR con una parte de tampón de carga 4X Tris-glicina-SDS (0,69 % p/v Tris, 2,88 % p/v glicina, 0,1 % p/v SDS) para SDS-PAGE y se calentó a 100°C durante 5 min. Se fabricaron geles de poliacrilamida con dos partes: el gel separador que contiene un 12% p/v de acrilamida, 4,6 % p/v Tris-HCl, 0,1 % p/v dodecilsulfato sódico, pH 8,8, y 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 indujo añadiendo 10 μL de PSAM al 10% p/v y 3 μL de TEMED por mililitro de disolución

Se cargaron 10 μL de muestra sobre un gel de poliacrilamida al 12% y se realizó una SDS-PAGE. Seguidamente se tiñeron las proteínas del gel con azul

Coomasie (0,1 % p/v Coomassie Blue R-250 en ácido acético al 10% v/v y 40 % v/v metanol).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio trata sobre la purificación de una selenoproteína como es la tiorredoxina reductasa de mamífero, obtenida de hígado de cordero, en el cual se han seguido una serie de ensayos para llegar a dicha purificación de la proteína.

Se ha tenido también en cuenta el acondicionamiento de la muestra para la posterior concentración en el que se ha utilizado reactivos para una correcta homogeneización para resguardar la integridad proteica y la actividad enzimática.

Para ello se utilizaron reactivos como el PMSF y EDTA los cuales actúan como inhibidores de proteasas, el TrisHCl actúa eliminando compuestos de bajo peso molecular.

Mediante un proceso de sonicación (ultrasonidos), se procede a la ruptura de la membrana celular, posteriormente se somete a una centrifugación para descartar partículas insolubles.

Finalmente el sobrenadante se somete a diálisis. La muestra resultante es lo que se ha denominado extracto libre de células (ELC), en el que se recogió 15mL y se realizó el correspondiente ensayo de actividad dando como resultado 239.3.

Actividad TRR de ELC: 239.3 ± 53.8 mU/mL.

Seguidamente se pasó a la purificación de la proteína, en la que se empezó con una cromatografía de intercambio aniónico a través de una columna DEAE fast flow (GE Healthcare), el ELC fue dializado frente a un tampón de pH 8, para que la proteína adquiriera carga negativa y pueda unirse a la columna y ser separada.

El ELC fue lavado con un tampón y se recolectaron fracciones de 5mL en las cuales se encuentran la tiorredoxina reductasa, medida posteriormente para ver su actividad enzimática.

Seguidamente se aplica un gradiente de 0 a 200mM NaCl en 50 mL, seguido de isocrático a 200 mM NaCl e isocrático a 1M NaCl para eluir las proteínas adheridas a la columna, de aquí se obtienen dos líneas de purificación, las cuales van a formar las muestras DEA1 y DEAE2.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de la técnica cromatográfica utilizada.

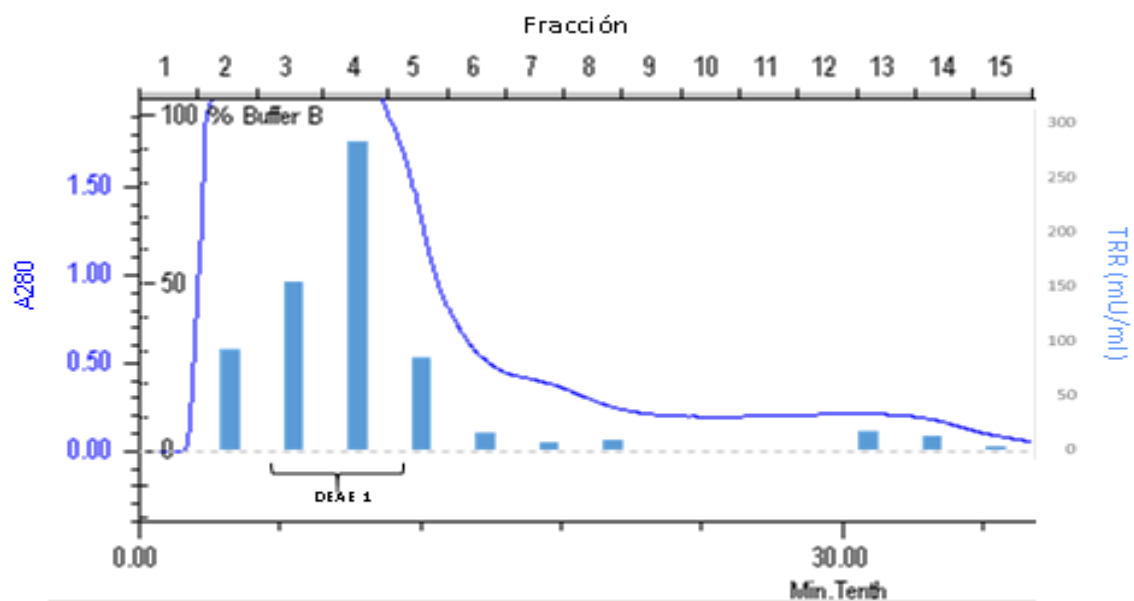


Fig. 7. Cromatografía del ensayo de actividad de la muestra DEAE 1 (10mL).

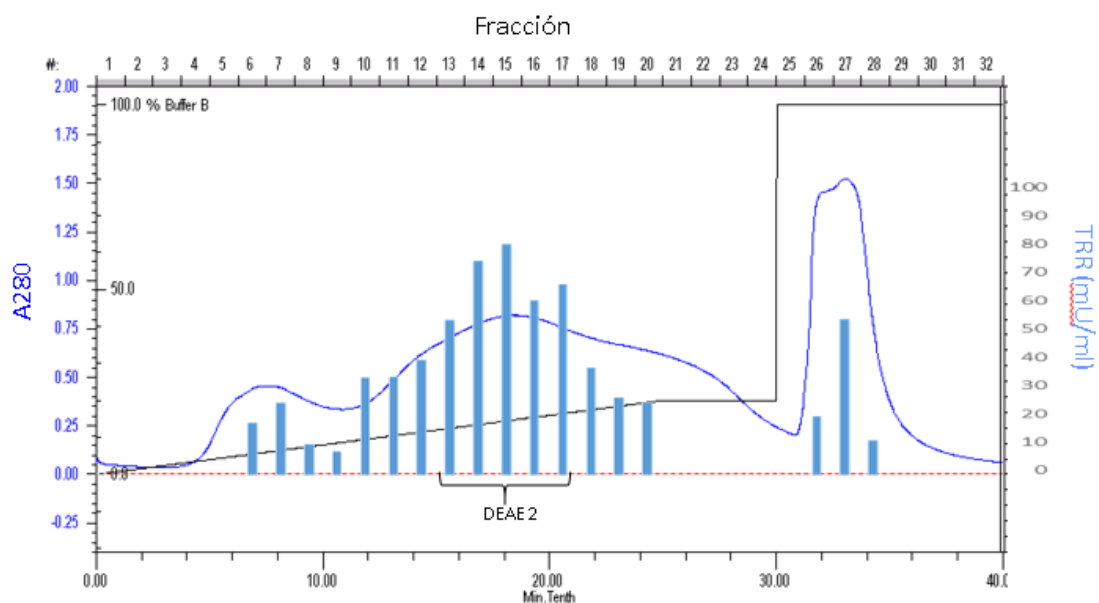


Fig.8. Cromatografía del ensayo de actividad de la muestra DEAE 2 (12.5mL).

En la figura 6, se puede observar que en las fracciones donde más actividad se obtuvo de TRR fue de la 3 a la 5, y en la figura 7 se observa que se obtuvieron más fracciones con actividad TRR.

Según el análisis de actividad enzimática, la muestra DEAE 1 mostró más actividad que la muestra DEAE 2, aun habiendo más fracciones de actividad en la muestra DEAE2.

Ambas muestras se dializaron durante una noche frente a 1L de tampón MES 10mM, pH6.2. Después se sometieron a cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono-S (Pharmacia), equilibrada con MES 10mM,pH 6.2, acoplada a un equipo FPLC (BioRad) y a un flujo de 1mL/min. Este equipo se caracteriza por su rango de exclusión de proteínas 5×10^3 y 5×10^6 Daltons.

Tras aplicar la correspondiente muestra y lavar la columna con el tampón de equilibrio, se aplicó 20mL de NaCl en gradiente (0 a 250mM), después 5 mLde NaCl 1M para regenerar la columna cromatográfica.

Primero se sometió a cromatografía la muestra DEAE 1 y después la DEAE 2.

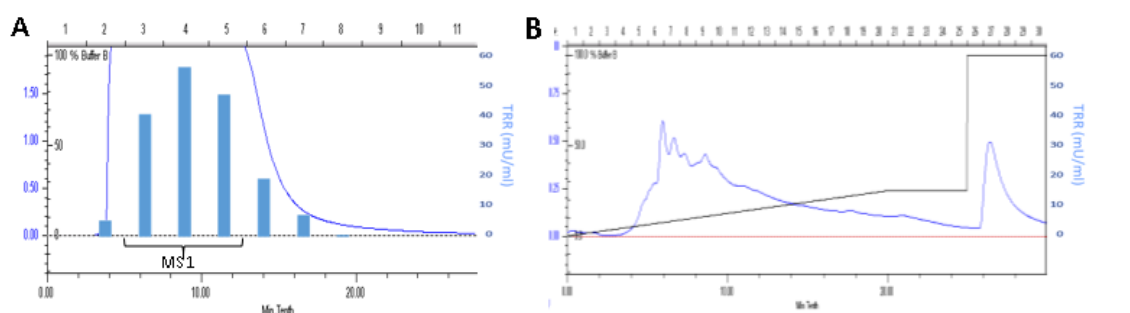


Fig .9. A. Flow through de la cromatografía con la muestra DEAE1, y B, elución con gradiente.

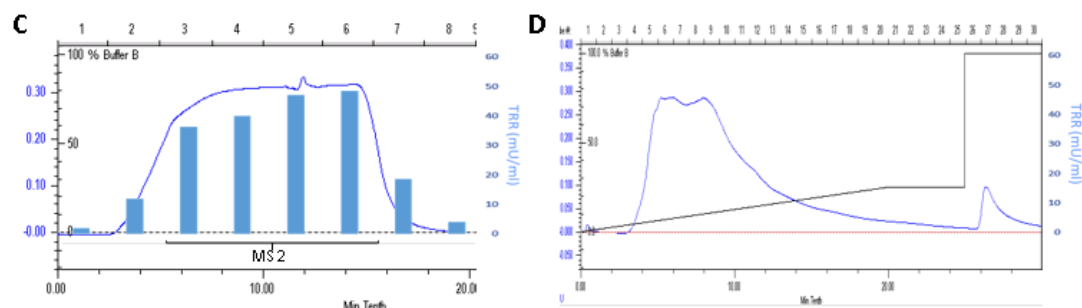


Fig .10. C. Flow through de la cromatografía con la muestra DEAE2, y D, elución con gradiente

En ambas cromatografías, la actividad de TRR eluyó en el lavado de columna. Se recolectaron las respectivas fracciones que constituyeron las muestras MS1 (10mL) y MS2 (7.5mL).

Como se puede observar en las figuras 8 y 9 la actividad enzimática fue más baja que si se compara con la cromatografía descrita anteriormente, pero aun así no puede hablarse de que esta cromatografía no haya sido resolutive.

Las muestras MS1 y MS2 se conservaron a -20°C . Posteriormente fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6 (Pharmacia), equilibrada con TrisHCl 20mM, pH 8, para descartar compuestos de bajo peso molecular y 0.1M NaCl para regenerar la columna.

Como paso previo, se redujo el volumen de las muestras con dispositivos concentradores Spin-X-UF (Corning) hasta 5 mL, esta medida se hizo para no exceder el 1% del tamaño de la columna.

La muestra MS1, tras la descongelación mostró la formación de grumos, por lo que la muestra se clarificó por centrifugación a 12000xg durante 10 minutos, antes de ser concentrada.

Las cromatografías de ambas dieron el siguiente resultado:

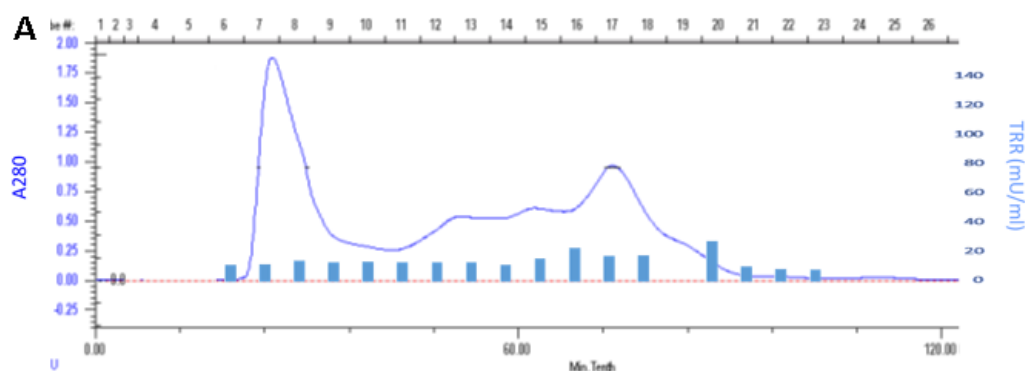


Fig. 11. Cromatografía del ensayo de actividad de la muestra MS1.

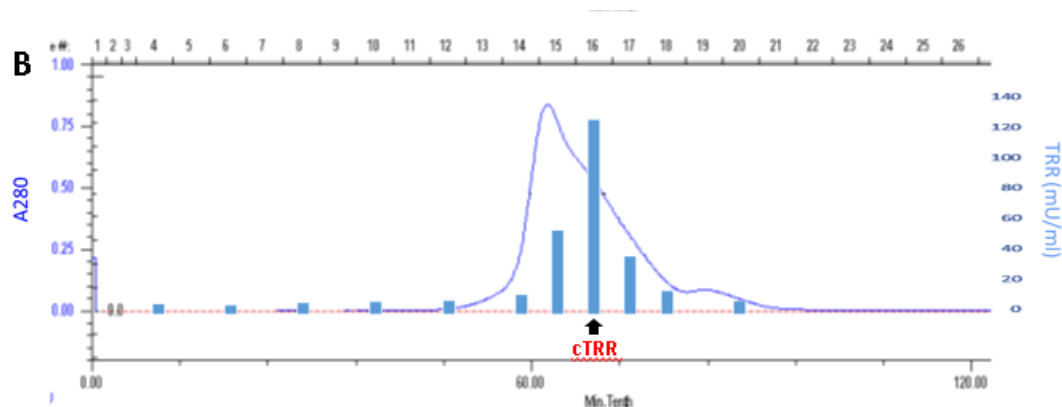


Fig .12. Cromatografía del ensayo de actividad MS2.

En los resultados obtenidos que muestran las figuras 10 y 11, se observa que la cromatografía de la muestra MS 1 mostró una escasa actividad TRR diseminada por todas las fracciones, por lo que se descartó para obtener una muestra purificada de enzima, esto puede deberse a los problemas de los grumos que presentó cuando se descongeló la muestra. Sin embargo, la cromatografía de la muestra MS 2 sí reveló un pico definido de actividad en torno a la fracción 16.

Se seleccionó la fracción 16 (1mL) como muestra purificada de tiorredoxina reductasa de cordero (CTRR).

Los datos de actividad quedan recogidos en la tabla 1, donde se recogen todos los datos de las distintas muestras que han sido purificadas mediante las diferentes técnicas cromatográficas descritas anteriormente.

	Volumen (mL)	[Prot.] (mg/mL)	Actividad enzimática (mU/mL)	Actividad Total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	Rto (%)	Enriq.
ELC	15	32	239.3	3589	7.46	100	1
DEAE2	12.5	1.92	90	1125	46.8	31	6.3
MS2	7.5	1.75	40.2	301	22.8	8	3.05
CTRR	1	1.58	198.4	198	125.5	5	16.8

Tabla 2. Evaluación de la purificación de tiorredoxina reductasa en hígado de cordero.

R: Rendimiento, porcentaje de actividad total de la muestra resultante de la purificación con respecto a la muestra original. E: Enriquecimiento, número de veces que es más pura en actividad TRR con respecto a la muestra original y se calcula

como el cociente entre la actividad específica de la muestra resultante y el de la muestra original.

Como se observa en la tabla 2, la cromatografía de exclusión molecular en columna de Superose 6 fue la que más cantidad de proteína se purificó y como nos muestra el enriquecimiento, su cantidad se triplicó.

Conviene destacar, en cuanto al proceso a seguir, que se han llevado a cabo tres técnicas cromatográficas para purificar la TRR, de las cuales la que mejor resultado ha ofrecido ha sido la cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6. Sin embargo, esto no significa que esta última técnica sea la mejor de forma aislada, sino que se ha necesitado de las otras dos cromatografías, tanto la cromatografía de intercambio iónico en columna DEAE, como la cromatografía de intercambio iónico en columna Mono S, previamente para ofrecer los resultados positivos que se describen a lo largo del presente documento.

Hay que tener en cuenta que ninguna cromatografía tuvo un resultado nulo, sino que en todas ellas se pudo purificar tiorredoxina reductasa, es cierto que una de las muestras fue desechada por encontrarse en muy baja concentración de proteína.

También cabe destacar que la muestra MS1 presentó una actividad residual, ya que presentó algunos problemas descritos anteriormente, los cuales podrían deberse a la desnaturalización de la proteína tras ser congelada y descongelada para su posterior medición.

Ya para finalizar el proceso de purificación de la proteína TRR se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE para ver el grado de purificación de dicha proteína. El resultado se muestra en la figura 12.

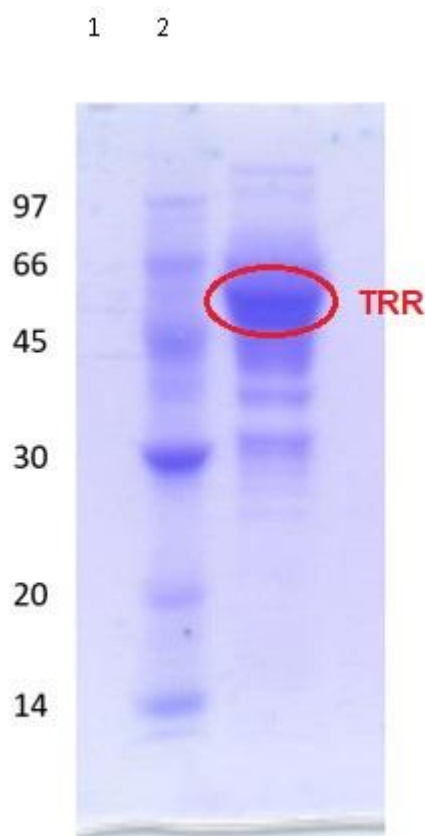


Fig.13. Electroforesis SDS-PAGE. Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (KDa) se indican al lado de cada banda. (1.Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit, 2.cTRR).

Como se puede observar en la figura 12, las bandas 1 es el Kit de SDS de bajo peso molecular, compuesto por 6 proteínas altamente purificadas y caracterizadas para su uso en la estimación del peso molecular, y la banda 2 la muestra de cTRR.

Se puede observar hay una diversidad de proteínas, pero destaca una banda ancha entorno a 55KDa que podría ser la tiorredoxina reductasa de cordero, según su peso teórico.

Sería necesario realizar más pruebas complementarias para afirmar con rotundidad los resultados de las diferentes técnicas mostrados en este estudio.

5. CONCLUSIÓN

Se ha podido comprobar que la cromatografía de intercambio iónico es la clave para la purificación de la proteína, en nuestro caso la cromatografía de exclusión molecular supuso el éxito para la obtención de tiorredoxina reductasa de cordero. Pero también se ha de destacar que han sido necesarias todas las técnicas cromatográficas que se han realizado previamente.

El estudio publicado por Carlberg y Mannervik en la revista *Analytical biochemistry*, vienen a reforzar los resultados que arroja nuestro estudio. La cromatografía de exclusión molecular en columna Superose 6, es la técnica preferente para la purificación de selenoproteínas, pero se necesitan de las técnicas cromatográficas de intercambio iónico como paso previo.

Con los datos obtenidos, la purificación de dicha proteína ha sido razonable y el enriquecimiento ha sido bueno, ya que la muestra se ha enriquecido el triple. Ha de tenerse en cuenta que se ha partido de un volumen relativamente pequeño de la muestra ELC (15mL), y al utilizar tantas cromatografías, las células se van gastando en cada ensayo de purificación.

La tiorredoxina reductasa, según el tipo de organismo, presenta diferentes características, particularmente en mamíferos al estar compuesta por una selenocisteína, la cual es indispensable para su actividad enzimática. Esta característica no está presente en las bacterias ya que no poseen la maquinaria adecuada.

En la actualidad este tipo de proteínas se purifican a través de las proteínas recombinantes de fusión mediante ingeniería genética, mediante la caracterización de mutantes en el gen de la TR de la *Echerichia coli*. El gen es clonado y secuenciado, este gen se transcribe a partir de un único promotor.

Diversos estudios han sido publicados en la revista *Biological Chemistry*, que tratan la purificación de esta proteína mediante ingeniería genética explicada anteriormente. El equipo de Fujiwara, purificó la TRR utilizando técnicas como mutagénesis con células salvajes de rata.

Otro de los artículos publicado por Cheng y Arnér, se decantan por la sintetización de una cepa especial de *Echerichia coli*, pero cabe destacar que este método es muy costoso y requiere mucho tiempo.

En el presente documento se plasma bibliografía en referencia a la existencia de distintas técnicas para realizar la purificación por ingeniería genética.

Para finalizar, con este estudio lo que se ha pretendido es poder purificar tiorredoxina reductasa a partir de un tejido de mamífero (hígado de cordero), ya que al contener un residuo de selenocisteína, su purificación hace que sea casi imposible, puesto que las proteínas hoy en día se purifican a través de proteínas recombinantes de fusión mediante ingeniería genética. Las bacterias carecen de la maquinaria para la incorporación de este residuo de selenocisteína y hace que sea imposible, y como hemos explicado anteriormente hace que se tenga que recurrir a la ingeniería genética. Pero este método es muy costoso, porque requiere de mucha preparación de cepas de bacterias y ensayos, aparte del tiempo que se necesita.

Mediante este estudio se ha realizado una purificación de la TRR ya que este método es más asequible y requiere mucho menos tiempo.

Este estudio podría servir como material de apoyo para futuras purificaciones de tiorredoxina reductasa, para que se puedan llevar a cabo estudios de selenoproteínas, las cuales son tan importantes para la cura de enfermedades que hay en la actualidad como enfermedades neurodegenerativas e inmunológicas.

Como hemos visto en este estudio la TRR es una de las principales maquinarias para la reducción de radicales libres producidos por la respiración celular, que a su vez son los principales causantes de cáncer.

A results del estudio que se ha realizado alrededor de la TRR como selenoproteína, considero conveniente destacar la conveniencia de que se reforzaran las líneas de investigación en torno a ella.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ARNÉR E.S.J. Y HOLMGREN A. (2000): "Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase". *Eur. J. Biochem.* 267 ,pp, 6102-6109.
2. ARNÉR E.S.J (2009): "Focus on mammalian thioredoxin reductase important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, pp, 495-526.
3. BLACK S., HARTE E.M., HUDSON B., WARTOFSKY L., (1960)." A specific enzymatic reduction of L-methionine sulfoxide and a related non specific reduction of disulfides". *J. Biology Biochemistry*, 235, pp, 2910-2916.
4. BRÜNING D., HATLAPATKA K., LIER-GLAUBITZ V., ANDERMARK V., SCHERNECK S., OTT I., RUSTENBECK I. (2019):" Pharmacological inhibition of thioredoxin reductase increases insulin secretion and diminishes beta cell viability". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* pp 210-220.
5. CARLBERG I., Y MANNERVIK B., (1981):" Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose 4B". *Analytical biochemistry* . 116, pp, 531-536.
6. CHAE H.Z., CHUNGL S.J., RHEES S.G. (1994)." Thioredoxin dependent peroxide reductase from yeast". *Journal of biological chemistry* Vol. 269, No. 44, pp. 27670-27678.
7. CHARLES H. Y WILLIAMS, JR. (1995): "Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*". *Faseb J.* 9, pp, 1267-1276.
8. CHENG Q. Y ARNÉR S.J.E. (2017):" Selenocysteine insertion at a predefined UAG codon in a release factor 1 (RF1)- depleted *Escherichia coli* host strain

bypasses species barriers in recombinant selenoprotein translation". Journal of biological chemistry. Vol. 292, N°13, pp .5476-5486.

9. ECKENROTH B., HARRIS K., TURANOV A., GLADYSHEV V., RAINES R.T., HONDAL R.J., (2006)."Semisynthesis and characterization of mammalian thioredoxin reductase". Biochemistry, vol 45, N°16, pp,5158-5170.
- 10.ELIAS S.J.A. y HOLMGREN A. (2000)."Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase". Eur J. Biochem, 267, pp6102-6109.
- 11.FUJIWARA N., FUJII T., FUJII J., TANIGUCHI N. (1999): "Functional expression of rat thioredoxin reductase: selenocysteine insetion sequence element is essential for the active enzyme", Biochem 340, pp 439-444.
- 12.HOLMGREN, A. (1968). "Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from escherichia coli B." Eur. J. Biochem. 6, pp, 475–484.
- 13.HOLMGREN, A., SÖDERBERG, B.O., EKLUND, H. Y BRÄNDÉN, C.I. (1975)." Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72, pp, 2305–2309.
- 14.HOLMGREN, A. (1985)."Thioredoxin". Annu. Rev.Biochem, 54, pp, 237-271.
- 15.HOLMGREN A. Y BJÖRNSTEDT M. (1995)." Methods in enzymol". Journal of biologycal chemistry vol.252, pp, 199-208.
- 16.HOPPER S. E IURLANO D. (1983). "Properties of a thioredoxin purified from the rabbit bone marrow which fails to serve as a hydrogen donor for the homologous ribonucleotide reductase". J. Biol. Chem.258, pp, 13453-13457.
- 17.JASTRZAB A. Y SKRZYDLEWSKA E. (2020):" Thioredoxin-dependent system. Application of inhibitors". Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 36:1, pp,362-371.

18. KAHLOS K., SOINI Y., SÄILY M., KOISTINEN P., KAKKO S., PÄÄKKÖ P., HOLMGREN A., KINNULA V. (2001). "UP-regulation of thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma". *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, pp, 198–204.
19. KATTI, S.K., LEMASTER, D.M. & EKLUND, H. (1990). "Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 212, pp, 167–184.
20. KRYUKOV, G. V., CASTELLANO S., NOVOSELOV S.V., LOBANOV A.V., ZEHTAB O., GUIGO R., GLADYSHEV V.N. (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes". *Science* 300 (5624), pp, 1439-1443.
21. LU, J. Y HOLMGREN A. (2014). "The thioredoxin antioxidant system". *Free Radical Biology and Medicine*, 66, pp. 75–87.
22. MENG M. Y HOGENKAMP H.P.C. (1981). "Purification, characterization, and amino acid sequence of thioredoxin from *Corynebacterium nephridii*". *J. Biol. Chem.* 256, pp, 9174-9182.
23. MIRANDA, A. (1994). "Efectos fisiológicos de la ausencia de tiorredoxina y glutarredoxina en *Escherichia coli*". Tesis doctoral Universidad de Córdoba.
24. MIRANDA, A., DAMDIMOPOULOS, A.E., GUSTAFSSON, J. Y SPYROU, G. (1997). "Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin". *J. Biol. Chem.* 272, pp, 30841–30847.
25. M.L. Y CHAFFOTTE, A.F. (1998). "Proline isomerization-independent accumulation of an early intermediate and heterogeneity of the folding pathways of a mixed alpha/beta protein, *Escherichia coli* thioredoxin". *Biochemistry* 37, pp, 10286–10297

26. NORDBERG J. Y ARNÉR E.S.J.(2001): "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system". *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 31, Nº. 11, pp. 1287–1312.
27. PÉREZ-JIMÉNEZ, R., LI, J., KOSURI, P., SÁNCHEZ-ROMERO, I., WIITA, A.P., RODRÍGUEZ-LARREA, D., CHUECA, A., HOLMGREN, A., MIRANDA-VIZUETE, A., BECKER, K., CHO, S.-H., BECKWITH, J., GELHAYE, E., JACQUOT, J.P., GAUCHER, E.A., SÁNCHEZ-RUIZ, J.M., BERNE, B.J. Y FERNÁNDEZ, J.M. (2009). "Diversity of chemical mechanisms in thioredoxin catalysis revealed by single-molecule force spectroscopy". *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, pp, 890–896.
28. RUSSEL M., MODEL P. (1985). "Thioredoxin is required for filamentous phage assembly". *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 82, 29-33.
29. SANTOS, J., SICA, M.P., BUSLJE, C.M., GARROTE, A.M., ERMÁCORA, M.R. Y DELFINO, J.M. (2009). "Structural Selection of a Native Fold by Peptide Recognition. Insights into the Thioredoxin Folding Mechanism". *Biochemistry* 48, pp, 595–607.
30. SUN S., XU W., ZHOU H., ZHANG Y., ZHANG J., LI X., LI B., MA K. XU J.(2021): "Efficient purification of selenoprotein thioredoxin reductase by using chelating reagents to protect the affinity resins and rescue the enzyme activities". *Process Biochemistry* 101, pp, 256–265.
31. TAGAYA Y., MAEDA Y., MITSUI A., KONDO N., MATSUI H., HAMURO J., BROWN N., ARAI K.I., YOKOTA T., WAKASUGI H., YODOI J. (1989). "AtI-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/tac inducer homologous to thioredoxin, possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction". *Embo J*, 8, pp, 4591-4601.
32. TSANG, M.L.S. Y SCHIFF, J.A. (1976). "Sulfate reducing pathway in escherchia coli involving bound intermediates". *J. Bacteriol.* 125, pp, 923-933.

33. TSANG, M.L.S. (1981). "Assimilatory sulfate reduction in *Escherichia coli*: identification of the alternate cofactor for adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate reductase as glutaredoxin". *J. Bacteriol.* 146, pp, 1059-1066.
34. VELÁZQUEZ D., (2018). "A biophysical-functional glance to the thioredoxin and glutaredoxin redox systems". Citecsa, 2027.
35. WILLIAMS Jr C.H., ARSCOTT L.D., MÜLLER S., LENNON B.W., LUDWING M.L., WANG P.F., VEINE D.M., BECKER K., SCHIRMER R. (2000). "Thioredoxin reductase, two modes of catalysis have evolved". *Eur. J. Biochem.* 267, pp, 6110-6117. Minireview.
36. WILSON L.G., ASAHI T., BANDURSKI R. (1961). "Yeast sulfate reducing system I. Reduction of sulfate to sulfite". *J. Biology Chemistry*, 236, pp, 1822-1829.
37. ZHONG L. Y HOLMGREN A. (2000): "Essential Role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations". *The journal of biological chemistry*, 16, pp 18121-18128.

Bibliografía web

38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4KPR> (consultada el 24/04/2021)

7. ABREVIATURAS

BSA: Albúmina de suero bovino
CTRR: Tiorredoxina reductasa de cordero
DTNB: 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)
EDTA: Etilen-diamino-tetra-acético
ELC: Extracto libre de células
FAD: Flavín adenín dinucleótido
GRX: Glutarredoxina

GSH: Glutarredoxina reducida
mRNA: ARN mensajero
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PAPS: Adenosina 3'-fosfato 5'- fosfosulfato
PMSF: Fenil-metil-sulfonil fluoruro
PRDX: Peroxirredoxina
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SEC: Selenocisteína
SEICIS: (Selenocystein insertion sequence)
TR: Tiorredoxina
TrisHCl: Hidroximetil aminometano
TRR: Tiorredoxina Reductasa
SDS: Dodecil sódico sulfato

8. Anexo I. Certificado participación charla “Prevención de Riesgos Laborales y Seguridad en Laboratorios para estudiantes de Trabajo Fin de Grado”



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Prevención de Riesgos Laborales

El Servicio de Prevención de la Universidad de Jaén, CERTIFICA, que:

D^a. María José Maya Flores con DNI 26046997A, alumna de la Facultad de Ciencias Experimentales, ha participado en la Charla sobre "Prevención de Riesgos Laborales y Seguridad en los Laboratorios para estudiantes de Trabajo Fin de Grado", realizado en día 26 de noviembre de 2020, con el siguiente contenido:

- Riesgos asociados a trabajos en laboratorio
- Riesgos y medidas preventivas
- Elementos de protección en el laboratorio
- Equipos de protección individual
- Normas de seguridad
- Cómo actuar en caso de accidente, incendio o evacuación

La misma se desarrolló con una duración de 2 horas lectivas



Jaén a 26 noviembre 2020