



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Purificación y
caracterización de la
enzima glutatión
reductasa de Bos Taurus.**

Alumno: Ishak Atef Rahif

Junio, 2022



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Grado en Química

Trabajo de Fin de Grado

**Purificación y
caracterización de la
enzima glutatión
reductasa de *Bos Taurus*.**

Ishak Atef Rahif

Jaén, junio 2022

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT.....	5
1.INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Estructura y función de la glutatión reductasa.....	6
1.2. Función antioxidante de la glutatión reductasa.....	7
1.3. Aplicaciones con glutatión reductasa.....	9
2.OBJETIVOS.....	10
2.1.Objetivos específicos.....	10
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1.Reactivos.....	10
3.2.Obtención del extracto libre de células.....	10
3.3.Fraccionamiento proteico con sulfato amónico.....	10
3.4.Cromatografías.....	11
3.4.1. <i>Cromatografía de intercambio iónico DEAE-sepharose</i>	11
3.4.2. <i>Cromatografía de intercambio iónico MonoQ</i>	11
3.4.3. <i>Cromatografía de intercambio iónico Mono-S</i>	12
3.4.4. <i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	12
3.5.Electroforesis en gel de poliacrilamida(SDS-PAGE).....	13
3.6.Diálisis y concentración de muestra.....	14
3.7.Determinación de la concentración de proteínas.....	14
3.8.Determinación de la actividad enzimática.....	14
4.RESULTADOS.....	15
4.1.Purificación.....	15
4.2.Caracterización de la actividad glutatión reductasa.....	25
4.2.1 <i>Caracterización cinética en función de la concentración de glutatión oxidado</i>	25
4.2.2 <i>Caracterización cinética en función de la concentración de NADPH</i>	26
4.2.3. <i>pH óptimo de la actividad glutatión reductasa</i>	27
5.DISCUSIÓN.....	27
6.CONCLUSIONES.....	29
7.BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

La glutatión reductasa (GR) es una enzima casi universal que se encuentra presente en casi todos los organismos eucariotas y procariotas. 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 hígado de vaca (*Bos Taurus*) 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. Se han realizado dos purificaciones que no han sido muy efectivas, así como la caracterización en función de la concentración tanto del glutatión oxidado como del NADPH obteniendo una K_m de 0.25mM y 0.13mM respectivamente y un pH óptimo de 7.2.

ABSTRACT

Glutathione reductase (GR) is an almost universal enzyme that is present in most eukaryotic and prokaryotic organisms. 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 liver of *Bos Taurus* 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. Two purifications have been carried out that have not been very effective, as well as the characterization based on the concentration of both oxidized glutathione and NADPH, obtaining a K_m of 0.25mM and 0.13mM respectively, and an optimal pH of 7.2.

1. Introducción

1.1. Estructura y función de la glutatión reductasa

La enzima Glutatión Reductasa (GR) (EC. 1.8.1.7), también llamada glutatión-disulfuro reductasa, es una oxidoreductasa presente en prácticamente todos los organismos. En células eucariotas se encuentra en el citosol, mitocondrias y, en el caso de células vegetales, cloroplastos. Cataliza la reducción del enlace disulfuro que se establece entre dos moléculas de glutatión, lo que constituye el glutatión oxidado (GSSG), adquiriendo los equivalentes de reducción del coenzima NADPH. En esquema, la reacción que cataliza la glutatión reductasa es la siguiente:



Figura 1.1: Reacción de reducción del disulfuro de glutatión (GSSG) a glutatión reducido (GSH) dependiente de NADPH.

La glutatión reductasa es una flavoenzima, con FAD como grupo prostético, de estructura homodimérica (Figura 1.2). Cada subunidad tiene un peso molecular entre 50 y 60 kDa en eucariotas, y se distinguen tres dominios: un dominio de unión al NADPH, otro dominio de unión al FAD y un dominio de dimerización. El mecanismo catalítico consiste en, primero, la unión del coenzima NADPH a la enzima, que reduce al grupo prostético FAD. El FAD reducido reduce a continuación un disulfuro establecido entre dos cisteínas de la enzima (Cys58-Cys63 en la GR humana), manteniéndose transitoriamente una interconexión de carga entre la Cys63 y la flavina. A continuación, se introduce el glutatión oxidado (GSSG) en la enzima, la Cys58 forma un enlace disulfuro con una de las moléculas glutatión del GSSG, se rompe el enlace disulfuro del glutatión oxidado y se libera una molécula de glutatión reducido (GSH). Finalmente, la Cys63 vuelve a establecer un enlace disulfuro con la Cys58, que se libera de la segunda molécula de glutatión, la cual queda en estado reducido y se libera de la enzima (Figura 1.3) (Berkholz et al., 2008).

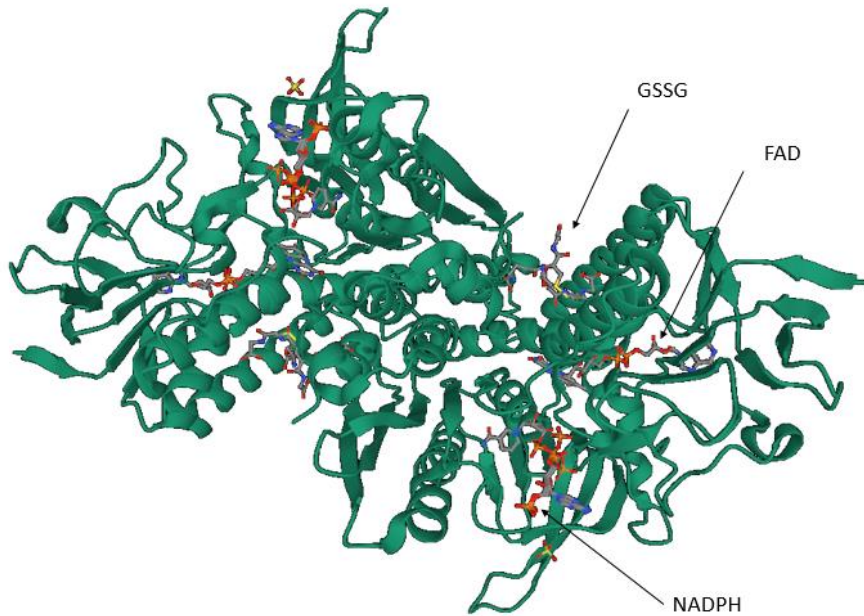


Figura 1.2: Estructura de la glutatión reductasa humana. Las flechas apuntan a las moléculas NADPH, FAD y GSSG colocadas en la enzima. Imagen captada y adaptada de la entrada 3dk4 de la base de datos PDBe (Protein Data Bank in Europe). Autoría: Berkholz et al, 2008.

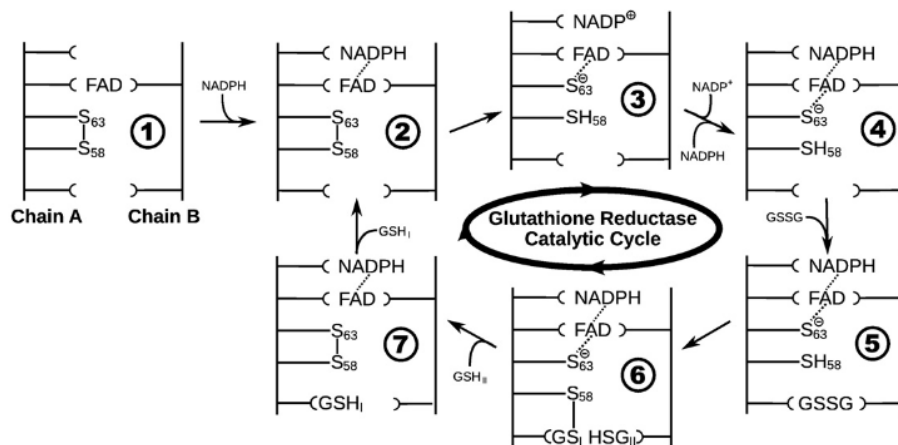


Figura 1.3: Mecanismo catalítico de la glutatión reductasa humana. Imagen tomada de Berkholz DS et al., 2008.

1.2. Función antioxidante de la glutatión reductasa

Como enzima que mantiene al glutatión en estado reducido, la glutatión reductasa tiene una importante función antioxidante y protectora de las células frente al estrés oxidativo.

El glutatión es tripéptido formado por los aminoácidos glutámico, cisteína y glicina (Glu-Cys-Gly), con un enlace peptídico inusual entre el grupo α -amino de la

cisteína y el grupo γ -carboxilo de la cadena lateral del glutamato. El grupo sulfidrilo o tior de la cisteína actúa como donador de electrones en una amplia gama de reacciones enzimáticas. El glutatión interviene en varios procesos, como en la eliminación de compuestos tóxicos en las células mediante la conjugación del glutatión a tales compuestos catalizado por la glutatión transferasa (GST), o en la modulación funcional de una variedad de proteínas a través la formación de conjugados glutatión-proteína, también denominados disulfuros mixtos. Pero la función más relevante del glutatión es como antioxidante participando en la eliminación de peróxidos (Pompella *et al.*, 2003).

Como producto del metabolismo aerobio se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células (Pruchniak *et al.*, 2016). A niveles bajos o moderados, el peróxido de hidrógeno actúa como mensajero molecular que modula la expresión génica (Sies, 2007). Pero los niveles de H_2O_2 pueden incrementarse en las células por la presencia de xenobióticos u otras causas ambientales, de modo que causen daños oxidativos en las células tales como la peroxidación lipídica (Kappus and Sies, 1981). Las células cuentan con enzimas (catalasa, peroxidasas, etc) que convierten los peróxidos en productos inocuos, como el oxígeno molecular y agua. Particularmente, las enzimas glutatión peroxidasas (GPX) catalizan la reducción del H_2O_2 u otros peróxidos orgánicos a agua o el correspondiente alcohol usando glutatión reducido como donador de electrones, de modo que se produce glutatión oxidado como producto de la reacción (Margis *et al.*, 2008). Por otro lado, algunos tipos de peroxirredoxinas (PRX), que también son peroxidasas, producen glutatión oxidado como consecuencia de su acción reductora de peróxidos (Manevich *et al.*, 2004; Pedrajas *et al.*, 2010). De este modo, el glutatión contribuye a la defensa antioxidante de las células frente a los peróxidos, y la glutatión reductasa actúa como enzima antioxidante auxiliar, reciclando el glutatión oxidado por la acción de las peroxidasas a glutatión reducido con los equivalentes de reducción del NADPH (Figura 1.4).

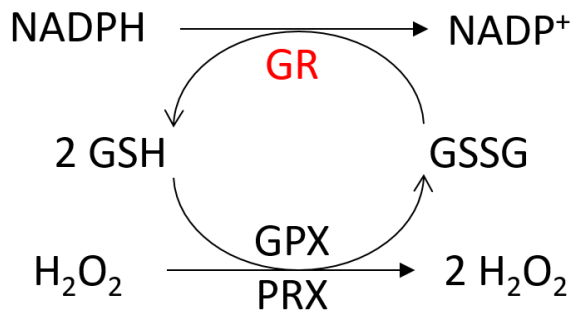


Figura 1.4: Participación de la glutatión reductasa en la eliminación de peróxidos.

1.3. Aplicaciones con glutatión reductasa

En el ámbito científico, las preparaciones purificadas de enzima glutatión reductasa se emplean en el análisis de actividades peroxidasa dependientes de glutatión en muestras biológicas. Los ensayos enzimáticos consisten básicamente en una mezcla de NADPH, glutatión reducido, un hidroperóxido (generalmente cumeno-hidroperóxido) y glutatión reductasa (Lawrence and Burk, 1976; Weydert and Cullen, 2010). La adición de glutatión peroxidasa contenida en la muestra objeto de análisis al medio de reacción provocará el consumo asociado de NADPH, como se indica en la figura 1.4, que puede ser cinéticamente valorado por espectrofotometría. Por consiguiente, la obtención de una preparación purificada de glutatión reductasa es fundamental para este tipo de estudios, en los que se puede revelar las variaciones de la enzimática antioxidante en células o tejidos sometidos a un determinado proceso o tratamiento (Galiazzo et al., 1987).

Preparaciones purificadas de glutatión reductasa pueden adquirirse comercialmente, pero suelen resultar relativamente caras cuanto más pura sea la enzima. Por ejemplo, una preparación de glutatión reductasa recombinante humana de 0,5 mg prácticamente pura cuesta en la actualidad más de 300 euros (G9297-500UG, Sigma). Por tanto, con este trabajo hemos tratado de poner a punto un método de purificación de glutatión reductasa de mamífero empleando procesos cromatográficos reutilizables. Concretamente, se ha escogido hígado de vaca (*Bos taurus*), adquirido en supermercado, como material de obtención de la enzima. Con ello, se pretende obtener una preparación purificada de glutatión reductasa con muy bajo coste.

2. Objetivos.

El objetivo de este estudio es la purificación de la enzima glutatión reductasa de una muestra comercial de hígado de Bos Taurus mediante una serie de cromatografías líquidas utilizando ensayos de caracterización y purificación, utilizando para su detección su actividad reductora de GSSG dependiente de NADPH.

2.1. Objetivos específicos.

- Purificar la enzima glutatión reductasa mediante las distintas cromatografías líquidas intentando obtener la máxima pureza.
- Caracterización de la enzima glutatión reductasa una vez purificada en función de la concentración de GSSG y NADPH, y actividad a diferentes valores de pH.

3. Materiales y métodos.

3.1. Reactivos.

Trizma, PMSF, BSA, NaCl, Glutation oxidado, TEMED y el MES fueron proporcionados por Sigma; EDTA y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por Panreac; NADPH por Chem Cruz y Protein Assay Dye Reagent Concentrate fue proporcionado por Bio-Rad.

3.2. Obtención del extracto libre de células.

5 g de hígado de vaca de la marca HACENDADO, congelado a -20°C , se trocearon y se homogeneizaron en 20 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 8, EDTA 1 mM y 1 mM PMSF, mediante un disruptor Heidolph TYP 10G. Se centrifugó a $15000\times g$ durante 30 min a 4°C . El sobrenadante, o extracto libre de células, constituyó el material de partida de la purificación.

3.3. Fraccionamiento proteico con sulfato amónico.

El extracto libre de células se puso en un baño de hielo a 4°C y continua agitación. A esta disolución se le fue añadiendo poco a poco sulfato amónico hasta un determinado porcentaje de saturación, siguiendo las indicaciones de un programa informático (Ammonium sulfate calculator ; <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>). Tras la adición se centrifuga a $10000\times g$ durante 15 minutos a 4°C , recuperamos el sobrenadante y conservamos el precipitado. Al sobrenadante le

medimos la actividad enzimática y si es considerable se sigue añadiendo sulfato amónico, repitiendo el procedimiento hasta conseguir que la cantidad de enzima deseada haya precipitado. El precipitado con mayor actividad fue resuspendido con el tampón de homogenización.

3.4. Cromatografías.

3.4.1. Cromatografía de intercambio iónico DEAE-sepharose.

Columna (1x9 cm) de DEAE-sepharose Fast Flow (GE Healthcare), equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, a un flujo de 2 mL/min regulado por una bomba peristáltica Minipuls3 (Gibson) (Figura 3.4.1). Tras la introducción de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio. Se aplicó un flujo isocrático en Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, 200 mM NaCl, para eluir la proteína retenida en la columna. Se recolectaron fracciones de 5ml durante todo el proceso.

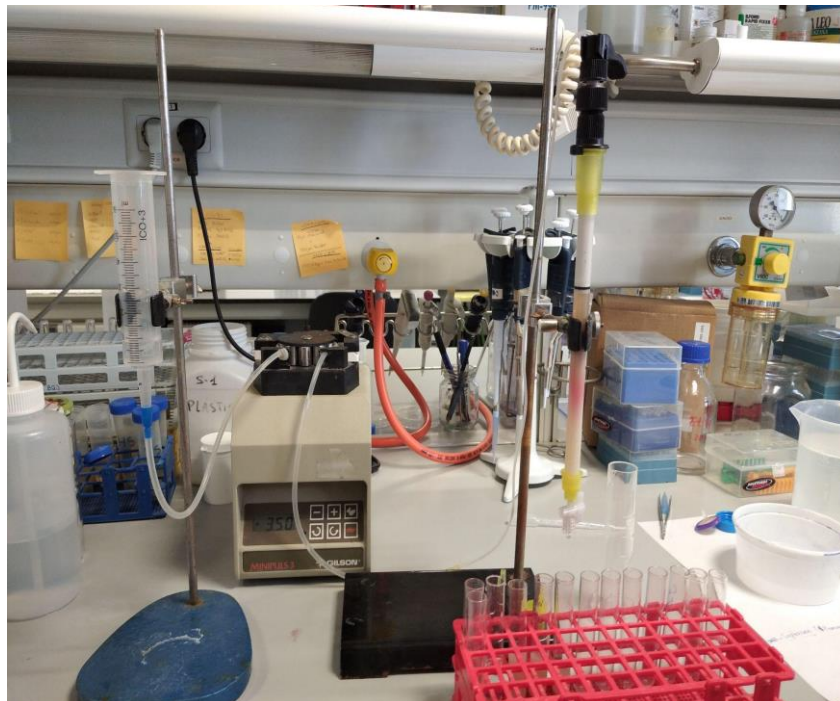


Figura 3.4.1: Columna de intercambio iónico DEAE-sepharose.

3.4.2. Cromatografía de intercambio iónico MonoQ.

Columna Mono-Q (Pharmacia Biotech), acoplada a un equipo FPLC (BioRad Duo Flow) equilibrada en Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, a un flujo de 1 mL/min (Figura 3.4.2). Tras la introducción de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio. Se recolectaron fracciones de 5 mL durante la recolección del flow through. Posteriormente se aplicó un gradiente de 20 mL de NaCl (0-200 mM) en Tris-

HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, para eluir las proteínas retenidas en la columna y finalmente, un lavado a 1 M de NaCl.



Figura 3.4.2: Columna Mono-Q acoplada a un equipo FPLC.

3.4.3. *Cromatografía de intercambio iónico Mono-S.*

Columna Mono-S (Pharmacia Biotech), acoplada al equipo FPLC, equilibrada en MES 20 mM, pH 6.2, EDTA 0,1 mM, a un flujo de 1 mL/min. Tras la introducción de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio. Se recolectaron fracciones de 5 mL durante la recolección del flow through. Entonces se aplicó un gradiente de 20 mL de NaCl (0-200 mM) en el tampón MES, para eluir las proteínas retenidas en la columna y, finalmente, un lavado a 1 M de NaCl. Se recolectaron fracciones de 2 mL durante la elución con NaCl.

3.4.4. *Cromatografía de exclusión molecular*

Columna de Sephacril-S200 (Sigma) (2 X 32 cm), equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8, 1 mM EDTA, a un flujo de 0.25 mL/min regulado por bomba peristáltica Minipuls3. Se recolectaron fracciones de 2,5 mL mediante un colector de fracciones RedFrac (Pharmacia).



Figura 3.4.3: Columna de sephacril-S200

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

Se tomaron alícuotas de las muestras representativas de los procesos de purificación y se diluyeron a 1 mg de proteína/ml. Se mezclaron con $\frac{1}{4}$ parte de de tampón de muestra (200 mM Tris-HCl, pH 6.8; SDS 6% p/v, β -mercaptoetanol 4% p/v; glicerol 60%; azul de bromofenol 0.6% p/v.) para SDS-PAGE y se calentaron a 100 °C durante 5 min. El gel de poliacrilamida tenía la siguiente composición:

- El gel separador 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.

Se cargaron 10µL de cada muestra en los geles. La electroforesis se desarrolló en una disolución de Trizma 0.69% p/v Tris, 2.88% p/v glicina 0.1% p/v SDS, a un voltaje constante 200 V durante 45 minutos.

Tras la electroforesis los geles se tiñeron con una disolución azul Coomassie (0.1% p/v Coomassie Blue R-25 en ácido acético y metanol al 10 y 40%, respectivamente) seguido de solución decolorante formada por ácido acético y metanol al 10 y 40% v/v, respectivamente.

3.6. Diálisis y concentración de muestra.

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, al menos durante 12h a 4°C.

Para concentrar muestras se utilizó un concentrador Spin-X^R VF20 (CORNING) sometido a centrifugación de 3000xg a 4°C durante 30 minutos.

3.7. Determinación de la concentración de proteínas.

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

3.8. Determinación de la actividad enzimática.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo empleando una disolución de 100µL que contiene 0,1 mM NADPH Y 1 mM de glutation oxidado (GSSG) en tampón fosfato potásico 20 mM 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) a la cantidad de glutatió n reductasa necesaria para consumir 1 µmol de NADPH por minuto, considerando un coeficiente de extinción para el NADPH de $6220 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. La actividad enzimática por volumen de muestra se calcula mediante la expresión de la Figura 3.8.1.

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

Figura 3.8.1: 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 (1 cm); v: volumen de muestra (ml).

4. RESULTADOS.

El estudio trata sobre la purificación y caracterización de la enzima glutatión reductasa a partir de hígado de vaca (*Bos Taurus*), utilizando para su detección su actividad reductora sobre el glutatión oxidado (GSSG).

4.1. Purificación.

La muestra de hígado se obtuvo en un supermercado, como se describe en Materiales y Métodos. El medio de homogeneización fue tamponado a un pH ligeramente alcalino (pH 8), conteniendo compuestos que contribuyeran a evitar la degradación de las proteínas por proteasas y, por tanto, preservar la actividad de la enzima de interés. Concretamente, se utilizaron los reactivos PMSF y EDTA como inhibidores de proteasas.

La lisis celular se produjo con un homogeneizador de cuchillas y el homogenado se centrifugó para precipitar partículas insolubles, constituyendo el sobrenadante el extracto libre de células (ELC), que es considerado el material de partida de la purificación. Se analizó la actividad enzimática y la concentración de proteínas por espectrofotometría, para tener una idea de la cantidad inicial de enzima antes de iniciar la purificación. El ELC presentó una concentración de proteína de 31 mg/ml y una actividad específica de 38 mU/mg.

El primer paso de purificación fue el fraccionamiento proteico mediante la adición de sulfato de amonio al extracto libre de células. El sulfato amónico secuestra las moléculas de agua que mantienen a las proteínas en suspensión, disminuyendo así la solubilidad de las proteínas, lo que provoca la interacción entre ellas y su precipitación. Se llevó a cabo la precipitación a distintos porcentajes de saturación de sulfato de amonio, como se indica en Materiales y Métodos, y se analizó la actividad

de GR en la fracción soluble tras cada paso de purificación. Se planificó realizar la precipitación de sulfato amónico al 25, 50 y 75% de saturación. El sobrenadante obtenido tras precipitación al 25% de sulfato amónico presentaba un porcentaje de actividad GR total ligeramente superior al del ELC inicial. Este efecto podría deberse a la posible precipitación de alguna proteína o molécula que interfiriera en la actividad GR en el ELC. La precipitación al 50% de sulfato amónico se retuvo en el sobrenadante un 7.5% de actividad con respecto al ELC, por tanto, la enzima de interés había precipitado casi en su totalidad, por lo que no fue necesario continuar precipitando con sulfato amónico. En definitiva, la actividad GR del extracto libre de células precipita en un rango de saturación de sulfato amónico entre 25 y 50 %.

Se recuperó el precipitado y se disolvió en 9 mL tampón de homogeneización y se sometió a diálisis frente a un 1L de tampón Tris-HCl, 20mM, pH 8.2 y 1 mM EDTA. La muestra se mantuvo dializando durante una noche a 4° C y, como presentó turbidez, se clarificó por centrifugación a 15.000xg. Tras la diálisis, la muestra presentó un ligero incremento de volumen debido a la entrada de agua en la bolsa de diálisis por presión osmótica. Se analizó la actividad GR y la concentración de proteína de la muestra resultante, denominada FSA, y los resultados se muestran en la tabla 4.1.

El siguiente paso de purificación fue una cromatografía de intercambio iónico. La muestra resultante del fraccionamiento con sulfato amónico y la diálisis se pasó a través de una columna de DEA-sefarosa equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM. La retención de las proteínas en esta columna se produce por la atracción electrostática de la matriz cromatográfica, cargada positivamente, por las proteínas con cargas negativas. Por este motivo, el tampón de la muestra tenía un pH ligeramente alcalino (8,2), para potenciar la carga negativa de las proteínas en general. Tras lavar la columna con el tampón de equilibrio, para eliminar las proteínas no retenidas por la matriz, se aplicó un flujo isocrático de Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, 200 mM NaCl, para eluir las proteínas retenidas en la columna. Se recolectaron fracciones a las que se les midió su actividad así como la cantidad total de proteína por absorbancia a 280nm. El cromatograma del proceso de purificación se muestra en la figura 4.1.

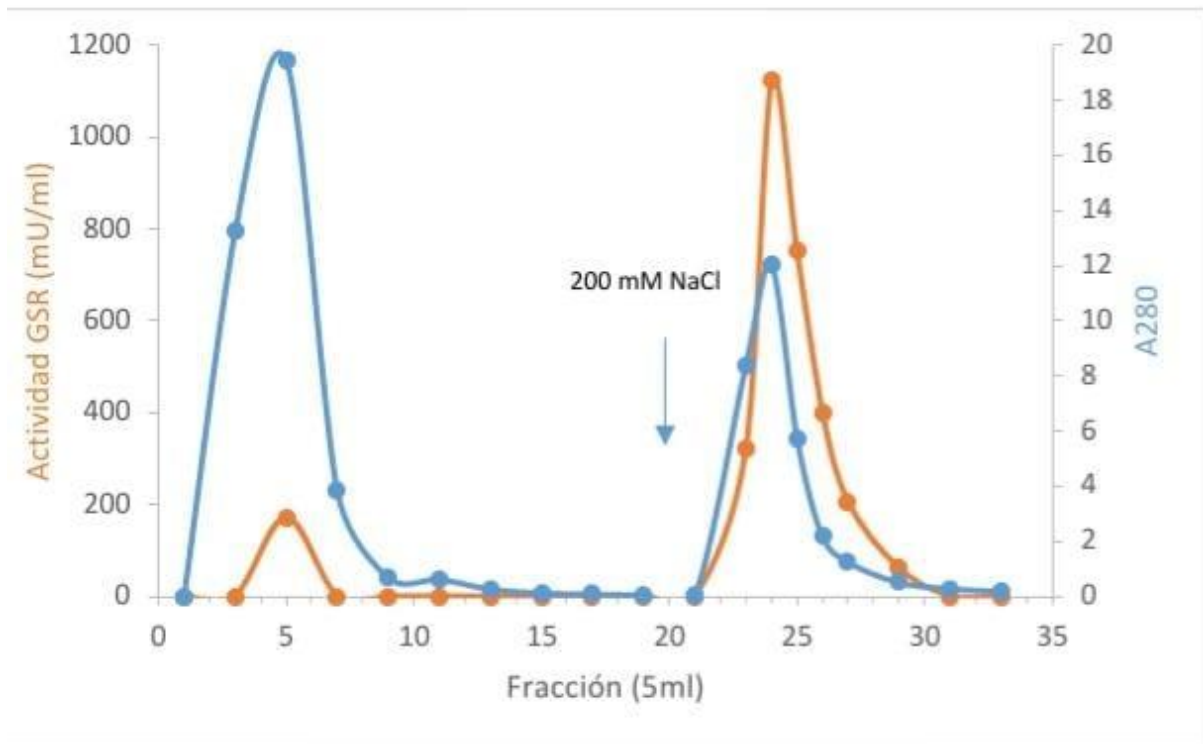


Figura 4.1.: Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefarosa. La línea azul muestra la absorbancia a 280nm y la línea naranja muestra la actividad de la glutatión reductasa. La flecha indica el momento de aplicación de la fase móvil con 200 mM NaCl.

Aunque se detectó un pequeño pico de actividad en el flow through, la mayoría de la actividad eluyó tras la aplicación de 200 mM de NaCl a la fase móvil. Finalmente, se recopilaron las fracciones con mayor actividad, conformando la muestra denominada DEAE, a la que se determinó la actividad GR y la concentración de proteína, y cuyos resultados se muestran en la tabla 4.1.

El siguiente paso de purificación fue otra cromatografía de intercambio iónico, ésta vez en columna MonoQ (Pharmacia), acoplada a un equipo FPLC y equilibrado con Tris-HCl 20 mM, pH 8.2, EDTA 1 mM. Esta es también una cromatografía de intercambio aniónico, como la DEAE, pero la matriz cromatográfica empleada, así como el equipo FPLC, que permite la cromatografía en gradiente continuo de elución, podrían lograr un proceso de purificación más selectivo. La muestra DEAE fue previamente dializada frente a 1L de tampón de equilibrio, para eliminar el NaCl que contenía de la cromatografía anterior. Durante la fase de carga de la muestra y lavado, se recolectó el flow through en fracciones. Posteriormente, se aplicó un gradiente de 20 mL de NaCl 0-200 mM para eluir las proteínas retenidas en la columna y finalmente, un lavado a 1 M de NaCl. Se analizó la actividad GR de todas las

fracciones obtenidas. El equipo FPLC permite un registro de la absorbancia a 280nm del eluyente. La figura 4.2 muestra los cromatogramas del proceso de purificación.

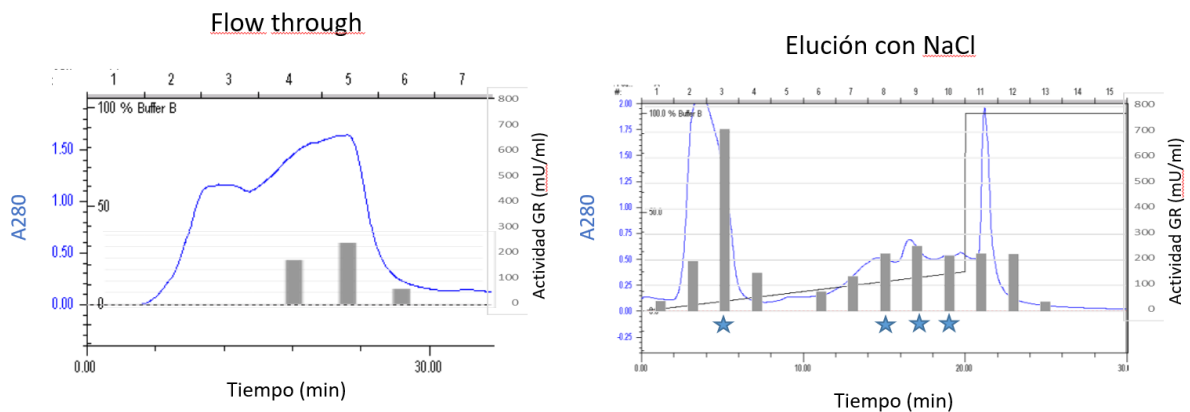


Figura 4.2.: Cromatografía de intercambio iónico en MonoQ. La línea azul muestra la absorbancia a 280nm y las barras muestran la actividad de Iglutación reductasa. Las estrellas indican las fracciones que se seleccionaron para conformar la muestra resultante de la purificación.

En contra de lo esperado, la cromatografía en columna MonoQ resultó decepcionante. Se eluyó algo de actividad en el flow through, pero el resto de actividad eluyó muy dispersa durante la fase de elución en gradiente y regeneración. Se reunieron varias fracciones por su contenido significativo en actividad, excluyendo aquellas que podrían contener gran cantidad de proteína contaminante, conformando la muestra MonoQ, cuya concentración de proteína y actividad GR se muestra en la tabla 4.1.

A continuación, se intentó probar con la Mono-S, de tipo catiónico, equilibrada en MES 20 mM, pH 6.2, EDTA 0,1 mM acoplada al equipo FPLC. En este caso, la matriz cromatográfica está dotada de carga negativa, por lo que se trata de retener en la columna a las proteínas con carga positiva y, para dotar a las proteínas en general de dicha carga, la muestra MonoQ fue dializada en el tampón de equilibrio citado que tenía un pH relativamente ácido (6,2). Tras la introducción de la muestra, la columna se lavó con el tampón de equilibrio y seguidamente se aplicó un gradiente de 20 mL de NaCl 0-200 mM en el tampón MES, para eluir las proteínas retenidas en la columna y, finalmente, un lavado a 1 M de NaCl. Se recolectaron fracciones durante todo el proceso. No se detectó actividad GR en ningunas de las fracciones, por lo que se comprobó la actividad GR a un remanente de la muestra dializada que no se sometió a la cromatografía. Tampoco esta muestra presentó actividad GR, por lo que se dedujo que el tratamiento de diálisis, sometiendo a la enzima a un pH ácido durante

varias horas, habría afectado a la estructura de la proteína y por tanto a su actividad enzimática.

En la tabla de purificación 4.1. se muestra los resultados de rendimiento (R) y enriquecimiento (E) obtenidos en los pasos de este proceso de purificación.

Tabla 4.1.: Balance de purificación de la actividad de glutatión reductasa de hígado de vaca. R: Rendimiento, muestra el porcentaje de actividad total de la muestra resultante con respecto a la muestra original (ELC). E: Enriquecimiento, indica el número de veces que es más pura en actividad con respecto a la muestra original.

Muestra	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad (mU/ml)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	R (%)	E (%)
ELC	18	31.2	1185	21335	38	100	1
FSA	11.8	28.7	2063	24344	71.9	114	1.9
DEAE	20	5.27	691.5	13029	123.7	61	3.25
Mono-Q	7.5	2.31	369,8	2743	160.1	12	4.21

Como se puede observar en la tabla, la precipitación con sulfato amónico casi duplica el enriquecimiento sin pérdida de enzima, de hecho, el rendimiento es ligeramente superior que en la muestra inicial. En la cromatografía iónica con DEAE, se perdió aproximadamente un 40% de la cantidad de enzima inicial, aunque no es un mal paso de purificación ya que se logra cierto enriquecimiento. Con respecto a la cromatografía de intercambio iónico Mono-Q, vemos una gran pérdida de rendimiento así como un escaso enriquecimiento, debido a que se ha producido una gran diseminación a lo largo de la columna cromatográfica. Este paso de purificación no resultó muy satisfactorio por lo que quedaría descartado para un segundo proceso de purificación con el que se pretende optimizar el proceso.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para analizar el contenido en proteínas de las muestras implicadas en la purificación (Figura 4. 3). En la electroforesis se aprecia una cierta disminución del número de bandas de proteína en las sucesivas muestras purificadas. Por otro lado, se puede observar una destacada banda entorno a 50kDa (señalada con una flecha) que pudiera corresponder al monómero de la enzima GR.

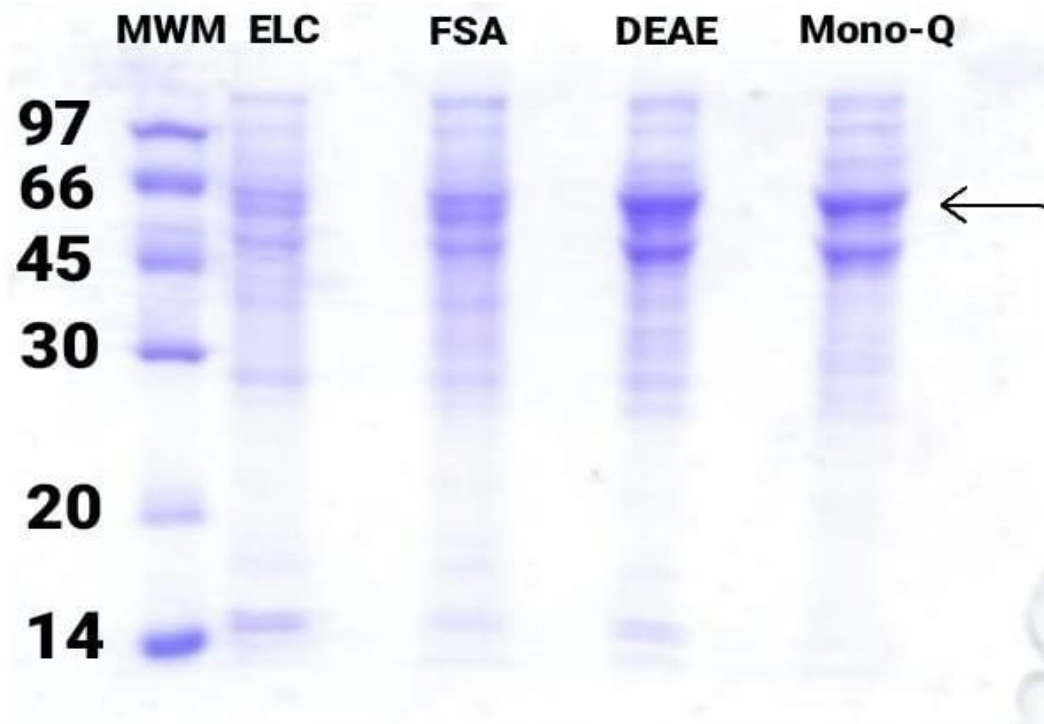


Figura 4.3: SDS-PAGE de las muestras del primer proceso de purificación. MWM: Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (kDa) se indica al lado de cada banda (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare). La flecha negra indica la banda correspondiente al monómero de la enzima glutatión reductasa.

El fraccionamiento con sulfato amónico tuvo un resultado discreto en cuanto a la exclusión de proteínas del ELC. La DEAE sefarosa supuso una exclusión proteica algo más significativa, así como la concentración de 2 bandas proteicas sobre 50 y 60 kDa, aproximadamente. Finalmente, la cromatografía de intercambio iónico Mono-Q no supuso una gran exclusión con respecto a la anterior, aunque produjo una gran pérdida de bandas de bajo peso molecular, por debajo de 30 kDa.

En un segundo proceso de purificación, se procedió inicialmente de la misma manera que en la anterior purificación. Se realizó el mismo proceso de homogeneización y el ELC presentó una concentración de proteína y actividad específica similares al anterior (Tabla 4.2). Se realizó también el mismo proceso de fraccionamiento con sulfato amónico, empleando el rango de saturación entre 25-50 %. Los resultados no fueron tan buenos como en fraccionamiento anterior, con una pérdida del 20% de enzima y un escaso enriquecimiento. Este resultado deja en entredicho la efectividad del fraccionamiento con sulfato amónico. No obstante, pensamos que es un proceso recomendable porque ayuda a concentrar y clarificar la muestra de cara al siguiente paso de purificación por cromatografía.

Tras el fraccionamiento la muestra se dializó en Tris-HCl 50mM, pH 8, 1mM EDTA y 1 mM PMSF, y se centrifugó para eliminar impurezas insolubles, obteniéndose la muestra FSA.

A continuación, la muestra FSA se sometió a la cromatografía en columna de DEAE-sefarosa, equilibrada con tampón Tris-HCl 20mM, pH 8.2, EDTA 1 mM, en las mismas condiciones que en la purificación anterior excepto que, después del flow through, se llevó a cabo una elución en gradiente discontinuo de sal, introduciendo sucesivamente alícuotas de 5 mL con una concentración de NaCl cada vez 10 mM superior, hasta alcanzar una concentración 200 mM de NaCl. Finalmente, se regeneró la columna con 1 M de NaCl. Se recolectaron fracciones de 5ml a las que se le midió su actividad GR y la cantidad total de proteína por absorbancia a 280 nm. El cromatograma resultante se muestra en la figura 4.4:

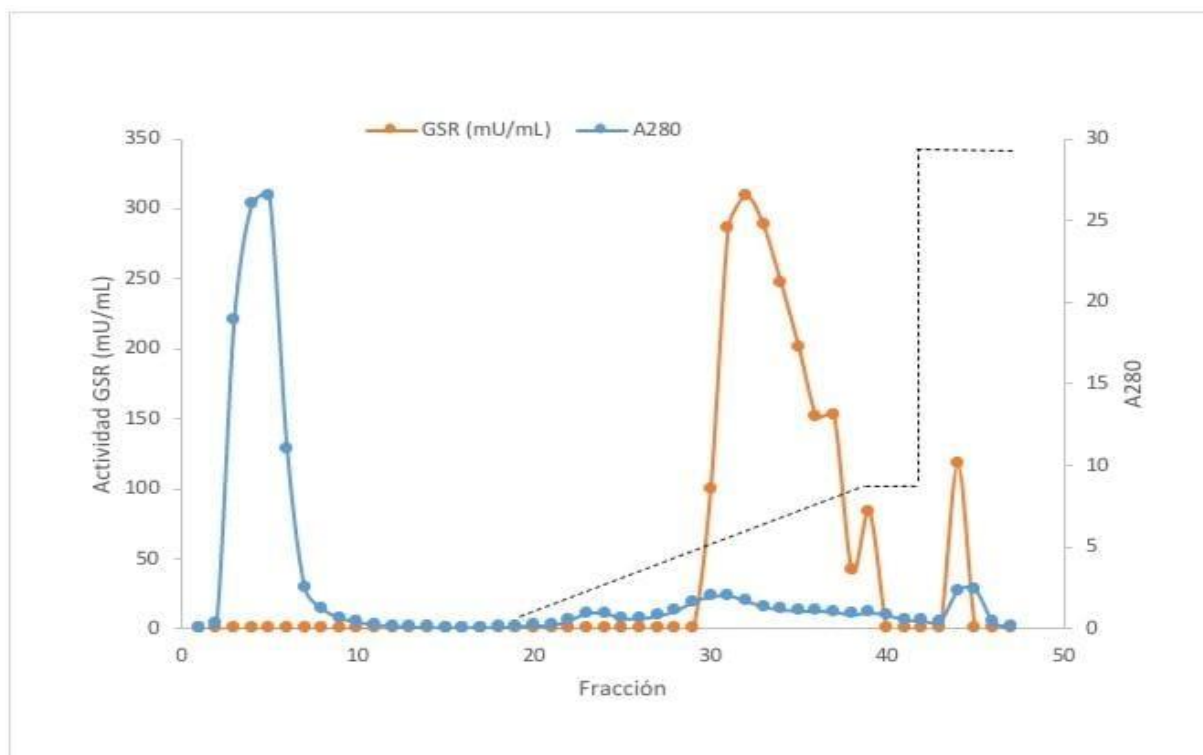


Figura 4.4: Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-sefarosa. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm y la línea naranja muestra la actividad glutatión reductasa. La línea discontinua indica el gradiente de concentración de NaCl.

La enzima glutatión reductasa fue eluida en un único pico bien definido a partir de la mitad del gradiente. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de actividad, conformando la muestra DEAE, cuya concentración de proteína y actividad

se muestran en la Tabla 4.2. Comparando con la cromatografía DEAE de la primera purificación, la aplicación de un gradiente salino mejoró el enriquecimiento de la muestra, sin embargo la pérdida de enzima de la muestra fue notablemente mayor, con un 75% frente al 40% de la cromatografía anterior, de elución isocrática.

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephacril-S200. En las cromatografías de exclusión molecular, la retención se produce en función del tamaño de los poros de la matriz cromatográfica, por lo que la separación de las proteínas se efectúa en función del tamaño de éstas y su capacidad de penetrar en los poros. Las moléculas más pequeñas penetran con más facilidad en los poros de la matriz y permanecen más retenidas en su paso a través de la columna, las moléculas grandes sin embargo atraviesan más rápido la matriz cromatográfica 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 el volumen de la muestra debe ser reducido. Para reducir el volumen de muestra se utilizó un concentrador Spin-X^R VF20 (CORNING), que contiene una membrana porosa que permite el paso del disolvente y las moléculas de bajo peso molecular, reteniendo y concentrando así a las de mayor peso molecular. Tras introducir la muestra en la columna, se continuó aplicando tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, 1 mM EDTA, a un flujo de 0.25 mL/min. Se recolectaron fracciones de 2,5 mL a las que se le midió la actividad y analizó contenido de proteína. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 4.5: Como se puede observar en el cromatograma, la elución de la actividad muestra se ha producido en un único pico que coincide prácticamente con un gran pico de proteína general que eluye. Por tanto, la cromatografía de exclusión molecular no parece ser efectiva porque apenas separa proteínas. Se reunieron las fracciones con actividad GR, excluyendo aquellas a los flancos del pico con menos actividad, conformando la muestra EM, con la que se concluyó el proceso de purificación ya que la cantidad de enzima total de la muestra era ya muy reducida. Según el fabricante (Sigma), la Sephacryl S200 separa proteínas globulares en un rango entre 5 y 250 kDa (<https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/s200hr>). Por tanto, el resultado obtenido no parece fiable y puede que la matriz cromatográfica empleada esté deteriorada.

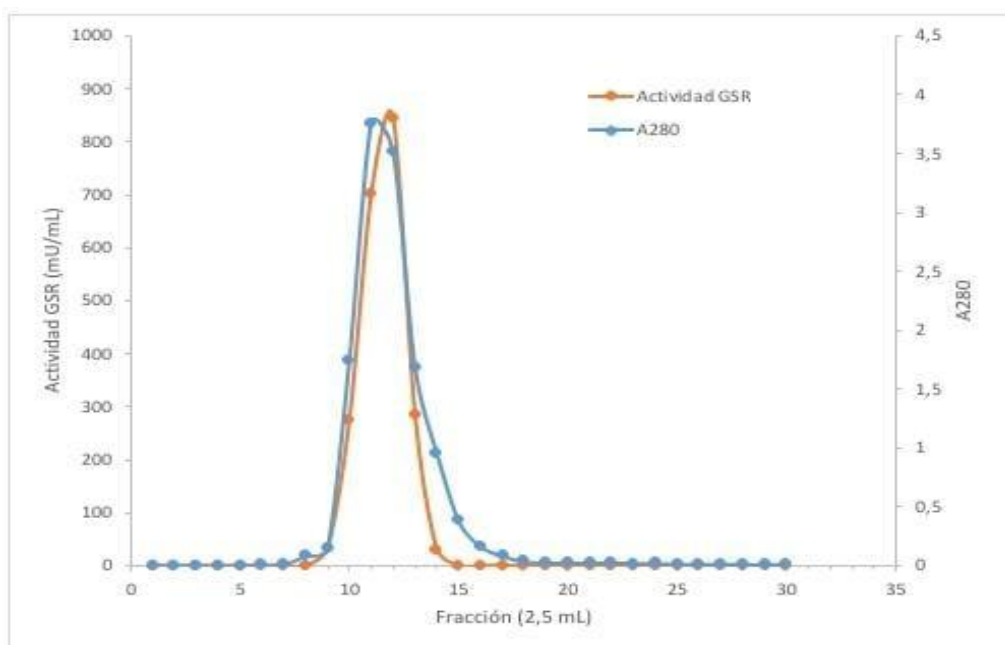


Figura 4.5: Cromatografía de exclusión molecular. La línea azul muestra la absorbancia a 280 nm y la línea naranja muestra la actividad de la glutatión reductasa.

El balance general de este segundo proceso de purificación se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Balance del segundo proceso de purificación de la actividad de glutatión reductasa de hígado de vaca. R: Rendimiento, muestra el porcentaje de actividad total de la muestra resultante con respecto a la muestra original (ELC). E: Enriquecimiento, indica el número de veces que es más pura en actividad con respecto a la muestra original.

Muestra	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad (mU/ml)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg)	R (%)	E (%)
ELC	24	25.67	1059	25424	41.25	100	1
FSA	8.3	52.41	2688	22315	51.29	88	1.25
DEAE	25	1.42	254.49	6362	179.21	25	4.34
EM	4.5	4.95	809	3645	163.4	14	3.96

Comparando los resultados de ambas tablas de purificación, se puede concluir que la precipitación con sulfato amónico no es un paso comprometido en cuanto al rendimiento, sin embargo, el grado de enriquecimiento es relativamente pobre. El fraccionamiento con sulfato amónico permite concentrar la cantidad de proteína del

extracto libre de células aunque apenas aporta enriquecimiento a la purificación. En cuanto a las cromatografías de intercambio iónico en columna de DEAE-sefarosa podemos observar que la aplicación de un gradiente salino para eluir a las proteínas retenidas mejora el enriquecimiento, pero es peor en cuanto a rendimiento. A partir de este paso de purificación, los intentos realizados en una y otra purificación fueron ineficaces. Si se somete a la enzima a un pH relativamente ácido durante mucho tiempo, se destruye su actividad posiblemente por deformación de su estructura. La cromatografía en MonoQ resultó deficiente por la gran dispersión de la enzima durante el proceso. Posiblemente se debería haber realizado la cromatografía a un pH superior para mejorar la retención de la enzima. La cromatografía de exclusión molecular no fue efectiva para el proceso de purificación ya que, además de empobrecer la pureza en GR de la muestra, se pierde una cantidad importante de enzima, aunque esta pérdida podría haber ocurrido en el proceso de concentración de muestra.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE para analizar el contenido en proteínas de las muestras implicadas en este segundo proceso de purificación (Figura 4.6).

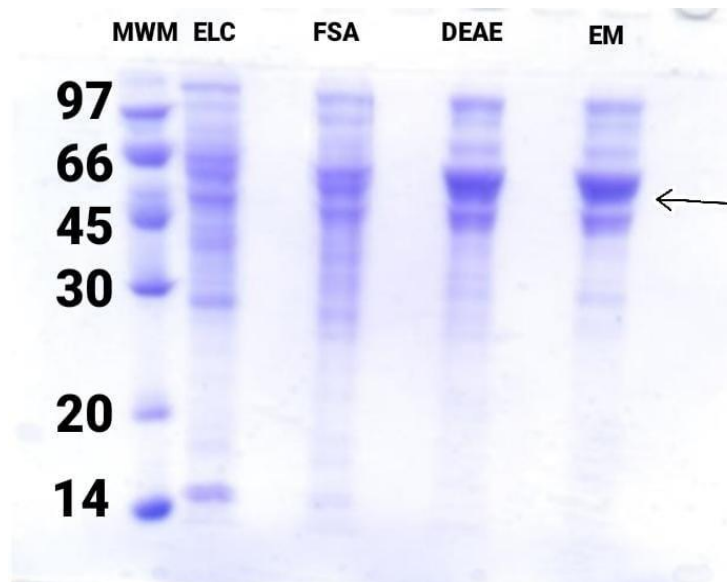


Figura 4.6: SDS-PAGE de las muestras del primer proceso de purificación. MWM: Proteínas marcadoras cuyo peso molecular (kDa) se indica al lado de cada banda (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, GE Healthcare). La flecha negra indica la banda que posiblemente corresponda al monómero de la enzima glutatión reductasa.

La composición proteica de las muestras implicadas en ambas purificaciones es aparentemente bastante similar. En la segunda purificación destacan las dos

bandas de 50 y 60 kDa en las muestras DEAE y la final EM, que también destacaron en la primera purificación. Posiblemente, alguna de dichas bandas pueda corresponder a la glutatión reductasa. En la base de datos Uniprot hay un registro (E1BKZ1_BOVIN) correspondiente a la glutatión reductasa de vaca en el que se indica que el polipéptido de GR tiene un tamaño teórico de 56,3 kDa (<https://www.uniprot.org/uniprot/E1BKZ1>).

4.2. Caracterización de la actividad glutatión reductasa.

Se hicieron una serie de pruebas de caracterización utilizando como muestra la preparación EM de la segunda purificación.

4.2.1 Caracterización cinética en función de la concentración de glutatión oxidado.

Se realizaron varios ensayos de actividad a una concentración fija de NADPH y variando la concentración de glutatión oxidado. El resultado se muestra en la Figura 4.7.

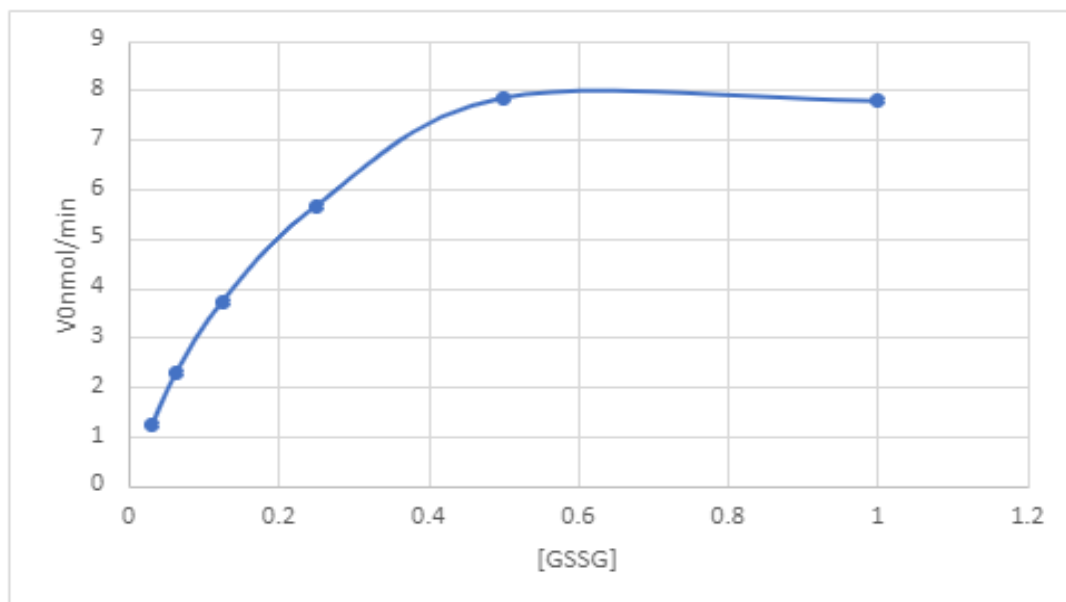


Figura 4.7: Velocidad inicial (V_0) de consumo de NADPH a diferentes concentraciones de glutatión oxidado (GSSG).

La tendencia de la curva sigue la cinética de Michaelis Menten. A partir de la representación de Lineaweaver-Burk (Figura 4.8) se determinó la constante de Michaelis (K_m) de la enzima para el sustrato glutatión oxidado, a partir de los valores

de la ecuación de la recta. Tales valores revelaron una V_{\max} de 11,1 nmol/min ($1/V_{\max} = 0.09$) y de ahí una K_m de 0.25 mM ($K_m/V_{\max} = 0.0225$).

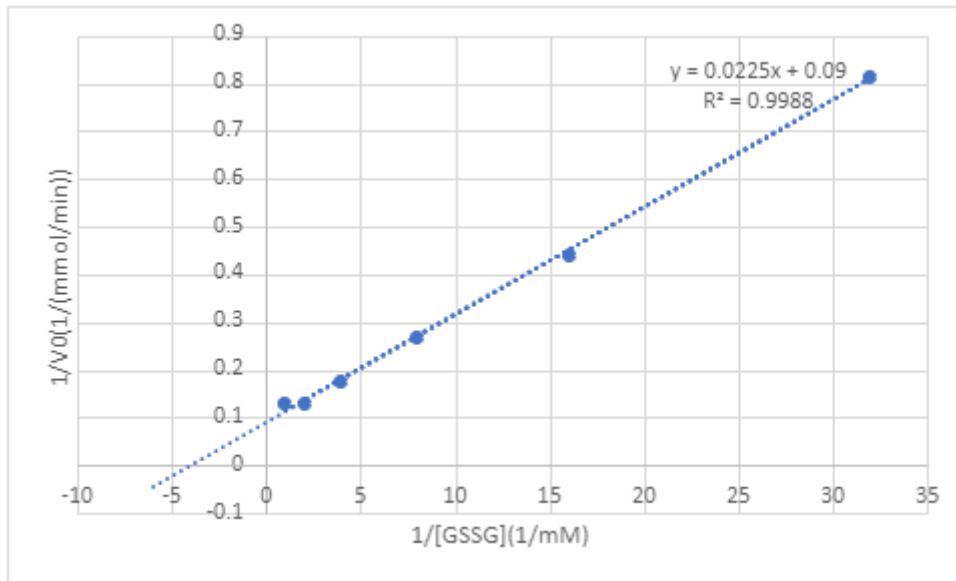


Figura 4.8: Representación Lineweaver-Burk a partir de los datos de ensayos de actividad glutatión reductasa modificando la concentración de sustrato (GSSG).

4.2.2 Caracterización cinética en función de la concentración de NADPH.

Se realizaron ensayos de actividad a una concentración fija de GSSG (1 mM) y variando la concentración de NADPH. Los resultados se muestran en la Figura 4.9. También, la tendencia de la curva sigue la cinética de Michaelis Menten, A partir de la representación de Lineaweaver-Burk (Figura 4.10) se determinó del mismo modo que en el caso anterior, que la K_m de la glutatión reductasa para el NADPH es 13 μ M.

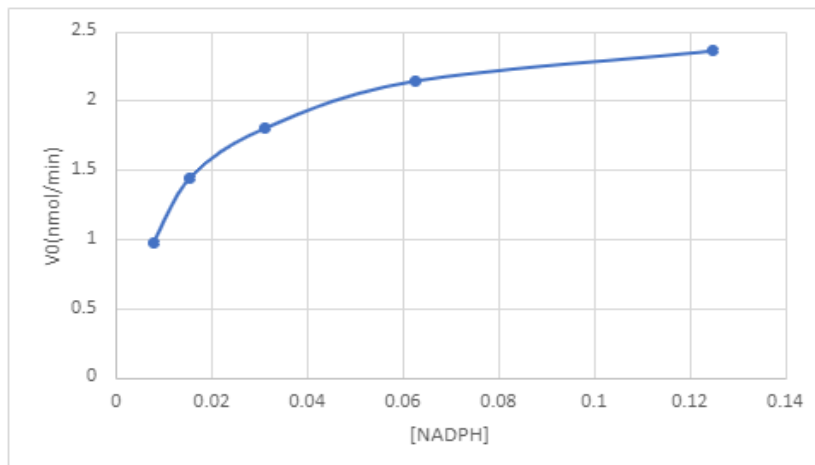


Figura 4.9: Velocidad inicial (v_0) de consumo de NADPH a diferentes concentraciones de NADPH.

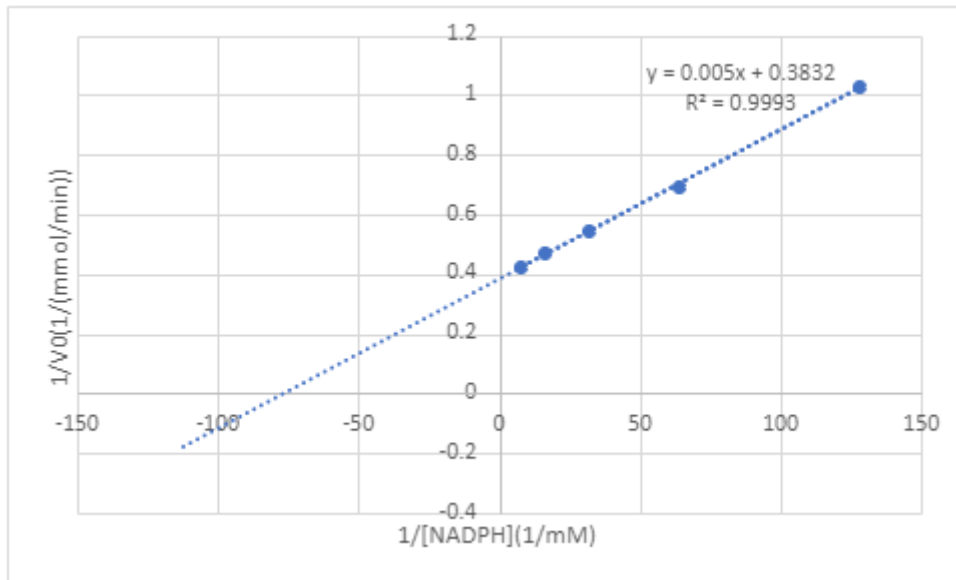


Figura 4.10: Representación Lineweaver-Burk a partir de los datos de ensayos de actividad glutatión reductasa modificando la concentración de NADPH.

4.2.3. pH óptimo de la actividad glutatión reductasa.

Esta prueba se basó en la medida de la actividad modificando el pH del tampón utilizado en los ensayos de actividad. Los resultados se muestran en la Figura 4.11.

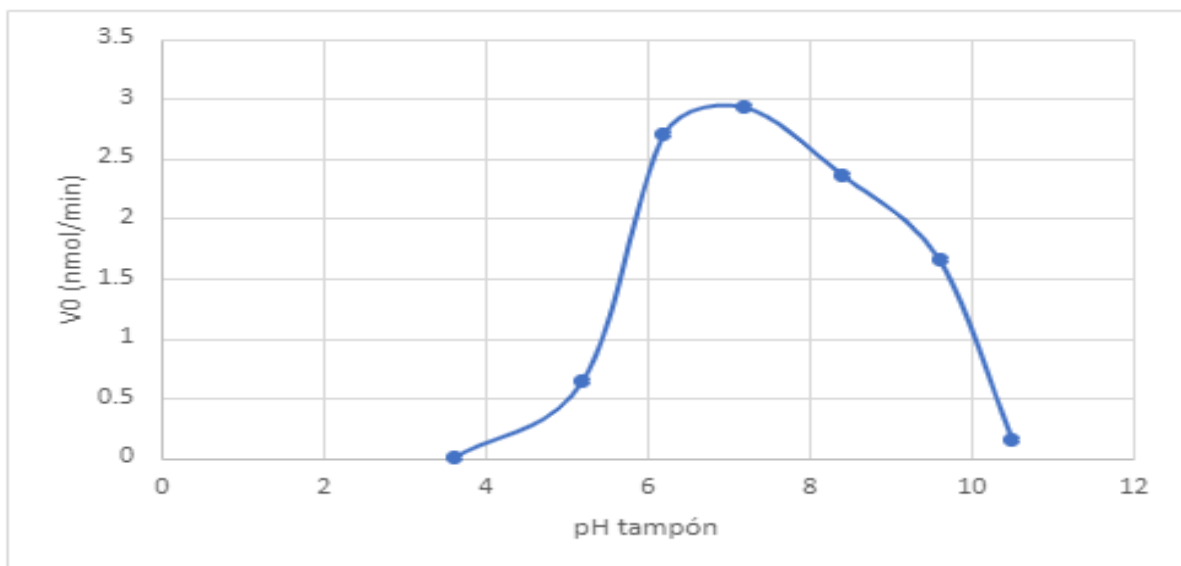


Figura 4.11: ensayos de actividad glutatión reductasa, modificando el pH del tampón.

Como podemos observar la curva de actividad en función del pH resulta en una campana de Gauss algo asimétrica, más acusada hacia a valores de pH ácidos. Bajo nuestra apreciación, el pH óptimo de la enzima es aproximadamente 7,2.

5. DISCUSIÓN.

Se ha realizado dos purificaciones las cuales no han sido muy efectivas, se ha empleado en ambas el uso del sulfato amónico así como la DEAE sefarosa, uno de los motivos es debido a la instrumentación de la que se disponía ya que también se carecía de otro tipo de instrumentación la cual se ha echado en falta su uso como la cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP Sepharose-4B la cual se obtiene una gran cantidad de rendimiento.(Erat M et al.,2005; Tekman B. et al.,2008) .

Se ha podido constatar con los resultados de las electroforesis en las cuales se ha visto bandas de menor tamaño acompañando a la del glutatión reductasa.

Con los pasos de purificación realizados y los resultados obtenidos, se ha podido destacar que aun siendo usado en anteriores purificaciones (López-Barea y Lee, 1979) se ha podido demostrar que el fraccionamiento con sulfato amónico concentra la cantidad de proteína del extracto libre de células, aunque apenas enriquece a la purificación.

Los resultados de otras investigaciones (Erat M et al.,2005; Tekman B. et al.,2008) podemos resaltar la función antes mencionada del sulfato amónico, así como el uso de dos técnicas en concreto, la cromatografía de afinidad en 2',5'-ADP Sepharose-4B y cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-200. Con la primera se obtiene una gran purificación sin apenas perder rendimiento, con lo cual se podría decir que es de las mejores técnicas, con respecto a la segunda se produce todo lo contrario, una gran pérdida del rendimiento, así como una purificación relativamente baja en comparación la anterior técnica.

Podemos destacar que la caracterización ha sido bien ejecutada teniendo en cuenta otras investigaciones (Tekman B. et al.,2008; Calberg et al.,1975) el pH óptimo de la enzima ronda alrededor de 7 y 8.5 obteniendo nosotros en nuestro ensayo un valor de pH óptimo de 7.2.

Teniendo en cuenta los resultados de las diferentes investigaciones (Tekman B. et al.,2008; Erat M et al.,2005; Racker,1955) en cuanto a la purificación de la enzima podemos destacar que el hecho del uso de la cromatografía líquida alberga los mejores resultados de purificación.

6. CONCLUSIONES.

- No se ha conseguido una purificación a homogeneidad de la enzima glutatión reductasa de hígado de vaca con las técnicas empleadas en este estudio.
- El fraccionamiento con sulfato amónico no supone una pérdida significativa de enzima de la muestra, pero tampoco supone un enriquecimiento significativo, por lo que es un paso de purificación poco eficaz.
- La cromatografía de intercambio iónico en DEAE ha resultado el paso de purificación más eficaz en cuanto a enriquecimiento. Sin embargo, es preferible en cuanto a rendimiento se refiere, realizar una elución isocrática de la enzima a una elución en gradiente.
- La cromatografía de intercambio iónico Mono-Q, a supuesto una gran pérdida de rendimiento y a la vez muy poco enriquecimiento, con lo cual este paso es muy poco eficaz en las condiciones probadas. Posiblemente, un incremento de pH en la cromatografía mejore el resultado.
- El sometimiento de la muestra durante un tiempo prolongado a un pH relativamente ácido afecta a la actividad de la enzima. Por tanto, de realizar una cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, en MonoS, habría que realizarla a pH en torno al neutro.
- La cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl-S200 no fue efectiva para el proceso de purificación porque no incrementó el enriquecimiento con respecto a la muestra precedente.
- En las pruebas de caracterización, se han estimado unos valores K_m para los sustratos NADPH y GSSG de 13 mM y 0,25 mM, respectivamente. La afinidad de la enzima por el NADPH es mayor que por el glutatión oxidado.
- El pH óptimo de la GR de *Bos taurus* es aproximadamente 7,2.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- BERKHOLZ, D.S., FABER, H.R., SAVVIDES, S.N., KARPLUS, A. (2008). "Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution." *J. Mol. Biol.* 382, pp. 371-384 doi:10.1016/j.jmb.2008.06.083.
- ERAT, M., DEMIR, H., & ŠAKIROGLU, H. (2005). Purification of glutathione reductase from chicken liver and investigation of kinetic properties. *Applied biochemistry and biotechnology*, 125(2), 127-138. doi: 10.1385/ABAB:125:2:127
- GALIAZZO, F., SCHIESSER, A., ROTILIO, G. (1987)." Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzyme and induction by oxidative conditions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 147, pp. 1200-1205 . doi: 10.1016/s0006-291x(87)80197-3
- KAPPUS, H., SIES, H. (1981). "Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation." *Experientia* 37, pp. 1233-1241 . doi: 10.1007/BF01948335.
- LAWRENCE, L., BURK, R.F.(1976)." Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 71, pp. 952-958 (1976). doi: 10.1016/0006-291x(76)90747-6
- LÓPEZ-BAREA, J., & LEE, C. Y. (1979). Mouse-Liver Glutathione Reductase: Purification, Kinetics, and Regulation. *European Journal of Biochemistry*, 98(2), 487-499. doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13210.x
- MANEVICH, Y., FEINSTEIN, S.I., FISHER, A.B.(2004). "Activation of the antioxidant enzyme 1-Cys peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with π GST." *PNAS* 101, pp. 3780-3785 (2004). doi: 10.1073/pnas.0400181101
- MARGIS, R., DUNAND, C., TEIXEIRA, F.K., MARGIS-PINHEIRO, M. (2008). "Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview." *FEBS Journal* 275, pp. 3959-3970 . doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x
- PEDRAJAS, J.R., PADILLA, A., MCDONAGH, B., BÁRCENA, J.A.(2010). "Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1.Cys peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*." *Antioxidant & Redox Signaling* 13, pp. 249-258 . doi: 10.1089/ars.2009.2950
- POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., DE TATA, V., CASINI, A.F. (2003). "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist." *Biochemical Pharmacology* 66, pp. 1499-1503. doi: 10.1016/S0006-2952(03)00504-5.

-PRUCHNIAK, M.P., ARAZNA, M., DEMKOW, U.(2016).” Biochemistry of oxidative stress.” *Adv. Exp. Medicine, Biology – Neuroscience and Respiration* 17, pp. 9-19. doi: 10.1007/5584_2015_161.

-RACKER, E. (1955). Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem*, 217(2), 855-865.

SIES, H.(2014).” Role of metabolic H₂O₂ generation. Redox signaling and oxidative stress.” *Journal of Biological Chemistry* 289, pp. 8735-8741. doi: 10.1074/jbc.R113.544635.

-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

-WEYDERT, C.J., CULLEN, J.J.(2009).” Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue.” *Nat Protoc.* 5, pp. 51-66 . doi: 10.1038/nprot.2009.197