

11261



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

9
2ej

**Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado
e Investigación**

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA GLUTATION

REDUCTASA DE *Rhodospirillum rubrum*

**ENFERMEDAD CON
VALLE DE ORIGEN**

T E S I S

Que para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOQUIMICA)

p r e s e n t a:

CARLOS ALBERTO LIBREROS MINOTTA

México, D. F.

1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
Abreviaturas _____	1
Resumen _____	2
Introducción _____	4
Objetivos _____	11
Material y Metodos _____	12
Resultados _____	32
Discusión y Conclusiones _____	59
Perspectivas _____	71
Referencias _____	72

ABREVIATURAS.

Bis-Tris	Bis-(2-hidroxietil) imino-tris-(hidroximetil) metano.
CoASSG	Disulfuro mixto de la coenzima A y el glutati6n.
DEAE	Dietilaminoetil.
DTNB	5,5' ditiobis (2 6cido nitrobenzoico).
EDTA	Etilendinitrilotetracetato dis6dico.
FAD	Flavina adenina dinucle6tido (forma oxidada).
GSH	Glutati6n (forma reducida).
GSSG	Glutati6n (forma oxidada).
GR	Glutati6n reductasa.
Km	Constante de afinidad.
Km _{app}	Constante de afinidad aparente.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato (forma reducido).
NAD (P) ⁺	Nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato (forma oxidado).
NADH	Nicotinamida adenina dinucle6tido (forma reducida).
Mes	Acido N-morfolinoetano sulf6nico.
Mops	Acido N morfolinopropano sulf6nico.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
V _{max}	Velocidad m6xima
V _{max} _{app}	Velocidad m6xima aparente.

RESUMEN

La glutatión reductasa (NADPH [H] : GSSG oxidorreductasa EC 1.6.4.2.) ha sido extensamente caracterizada en eucariotes; sin embargo, existe poca información para la enzima de procariotes. En el presente trabajo se reporta la purificación a homogeneidad y propiedades generales de la glutatión reductasa de la bacteria *Rhodospirillum rubrum*. El protocolo de purificación, partiendo de un extracto libre de cromatóforos incluyó: 1) fraccionamiento salino en sulfato de amonio, 2) cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel, y 3) cromatografía de afinidad en 2',5', ADP-Sepharosa 4B. La enzima purificada mostró una actividad específica de $102 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ y un espectro de absorción típico de una flavoproteína con 3 picos máximos a 274, 365 y 458 nm con una relación de absorbancia A_{290}/A_{458} de 7.61. La composición de aminoácidos de la preparación pura mostró un alto contenido de residuos de glicinas y argininas. La titulación de la proteína con 5,5'- ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) mostró un total de 2 grupos tioles libres por subunidad, uno de los cuales es accesible solamente en condiciones desnaturalizantes. La enzima nativa presentó un punto isoeléctrico de 5.2. Los valores de K_m , para el NADPH y el GSSG a pH 7.5, fueron de $11 \mu\text{M}$ y $60 \mu\text{M}$, respectivamente. La actividad de reductasa dependiente de NADH (2 \times de la calculada con NADPH) alcanzó un óptimo a pH 7.5. La enzima reconoció el disulfuro mixto de la Coenzima A y el GSSG, aunque

con una afinidad baja ($K_m = 3.2 \text{ mM}$). Las determinaciones de peso molecular en condiciones nativas y desnaturalizantes, sugieren que la enzima es un dímero constituido por subunidades probablemente idénticas con un peso molecular de 54400 Da. Otros parámetros fisicoquímicos de la enzima son: coeficiente de sedimentación de 5.71 S; radio de Stockes de 4.2 nm; coeficiente de difusión de $51 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y un volumen parcial específico de $0.724 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, los cuales también son consistentes con una molécula de 110000 Da.

Los resultados obtenidos se discuten a la luz de un reporte previo (61) con enzima parcialmente pura, en el cual se sugiere que la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* es un monómero.

INTRODUCCION

El glutatión (L- γ -L - glutamil cisteinil glicina), un compuesto de naturaleza peptídica, es probablemente el tiol de bajo peso molecular más abundante en casi todas las células (1).

El glutatión en su forma reducida (GSH) participa, directa o indirectamente, en varios fenómenos biológicos importantes, tales como: a) substrato de un gran número de enzimas (por ejemplo: la glutatión peroxidasa, glutatión S transferasas, algunas transhidrogenasas, etc.); b) participa en la estabilización de las proteínas, actuando catalíticamente en el rearreglo de disulfuros formados incorrectamente durante el plegamiento proteico; c) funciona principalmente como reductor de los procesos de oxidación-reducción del metabolismo celular (2); d) actúa como regulador metabólico activando y desactivando enzimas; e) participa en la protección de la célula contra radiaciones ionizantes (3,4); f) en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular (5,6), y g) detoxifica a la célula de una variedad de compuestos electrofílicos potencialmente nocivos.

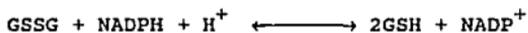
Como resultado de los procesos en los cuales participa, el glutatión se oxida dando lugar a la formación de su respectivo disulfuro (GSSG); por ejemplo, el GSH intracelular se convierte a GSSG por la glutatión peroxidasa, la cual cataliza la reducción del H₂O₂ y otros peróxidos. El GSH también se transforma a GSSG por transhidrogenación y al reaccionar con radicales libres. Además, se ha reportado la conversión extracelular de GSH a GSSG; la

reacción requiere de O₂ y permite la formación de H₂O₂.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la célula necesita de un sistema regenerador de GSH, toda vez que la acumulación de su forma oxidada originaría, a la postre, consecuencias letales para la célula. En principio, la necesidad de dicho sistema sugeriría una distribución universal en todos los seres vivos.

Hopkins y Elliot (7) descubrieron en hígado de rata una enzima capaz de reducir el disulfuro del glutati6n (GSSG). En 1932, Rall y Lehninger reportaron, en el mismo tejido, una enzima implicada directamente en la reducci6n del glutati6n oxidado (GSSG), la glutati6n reductasa (8).

La glutati6n reductasa (GR) [NADPH (H): GSSG oxidoreductasa E.C.1.6.4.2] es una flavoproteína que cataliza la reducci6n por el NADPH del glutati6n oxidado (GSSG) , de acuerdo a la siguiente reacci6n :



La enzima es integrante de una clase importante de flavoproteínas, las disulfuro oxidoreductasas, las cuales a pesar de que sus substratos varían ampliamente, comparten un mismo mecanismo catalítico. Otros integrantes de esta clase son la dihidrolipoamida deshidrogenasa (9,10), la tiorredoxina reductasa (11), y la mercúrico reductasa (12). Todas estas enzimas son proteínas diméricas con peso molecular alrededor de 105000 Da y con un FAD en su sitio activo.

Los estudios de secuencia alrededor del sitio activo, revelan una considerable homología entre la dihidrolipoamida deshidrogenasa, la glutatión reductasa, y la mercúrico reductasa, sugiriendo que estas enzimas son producto de una evolución divergente a partir de un ancestro común (12-14). Por otro lado, la tiorredoxina reductasa no muestra homología con alguna de las otras, por lo que, probablemente esta enzima sea el resultado de una evolución convergente (11).

La glutatión reductasa se encuentra ampliamente distribuida entre bacterias, hongos, plantas, protozoarios y mamíferos (15,17), pero no es universal. No se ha detectado en dos especies de arqueobacterias (18). En tripanosomátidos, la glutatión reductasa es sustituida por la tripanotión reductasa (19,20).

La célula, a través de la glutatión reductasa mantiene un nivel alto de GSH con una alta relación de $[GSH]/[GSSG]$, que alcanza valores desde 20 a 1000 (21), lo que probablemente es la base para el control del crecimiento y otras actividades celulares (22-25). También se ha sugerido que la glutatión reductasa ha participado, de una manera crucial, en la adaptación evolutiva al oxígeno atmosférico (18). La alta relación $[GHS]/[GSSG]$, mantenida por esta enzima en condiciones de estado estacionario, en células estrictamente aeróbicas, probablemente no difiera de la relación $[TIOL]/[DISULFURO]$ presente en las células que vivieron bajo una atmósfera reductora hace más de 2 billones de años (26,27). De ahí que, en ausencia de un mecanismo de protección, el oxígeno atmosférico podría haber causado una completa desaparición

de los tioles intracelulares (21).

Debido a las funciones importantes realizadas por el GSH en el metabolismo celular, la glutatión reductasa ha sido purificada hasta homogeneidad a partir de diversas fuentes. Estas incluyen bacterias (28-33), hongos (34-36), plantas (37,38) y animales (39-55), y sus propiedades moleculares han sido caracterizadas y estudiadas detalladamente en *Escherichia coli*, levadura del pan, hígado de ternera y eritrocitos de humano (15,16). Se ha observado que la glutatión reductasa aislada de una variedad de fuentes (Tabla I), desde bacterias hasta células de mamíferos, contiene al FAD como grupo prostético y muestra una gran similitud en sus parámetros cinéticos y físicos. No obstante, en ciertos organismos la enzima presenta propiedades significativamente diferentes a las de otras fuentes: 1) la forma predominante de la GR en la cianobacteria *Spirulina maxima* (33) es un tetrámero; 2) la enzima de leucocito humano tiene un peso molecular de sólo 19000 Da; 3) aunque se reportó inicialmente a la glutatión reductasa de hígado y eritrocito de conejo como monómeros de 60000 Da, estudios recientes son más consistentes con una estructura dimérica, semejante a la de otras especies; 4) las propiedades cinéticas y fisicoquímicas no usuales reportadas para la GR de eritrocito de conejo (49) aún están por confirmarse; 5) la GR de *Chromatium vinosum* tiene una Km alta para el GSSG (7 mM) y prefiere al NADH como coenzima en lugar del NADPH, (como es el caso para la enzima lipoamida deshidrogenasa). Esto apoya la idea de que *Chromatium* podría ejemplificar un estado primario en la evolución del

TABLA I

Propiedades cinéticas y moleculares de la glutatión reductasa
de diversas fuentes.

	Peso molecular del oligómero	Subunidades	Peso molecular subunidad	K _m (uM) GSSG	K _m (uM) NADPH	pI	pH óptimo	S _{20,w}	Radio de Stokes (mμ)
<u>Anabaena sp.</u>	104,000	2	53,000	210	9.4	4.02	9.0	6.06	4.13
<u>S. maxima</u>	96,000	2	47,000	120	3.5	4.35	7.0	5.96	
<u>E. coli</u>	109,600	2	55,000	66	16.0		7.5		4.00
<u>R. rubrum</u>	63,000			56	8.4		7.5-8.2		
Eritrocito de cerdo	103,000	2		76	21.0	6.85	7.0	5.70	4.30
Eritrocito de humano	105,000	2	52,400	65	85.0		6.8	5.50	4.10
Hígado de ternera	100,000	2		101	21.0	6.10	7.0	5.50	4.30
Hígado de ratón	105,000	2	55,000	107	5.9	6.46	7.2	6.13	4.18

TABLA I

λ/λ_0	Grupo prostético	Relación de Absorbancia		$D_{20, \nu}$ $\text{ua}^2 \text{seg}^{-1}$	Máximos de Absorbancia (nm)	Referencia
1.33	FAD	A274/A462= 6.36	A377/A462= 0.93		274, 377, 462	(32)
	FAD				271, 370, 460	(33)
		A272/A450= 7.50	A355/A450= 0.97		272, 355, 450	(30)
	FAD					(61)
1.37	FAD	A280/A462= 6.50		50.0		(41)
	FAD		A377/A463= 0.89	50.0		(50)
1.39	FAD	A280/A462= 6.50		49.6		(44)
1.34	FAD	A280/A460= 6.80	A365/A460= 1.17		273, 365, 460	(39)

metabolismo del GSH (31,56,57)

Otra característica de la glutatión reductasa es el alto grado de especificidad que exhibe por el NADPH (26), (excepto en el caso de la enzima de *Chromatium vinosum* (31), específica para el NADH). La preferencia por el NADPH sobre el NADH en las enzimas de humano y *E. coli*, ha sido discutida a la luz de la estructura tridimensional de la enzima (23,58). Los valores de Km para el NADPH, (de 3 a 20 μ M), son similares para la GR de diferentes fuentes (Tabla I).

Por otro lado, existe un cierto número de compuestos que se unen al sitio del GSSG de la glutatión reductasa, y que, sirven como sustratos de la enzima altamente purificada. En este sentido, cabe señalar al disulfuro mixto de la coenzima A y el glutatión (CoASSG), que ha sido estudiado. La GR de una variedad de fuentes (40,49,59,60) cataliza la reducción del CoASSG a una velocidad del 10% comparada a la del GSSG. Por otro lado, se ha postulado una reductasa específica para el CoASSG (18), pero su existencia ha sido controversial (33,60).

OBJETIVOS

De acuerdo a lo mencionado anteriormente y a la importancia de esta proteína en el mantenimiento de un estado redox óptimo para el buen funcionamiento del metabolismo celular, resalta el hecho que se conoce poco de la glutatión reductasa en procariotes; además, ésta presenta propiedades poco usuales que la hacen objeto interesante de estudiar. De este modo, nos hemos propuesto los siguientes objetivos a desarrollar en el presente trabajo:

a) Purificar hasta homogeneidad la GR de *Rhodospirillum rubrum* y obtenerla en cantidades relativamente altas.

b) Caracterizar las propiedades cinéticas y moleculares de la proteína.

c) Comparar nuestros resultados a la luz de un reporte previo de la GR de esta misma fuente (purificación parcial), en donde se sugiere que esta enzima es un monómero de peso molecular de 63000 Da (61). Este resultado llama considerablemente la atención, ya que por estudios cristalográficos de la GR de eritrocito humano (62), se conoce que esta enzima presenta 2 subunidades, y que el sitio de unión del GSSG está formado por residuos de los 2 monómeros, es decir, que el monómero como tal es inactivo.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de las bacteria

Se utilizó la cepa silvestre de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* en todos los experimentos. La cepa se obtuvo del Dr. A. Croffs, de la Universidad de Bristol U. K.

Medios de cultivo.

Los cultivos de esta bacteria se crecieron en medio sólido y líquido.

a) Medio sólido:

En un volumen final de 1 litro se disuelven:

Extracto de levadura.....3 g

Peptona de gelatina.....2 g

Agar bacteriológico.....12 g

El medio se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos en frascos de tapa con rosca de 15 a 20 ml de volumen, conteniendo solamente 10 ml de medio.

b) Medio líquido.

El medio líquido se preparó de acuerdo al método de Cohen-Bazire y col (1957), el cual es una modificación del método propuesto por Hunter (1950).

La preparación del medio requirió de las siguientes soluciones:

i) Base concentrada. Un volumen de 2 litros contiene:

N (CH ₂ COOH) ₃	20 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	28.9 g
CaCl ₂ .6H ₂ O.....	8.7 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O...0.	0.185 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.195 g
Solución de metales...	100 ml

Se ajusta a pH de 6.8

La solución de metales que se utiliza contiene:

EDTA.....	2.5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	5.0 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	11.0 g
MnSO ₄	1.54 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1.37 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0.392 g
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O.....	0.248 g
Na ₂ B ₄ O ₇ .6H ₂ O.....	0.177 g
H ₂ SO ₄	4 gotas (aprox)

La solución se afora a 1 litro con agua destilada, y se ajusta el pH a 6.8.

ii) KH₂PO₄, 136.08 g para 1 litro de agua destilada, y se ajusta el pH a 6.8.

iii) Acido succínico, 100 g para 1 litro de agua destilada, y se ajusta el pH a 6.8.

- iv) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 g para 1 litro de agua destilada.
- v) NaCl, 50 g para 1 litro de agua destilada.
- vi) Acido L-glutámico, 25 g para 250 ml de agua destilada.
- vii) Acido L-aspártico, 5 g para 250 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.8.

Finalmente el medio líquido contiene, por cada 12.5 litros, las siguientes cantidades de las soluciones mencionadas:

Base Concentrada.....	250 ml.
KH_2PO_4	250 ml.
Acido succínico.....	250 ml.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	62.5 ml.
NaCl.....	125 ml.
Acido L-glutámico.....	25 ml.
Acido L-aspártico.....	25 ml.
Peptona de gelatina.....	12.5 ml.
Acido nicotínico.....	12.5 mg.
Tiamina.....	6.25 mg.
Biotina.....	0.125 mg.

El medio se ajustó a un pH de 6.8 y se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos. Cuando el medio está caliente, se forma un precipitado que se disuelve a temperatura ambiente. El medio es translúcido y de un color amarillo claro.

Siembra de bacterias.

Las bacterias se sembraron en placa con inóculos diluidos, con el fin de obtener colonias separadas de las cuales se tomó una

muestra de inóculo para sembrarlas por punción en frascos con medio líquido. Las bacterias se incubaron durante 12 horas en la obscuridad, para que el crecimiento respiratorio de las bacterias consumiera el oxígeno molecular presente. Posteriormente las bacterias fueron expuestas a focos con filamentos de tungsteno de 40 watts colocados a 30 cm de distancia de los frascos y a una temperatura de 30°C.

Una vez formado el cultivo bajo condiciones fotosintéticas, éste puede conservarse viable para resiembras durante varios meses. La producción de grandes cantidades de bacteria se lleva a cabo en cultivos líquidos de la siguiente forma: se le agrega medio líquido a los frascos que contienen el medio sólido y se agitan para desprender las colonias; los frascos se guardan nuevamente en obscuridad durante 7 horas, y posteriormente se exponen a la luz a 30°C. Después de siete días, se obtiene el cultivo fotosintético, el cual es vaciado en matraces de 100 ml con medio líquido, agregando la cantidad suficiente para no mojar el tapón de hule estéril, pero dejando la menor cantidad de aire posible. Luego se repite trasladando el cultivo a un frasco de 1 litro y posteriormente a uno de 9 litros.

Cosecha de bacterias.

Se procedió a cosechar el cultivo a los siete días aproximadamente, cuando éste alcanzó la fase logarítmica tardía. La curva de crecimiento se obtuvo con un fotocolorímetro Klett-Summerson con filtro rojo.

La cosecha se realizó por centrifugaciones sucesivas del medio de cultivo a $8000 \times g$ durante 15 minutos, obteniéndose las pastillas de bacterias, las cuales fueron lavadas dos veces en un amortiguador de MOPS 50 mM y KCl 10 mM pH 7.5, y se centrifugaron a $8000 \times g$ durante 15 minutos eliminando así los residuos del medio. Las pastillas son pesadas y registradas como peso húmedo y guardadas en un ultracongelador Revco a -70°C .

Extracto libre de cromatóforos.

Las bacterias se resuspendieron en un amortiguador de Tris-HCl 25 mM pH 7.5 en relación 1:10 (peso : volumen), luego se homogeneizaron y se les agregó MgSO_4 y ADNasa en proporción de 1 mg por cada 100 g de peso húmedo de bacterias. Se sonicaron en volúmenes de 15 ml durante 2 minutos en un sonicador tipo M.S.E. a la máxima potencia y en un baño de hielo a 0°C (Scholes y col, 1969). La solución se centrifugó a $20000 \times g$ durante 20 minutos, para eliminar las células sin romper, cápsulas, etc, que quedan en el precipitado.

Finalmente, se toma el sobrenadante y se centrifuga a $100000 \times g$ durante 80 minutos, obteniéndose el sobrenadante o extracto crudo libre de cromatóforos del cual se purificó la enzima. El extracto fue donado por el Dr. Heliodoro Celis del Instituto de Fisiología Celular.

Reactivos

Todos los reactivos, esto es, NADPH, GSSG, CoASSG, etc.; las proteínas usadas como estándar de peso molecular, el DEAE Sephacel y la adenosina 2',5'- bifosfato - Sepharosa 4B, fueron obtenidos de la Compañía de Productos Químicos Sigma (St. Luis, MO). Los anfolitos fueron obtenidos de Pharmacia-LKB Biotecnology, Suecia.

Ensayo de la actividad enzimática de la glutatión reductasa.

La actividad enzimática de la glutatión reductasa se determinó siguiendo la desaparición de la absorbancia del NADPH a 340 nm y a temperatura ambiente, usando un espectrofotómetro Beckman modelo DU SERIES 70. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 500 μ l, 1.0 μ g de enzima, 200 μ M de NADPH y 1.0 mM de GSSG en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.5 A 25°C) conteniendo 1 mM de EDTA. Se registró por espacio de 1 minuto la desaparición en absorbancia a 340 nm en ausencia de glutatión oxidado (GSSG) y se dió inicio a la reacción agregando cantidades variables de éste último. La unidad de actividad enzimática se define, como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mola de NADPH por minuto a pH 7.5 y 25°C.

Las actividades específicas se expresaron como unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína.

También se determinó la actividad de CoASSG reductasa en las mismas condiciones mencionadas arriba, usando como sustrato diferentes concentraciones de CoASSG.

Todos los datos de velocidades iniciales se ajustaron a la

ecuación de Michaelis-Menten usando el programa de computación ENZFIT y se graficaron en forma de dobles-recíprocos para confirmar si las gráficas eran lineales. Los valores de las pendientes y de las intersecciones en la ordenada de los gráficos secundarios se obtuvieron por regresión lineal. Los parámetros cinéticos se estimaron de los datos experimentales, según las ecuaciones correspondientes al mecanismo PING PONG, y se expresan de acuerdo a la notación y nomenclatura de Cleland (63).

Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína se estimó por la técnica de Bradford (64), usando como referencia la glutatión reductasa de *Spirulina maxima* (33). Se determinó la concentración de la proteína pura (95%) usando el coeficiente de extinción molar ($E^{1\%}$) de 9.47 a 271 nm y pH 7.5, reportado para la glutatión reductasa de *Spirulina maxima* (33).

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La proteína purificada se sometió a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en geles de 80 x 80 x 2.7 mm, con un gradiente de poro lineal, obtenido al variar la concentración de acrilamida (desde 4 a 30 %) y con un entrecruzamiento constante del 4 % (65). Las electroforesis se llevaron a cabo a 5°C, ya sea en un amortiguador que contenía 90 mM de Tris, 80 mM de ácido bórico y 2.5 mM de EDTA (pH 8.35), o bien en un amortiguador de fosfato de sodio 100 mM conteniendo 1 mM de EDTA (pH 7.0). Las

electroforesis se corrieron a un voltaje constante de 125 voltios durante toda la noche (aproximadamente de 14 a 16 horas). Simultáneamente se corrieron proteínas de referencia con pesos moleculares desde 29000 a 240000 Da.

Las electroforesis de la proteína en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS) fueron realizadas de acuerdo a Weber y Osborn (66) en geles cilíndricos de 5 mm de diámetro y 8 cm de longitud (T = 8 %, C = 2.6 %). Las electroforesis se llevaron a cabo a corriente constante de 8 mA durante 6 horas en amortiguador de fosfato 50 mM conteniendo 0.1 % de SDS (pH 7.0 a 25°C). También se llevaron a cabo electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método discontinuo de Laemmli (67) en geles planos de 180 × 140 × 0.7 mm (T = 11.4 %, C = 2.6 %) preparados en amortiguador de Tris 50 mM, 384 mM de glicina conteniendo 0.1% de SDS (pH 8.3). Las electroforesis se corrieron a voltaje constante de 120 voltios hasta que el frente del colorante estuviera de 1 a 2 cm arriba del fondo del gel. Simultáneamente se corrieron proteínas de referencia con pesos moleculares desde 17000 a 68000 Da. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 y destañados por difusión.

Isoelectroenfoque.

Se realizaron isoelectroenfoces analítico y preparativo de la GR. El isoelectroenfoque analítico se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 125 × 125 × 2 mm (T = 6 %, C = 4 %), usando un

aparato LKB de electroforesis horizontal modelo Multiphor 2117 . Las electroforesis se corrieron a potencia constante de 30 watts durante 3 horas a 4°C. Se usaron anfolitos desde pH 3.0 a pH 10 y de pH 4 a pH 6 diluïdos 1:15 en agua destilada. Simultáneamente se corrieron proteínas de punto isoeléctrico conocido; el gradiente de pH se determinó cortando el gel en fragmentos de 0.5 cm y colocándolos en 500 µl de agua destilada en contacto con un electrodo para pH.

El electroenfoque preparativo se llevó a cabo en gel de Sephadex IEF de 260 × 125 × 2 mm, usando el Multiphor 2117 de LKB. Las electroforesis se corrieron a potencia constante de 30 watts durante 5 horas a 4°C, usando anfolitos desde pH 3.0 a pH 10.0 diluïdos 1:15. El gradiente de pH se determinó al colocar en contacto el electrodo de pH, con las 30 fracciones obtenidas al aplicar sobre el gel una rejilla de fraccionamiento. Posteriormente, la proteína fue removida del gel por elución agregando, a cada fracción, 2 ml de amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.5 a 25°C) conteniendo 1 mM de EDTA, seguido por actividad en las condiciones ya descritas (ver ensayo de la actividad enzimática).

Estimación del peso y del radio molecular de la proteína nativa por filtración molecular.

El comportamiento cromatográfico de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* nativa se estudió en una columna de Sephadex G - 150 (1.6 × 70 cm), equilibrada con amortiguador de

fosfato de potasio 100 mM conteniendo 1 mM de EDTA (pH 7.5). Los perfiles de elución fueron obtenidos del registro continuo de la absorbancia del eluido a 280 nm. Se calcularon el radio de Stockes y el coeficiente de difusión por los procedimientos de Laurent y Killander (69) y Potschka (69), respectivamente, usando proteínas de referencia de constantes físicas conocidas.

El radio molecular de la glutatión reductasa se calculó usando la ecuación clásica (70):

$$r = \left[\frac{3M\nu}{4\pi N} \right]^{1/3}$$

donde:

- r = radio molecular,
- M = peso molecular,
- ν = volumen parcial específico,
- N = número de avogadro.

También se calculó la relación friccional a partir del radio de Stokes y del radio molecular usando la ecuación (71):

$$\frac{f}{f_0} = \frac{a}{\left[\frac{3M\nu}{4\pi N} \right]^{1/3}}$$

donde:

- a = radio de Stokes,
- M = peso molecular,
- ν = volumen parcial específico,
- N = número de avogadro,

f/f_0 = relación friccional.

Espectro de absorción.

El espectro de absorción de la glutatión reductasa (95% pura) se registró después de dializar exhaustivamente contra amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.5) conteniendo 1 mM de EDTA. Se usó una cantidad de proteína de 1.25 mg y se registró la absorbancia desde los 220 nm hasta los 500 nm, usando un espectrofotómetro Beckman modelo DW SERIES 2000.

Determinación de grupos SH libres.

El número de grupos tiol libres de la GR se determinó con el reactivo de Ellman (DTNB) en un espectrofotómetro AMINCO DW 2a UV-VIS. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 500 μ l, 2 mM de DTNB y 3.2 μ M de proteína en Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) conteniendo 1 mM de EDTA. La determinación del número total de SH libres se llevó a cabo adicionando SDS al 0.08% (p/v). La producción del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, que es igual a la cantidad de tioles libres, se siguió midiendo el aumento de la absorbancia a 412 nm y su concentración se calculó usando el coeficiente de extinción molar de 14.14 (72).

Estudios de ultracentrifugación.

Todos los experimentos de sedimentación en gradiente de densidad se llevaron a cabo a 45000 r.p.m. (290000 \times g) en una ultracentrifuga Beckman modelo LK-65 (rotor SW 50.1) durante 13

horas a 4°C.

El peso molecular, al igual que el coeficiente de sedimentación, se determinaron por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa (5 a 20%), preparados en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.0 conteniendo 1 mM de EDTA. Simultáneamente se corrieron varias proteínas de referencia. Luego se procedió a analizar el contenido de los tubos de nitrocelulosa, por punción del fondo de éstos y colectando fracciones de 80 µl aproximadamente.

El peso molecular se cálculo de acuerdo al gráfico de Rendón et al (73) y el coeficiente de sedimentación de acuerdo a Martin and Ames (74).

Estudios del efecto de la urea e hidrocloreuro de guanidina.

La actividad enzimática de la proteína se ensayó cubriendo un intervalo amplio de concentración de urea (0 M a 6.0 M) o hidrocloreuro de guanidina. La solución de urea 8 M se preparó en un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 conteniendo 1 mM de EDTA. Análogamente, se preparó una solución de hidrocloreuro de guanidina 3 M. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 500 µl, 4 µg de proteína, 200 µM de NADPH en fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 conteniendo 1 mM de EDTA, y ésta se incubó en presencia de las diferentes concentraciones de urea o hidrocloreuro de guanidina. La desaparición de la absorbancia a 340 nm se registró durante 1 minuto a 25°C en ausencia de GSSG y se dió inicio a la reacción agregando 1 mM final de glutatión

oxidado.

También se llevaron a cabo estudios de ultracentrifugación en presencia de urea 1.5 M y 3.0 M.

Composición de aminoácidos.

La composición de aminoácidos se realizó en la Unidad de Química de Proteínas de la Universidad de Yale, usando un analizador de aminoácidos 7300 modelo Beckman con una columna de intercambio catiónico.

La preparación previa de la muestra se realizó de la siguiente forma: 1) se precipitó a la proteína (500 µg) en ácido tricloroacético al 5% (p/v), 2) se resuspendió en urea 8 M y NH_4HCO_3 0.2 M (pH 8.0), 3) se le adicionó ditiotretitol (DTT) 5 mM y se incubó durante 1 hora a 30°C, 4) luego se le agregó iodoacetamida 10 mM y nuevamente fue incubada en la obscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente y 5) se dializó 3 veces (cada una durante 16 horas) contra agua. La hidrólisis de la proteína se realizó a 150°C durante 2, 4 y 6 horas.

El contenido de triptofanos fue determinado espectrofotométricamente después de disolver la proteína en cloruro de guanidina 6 M de acuerdo al método de Harold Edelhoch (75). Las treoninas y serinas fueron estimadas por extrapolación a tiempo cero.

Estudios de pH.

Se analizó la velocidad máxima aparente (V_{maxapp}) como función del pH (a 25°C), abarcando un intervalo de pH desde 6.0 a 9.0. Los amortiguadores usados, a una concentración final de 100 mM y conteniendo 1 mM de EDTA, fueron los siguientes: Mes (pH 6.0 - 6.5), imidazol (pH 6.5 - 7.0), fosfato (pH 7.0 - 7.2 - 7.4 - 7.5 - 7.6 - 7.8 y 8.0), Tris (pH 7.5 - 8.0 y 8.5) y Bis-Tris (8.5 - 9.0).

A cada concentración de ión hidrógeno se realizó una cinética de saturación, variando la concentración de GSSG entre 10 y 1000 μ M a una concentración saturante de NADPH (200 μ M). Análogamente, se llevó a cabo una cinética de saturación variando la concentración de NADPH entre 4 y 200 μ M a una concentración saturante de GSSG (1mM). Los parámetros cinéticos V_{maxapp} y V_{maxapp}/K_{mapp} fueron determinados para GSSG y NADPH, y sus respectivos logaritmos se graficaron contra su correspondiente pH.

Estudios de velocidad inicial.

El estudio de los patrones de velocidad inicial con la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum*, se llevó a cabo en fosfato de potasio 100 mM conteniendo 1 mM de EDTA (pH 7.5) a temperatura ambiente (25°C). Se cubrió un intervalo de concentraciones de GSSG (20 a 1000 μ M) manteniendo concentraciones fijas de NADPH (8 a 200 μ M). Análogamente, y usando las mismas concentraciones, se cubrió un amplio intervalo de concentraciones de NADPH manteniendo concentraciones fijas de GSSG. Además, se

modificó el orden en el cual se adicionaron los sustratos, con el propósito de observar el efecto en las velocidades iniciales.

PURIFICACION DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *Rhodospirillum*
rubrum

Preparación del extracto crudo libre de cromatóforos.

La preparación del extracto crudo libre de cromatóforos se encuentra explicado detalladamente al inicio de la sección de Materiales y Métodos.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, excepto el fraccionamiento salino, las diálisis y las centrifugaciones, las cuales se realizaron a 4°C.

Fraccionamiento salino en sulfato de amonio.

Se determinó en qué porcentaje de saturación de sulfato de amonio precipitó la proteína. Se fraccionó de 0 a 10, de 10 a 20, de 20 a 30, y así sucesivamente de 10 en 10 hasta alcanzar un 90% de saturación. Cada una de las diferentes fracciones se recuperaron por centrifugación en una centrifuga Sorvall (Rotor GSA) a $13180 \times g$ durante 20 minutos. Los respectivos precipitados se resuspendieron en un volumen de 3 ml de amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 conteniendo 1 mM de EDTA y se dializaron contra un volumen total de 1 litro (con tres cambios de 250 ml cada 8 horas) de amortiguador arriba mencionado. Finalmente a cada una de las diferentes fracciones se le determinó su actividad

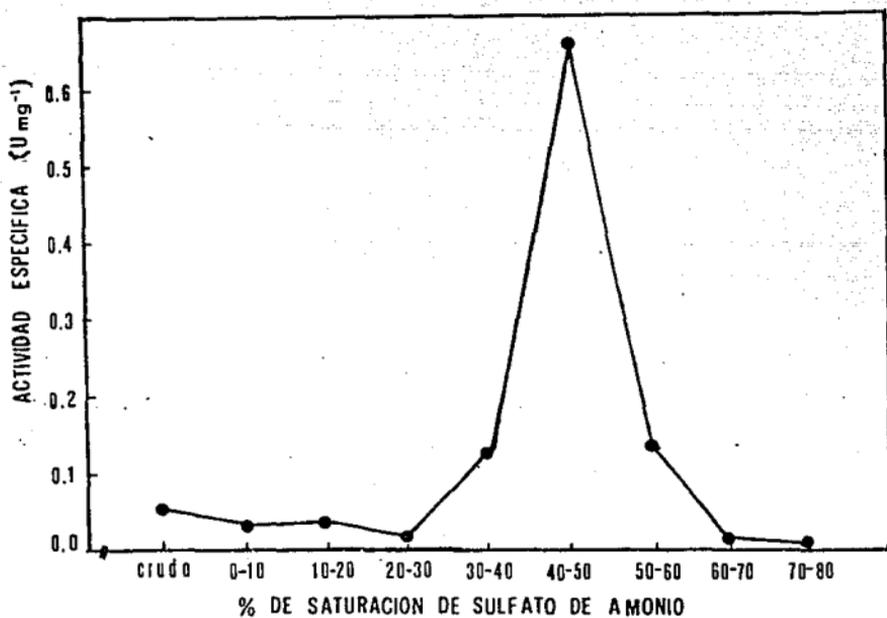


FIGURA 1.
 FRACCIONAMIENTO SALINO EN SULFATO DE AMONIO DE LA GLUTATION
 REDUCTASA DE *R. rubrum* A PARTIR DE UN EXTRACTO LIBRE DE
 CROMATOFOROS. (●) ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg) DETERMINADA COMO
 SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS.

específica (figura 1).

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE - Sephacel.

Las fracciones con mayor actividad específica obtenidas del fraccionamiento salino con sulfato de amonio, - esto es, desde 30% a 60% de saturación -, se mezclaron y dializaron contra un volumen total de 2 litros de amortiguador de imidazol 25 mM (pH 6.0) conteniendo 1 mM de EDTA (con 3 cambios de 500 ml cada 8 horas). Esta fracción dializada se aplicó a una columna de DEAE - Sephacel (2.6 × 10 cm), previamente equilibrada con el mismo amortiguador de imidazol a un flujo de 53 ml × hora⁻¹ (10 cm × hora⁻¹). La columna fue lavada con la misma solución de imidazol (15 volúmenes de columna aproximadamente), hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor que 0.01. La elución de la enzima se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.5 M) preparado en el amortiguador de imidazol, y en un volumen total de 200 ml. La glutatión reductasa eluyó a una concentración de 0.25 M de NaCl; se juntaron las fracciones de aproximadamente 6 ml que contenían la mayor actividad de glutatión reductasa y se dializaron contra un volumen total de 2 litros (con tres cambios de 500 ml cada 8 horas), de amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.5) conteniendo 1 mM de EDTA (figura 2).

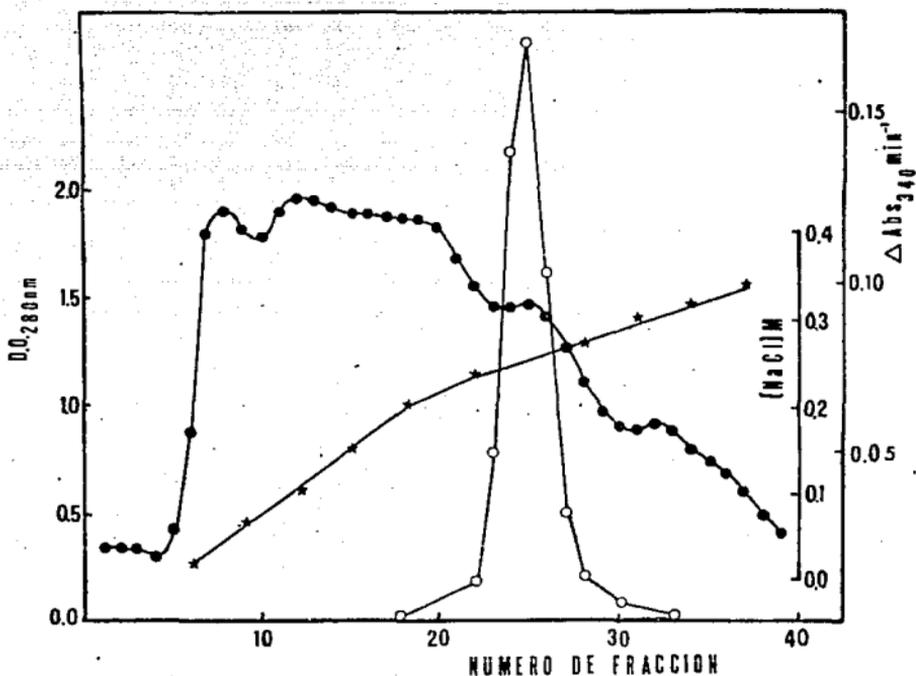


FIGURA 2.
 -PERFIL DE ELUCION DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* A PARTIR DE UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO EN UN VOLUMEN TOTAL DE 62 ml A LA COLUMNA DE INTERCAMBIO IONICO PREVIAMENTE EQUILIBRADA COMO SE EXPLICA EN MATERIALES Y METODOS. SIMBOLOS: (●) DENSIDAD OPTICA A 280 nm; (○) ACTIVIDAD DE LA ENZIMA; (★) GRADIENTE DE CONCENTRACION DE NaCl (0-0.5 N).

Cromatografía de Afinidad en 2',5',ADP - Sefarosa 4B.

La fracción dializada se aplicó a una columna de 2',5',ADP - Sepharosa - 4B (1.6 × 1.5 cm), la cual fue previamente equilibrada con el mismo amortiguador de fosfato a un flujo de 8 ml × hora⁻¹ (4 cm × hora⁻¹). La columna fue lavada con la misma solución de fosfato (15 volúmenes de columna aproximadamente), hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0.01. La enzima se eluyó al aplicar un gradiente lineal de NADPH (0 a 50 μM), preparado en el mismo amortiguador de fosfato y en un volumen total de 20 ml. Bajo estas condiciones, la glutatión reductasa eluyó a una concentración de 38 μM de NADPH aproximadamente; se colectaron fracciones de 900 μl y se mezclaron aquellas fracciones que contenían la mayor actividad enzimática (ver figura 3). Posteriormente, la fracción resultante se dializó exhaustivamente contra el amortiguador de fosfato durante 24 horas, la cual se concentró por inmersión del tubo de diálisis en una solución de glicerol al 70%.

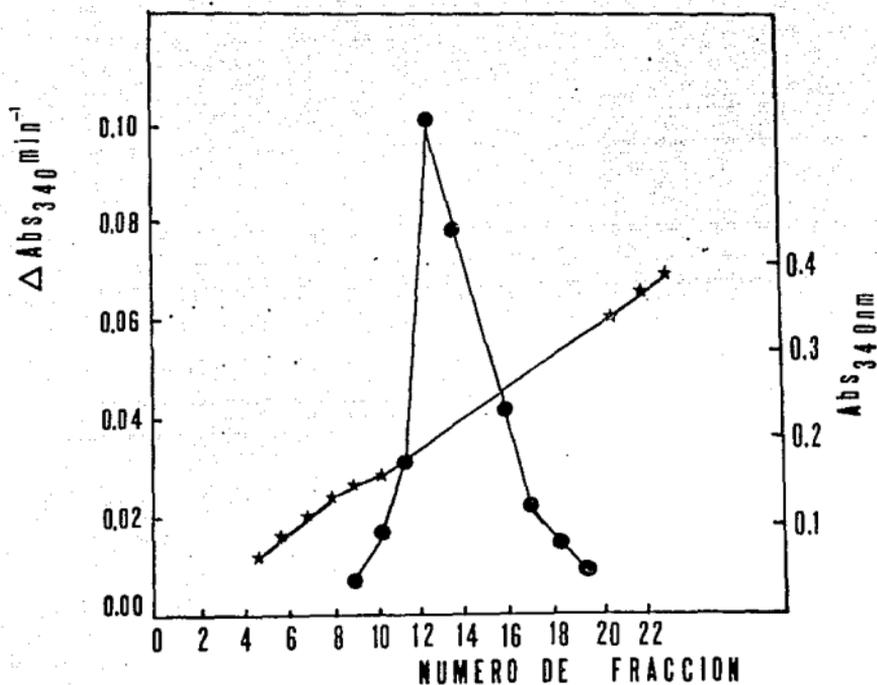


FIGURA 3.
 PERFIL DE ELUCION DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* A PARTIR DE UNA COLUMNA DE AFINIDAD EN 2',5',ADP-SEPHAROSA 4B. LA PROTEINA (198 UNIDADES EN UN VOLUMEN FINAL DE 40 ml) FUE APLICADA A LA COLUMNA DE AFINIDAD PREVIAMENTE EQUILIBRADA COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. SIMBOLOS: (●) ACTIVIDAD DE GSSG-REDUCTASA; (★) GRADIENTE DE CONCENTRACION DE NADPH (0-50 μM).

RESULTADOS.

Purificación de la glutatión reductasa.

Durante la purificación de la enzima, la actividad específica de la proteína aumentó de 0.08 a 102 U \times mg⁻¹ con una recuperación del 69% y un factor de purificación de 1159 veces.

La tabla II resume los resultados del proceso de purificación.

Criterio de pureza.

Con el propósito de evaluar el grado de pureza de la proteína se tomaron en cuenta los siguientes criterios: 1) cromatografía de la proteína en condiciones nativa y desnaturalizante, y 2) isoelectroenfoque.

La densitometría de los geles obtenidos por los procedimientos cromatográficos, - en condiciones nativa y desnaturalizante -, mostraron 2 bandas, la mayor corresponde a la GR revelando una pureza de un 95% (figuras 4a y 4b).

El isoelectroenfoque de la proteína nativa a diferentes intervalos de pH, 3 a 10 y 4 a 6, dió solamente una banda de actividad con un máximo a pH de 5.2.

Estabilidad.

La enzima obtenida a concentraciones de hasta 1 mg \times ml⁻¹, fue estable hasta por 1 año y conservó el 100% de la actividad enzimática cuando se almacenó a -20°C en presencia de glicerol al

70%.

Especificidad de sustrato.

Con el objeto de observar cómo es afectada la actividad enzimática de la enzima por sus sustratos, se llevaron a cabo determinaciones de la actividad enzimática en presencia de GSSG, CoASSG y NADPH. Bajo las condiciones experimentales abajo mencionadas, las cinéticas fueron hiperbólicas con respecto a NADPH, GSSG y CoASSG.

A concentración fija y saturante de NADPH (18 veces la K_m), la enzima exhibió una K_m aparente para el glutati6n oxidado de $60.4 \pm 8 \mu M$ (figuras 5a y 5b). Bajo las mismas condiciones experimentales, la K_m aparente calculada para el CoASSG fue de 3.2 mM (figuras 6a y 6b). Las velocidades máximas calculadas para GSSG y CoASSG, fueron de 102 y 5.07 unidades, respectivamente, con una relación de V_{max} aparente de 20.1.

La K_m aparente para el NADPH, a una concentración fija y saturante de GSSG (17 veces la K_m), fue de $10.8 \pm 3 \mu M$ (figuras 7a y 7b) obteniéndose una velocidad máxima similar a la calculada para el GSSG. Al igual que para el NADPH, la enzima mostró un pico de máxima actividad a pH 7.5 para NADH, la cual fue 42 veces menor a la calculada para NADPH.

Determinación del peso molecular.

La glutati6n reductasa de *Rhodospirillum rubrum* presentó un peso molecular de $54400 \pm (1100)$ y de $110000 \pm (18230)$ en

condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, respectivamente (figuras 8 y 9).

La cromatografía de filtración en gel de la proteína dió un peso molecular de $122500 \pm (11000)$ similar al observado por electroforesis no desnaturalizante (figura 10a). El radio de Stokes y el coeficiente de difusión calculados fueron de 4.2 ± 0.15 nm y $51.2 \pm 2.7 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (figuras 10b y 11, respectivamente). A partir de un peso molecular de 110000 Da, se calculó una relación friccional de 1.33.

Por estudios de ultracentrifugación, se obtuvo un peso molecular de $92000 \pm (7500)$ Da de acuerdo al gráfico de Rendón et al (73) y un coeficiente de sedimentación de $5.71 \pm (0.25)$ S según el método de Martin y Ames (74). (figuras 12a y 12b).

Propiedades espectrales y contenido de FAD.

El espectro de absorción de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* 95% pura, en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM (pH 7.5) conteniendo 1 mM de EDTA y libre de nucleótidos contaminantes, exhibió tres picos de absorción con máximos a 273.5, 364,5 y 458 nm (figura 13). Las relaciones de absorbancia A_{280}/A_{458} y A_{364}/A_{458} fueron de 7.61 y 0.957, respectivamente.

Basado en el coeficiente de extinción molar de la glutatión reductasa de *Spirulina maxima* reportado por Rendón et al (33) y considerando el coeficiente de absortividad molar de 460 nm reportado para FAD unido a proteína (35), se calculó una relación

TABLA II

PURIFICACION DE LA GLUTATION REDUCTASA DE Rhodospirillum rubrum.

PROCEDIMIENTO	VOLUMEN (ml)	Unidades Totales (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Especifica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
EXTRACTO CRUDO	1169	235	2683	0.068	100	1
FRACCION SULFATO DE AMONIO 30-60%	62	233	568	0.410	99.2	4.7
INTERCAMBIO IONICO EN DEAE-5	40	198	209	0.950	84.3	10.8
AFINIDAD EN 2'.5'. ADP-SEPHAROSA 4B	1.82	162.4	1.6	102	68.9	1159

A

B

FIGURA 4.
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA PROTEINA
PURA. A) CONDICIONES DESNATURALIZANTES. SE APLICARON 10 μ g DE
PROTEINA. B) CONDICIONES NATIVAS. SE APLICARON 25 μ g DE
LAS ELECTROFORESIS SE LLEVARON A CABO EN LAS CONDICIONES
DESCRITAS EN MATERIALES y METODOS.

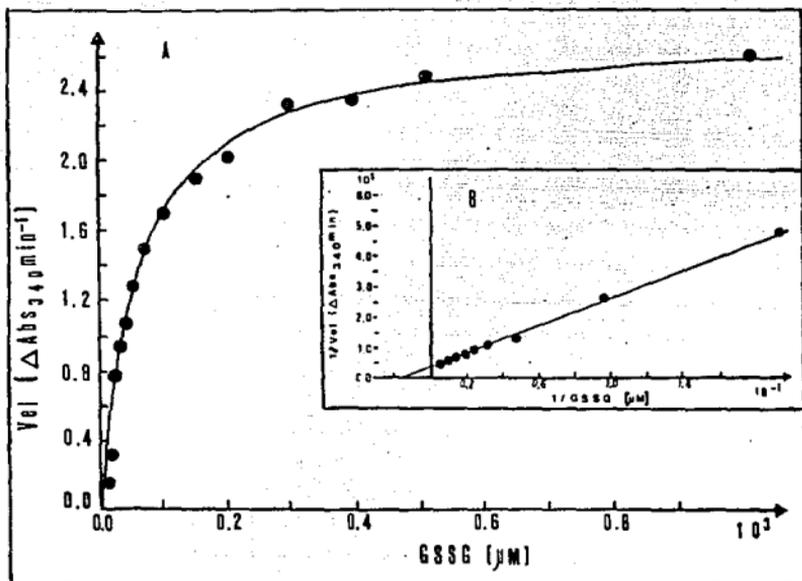


FIGURA 5.
 A) ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* SOBRE EL GSSG. LA MEZCLA DE REACCION CONTENIA 0.074 μg DE PROTEINA. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. B) GRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LOS DATOS.

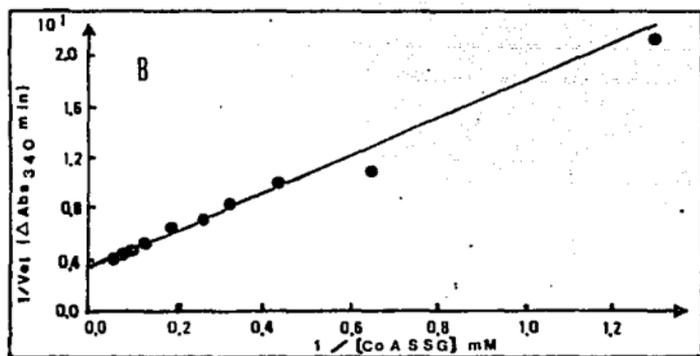
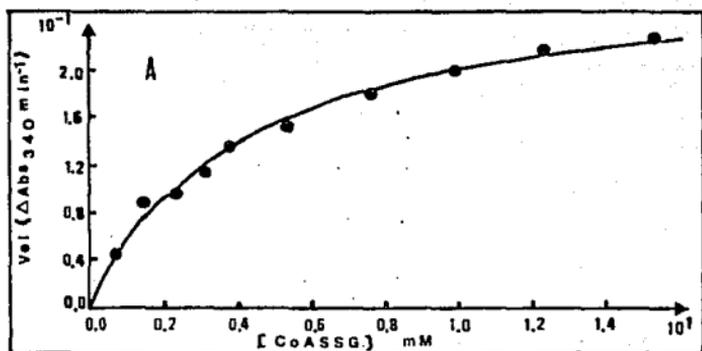


FIGURA 6.

A) ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* SOBRE EL DISULFURO MIXTO CoASSG. LA MEZCLA DE REACCION CONTENIA 0.074 μg DE ENZIMA. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. B) GRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LOS DATOS.

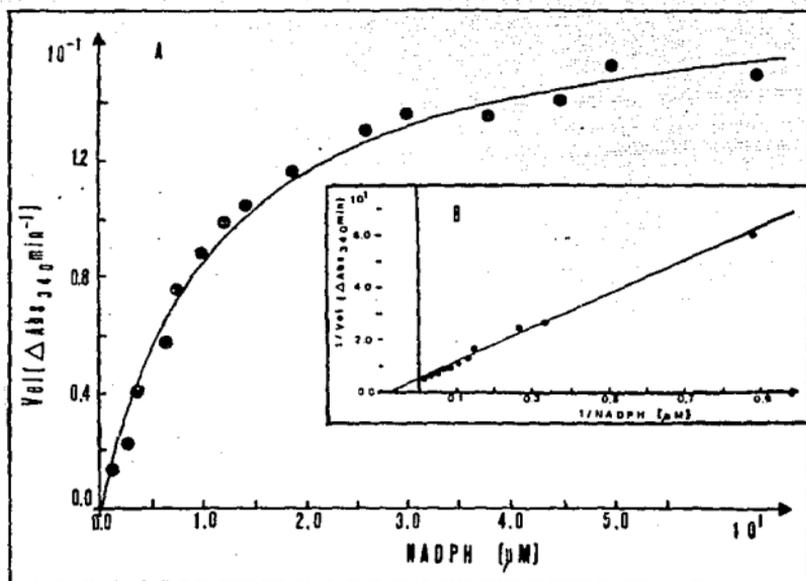


FIGURA 7.

A) ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* SOBRE EL NADPH. LA MEZCLA DE REACCION CONTENIA 0.074 μg DE ENZIMA. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ESTA DETALLADO EN MATERIALES Y METODOS.

B) GRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LOS DATOS.

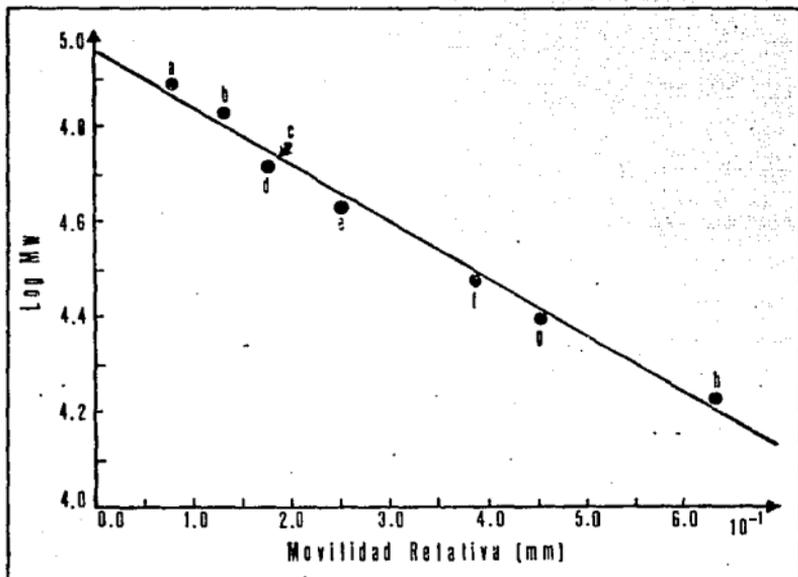


FIGURA 8.
 DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA SUBUNIDAD DE LA
 GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* POR ELECTROFESIS EN SDS. SE
 APLICARON 5.6 µg DE PROTEINA A LA ELECTROFESIS. EL PROCEDIMIENTO
 EXPERIMENTAL ESTA DESCRITO EN MATERIALES Y METODOS. LAS PROTEINAS
 DE CALIBRACION FUERON: a) TRANSFERRINA (78000); b) BSA (68000); d)
 IgG, CADENA PESADA (50000); e) OVALBUMINA (45000); f) AMILASA
 CARBONICA (30000); g) IgG, CADENA LIGERA (25000) y h) MIOGLOBINA
 (17000). LA FLECHA INDICA LA MOVILIDAD RELATIVA DE LA GR DE
R. rubrum.

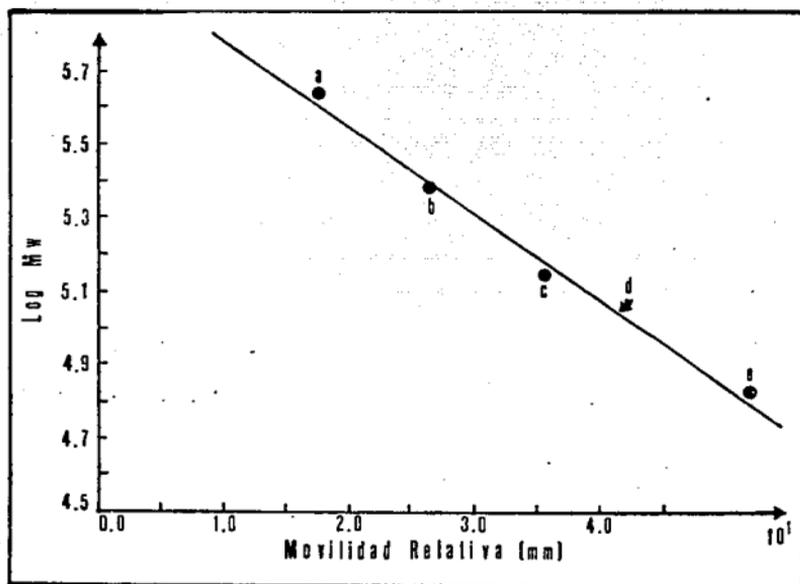


FIGURA 9.
 CALCULO DEL PESO MOLECULAR NATIVO DE LA GLUTATION REDUCTASA
 DE *R. rubrum* MEDIANTE ELECTROFRESIS EN GRADIENTE DE PORO. SE
 APLICARON 5.6 μ g DE PROTEINA. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ESTA
 DESCRITO EN MATERIALES Y METODOS. LAS PROTEINAS DE CALIBRACION
 FUERON: a) FERRITINA (440000); b) CATALASA (240000); c) BSA,
 DIMERO (136000) Y a) BSA, MONOMERO (66000). LA FLECHA INDICA LA
 MOVILIDAD RELATIVA DE LA GR DE *R. rubrum*.

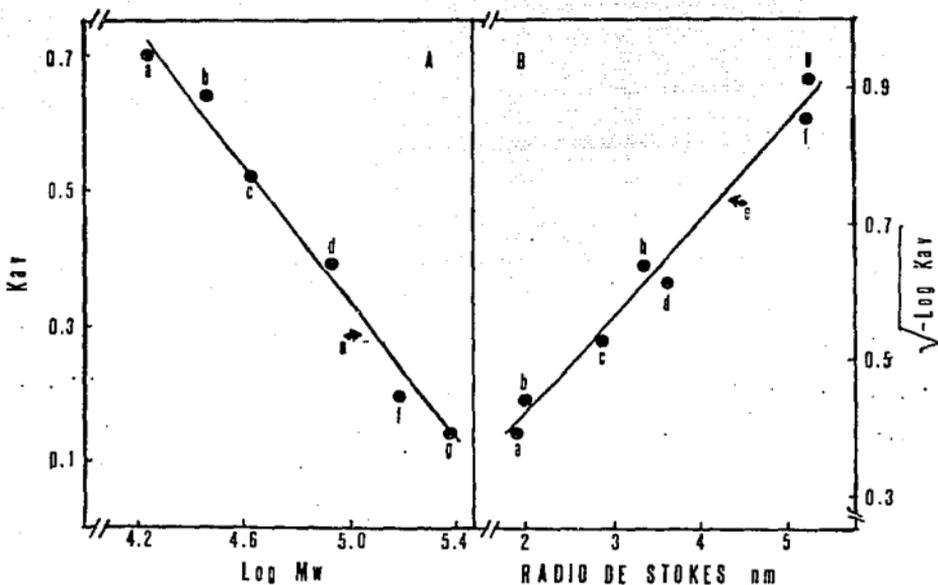


FIGURA 10.
 COMPORTAMIENTO CROMATOGRAFICO DE LA GLUTATION REDUCTASA DE R.
rubrum POR FILTRACION MOLECULAR EN SEPHADEX G-150. A) DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR; B) CALCULO DEL RADIO DE STOKES. LAS PROTEINAS DE CALIBRACION FUERON: a) NIoglobINA (17000); b) AMHIDRASA CARBONICA (30000); c) OVALBUMINA (45000); d) FOSFATASA ALCALINA (86000); f) IgG (150000); g) CATALASA (260000) y h) TRANSFERRINA (78000). EN LAS GRAFICAS A Y B LA FLECHA INDICA LA GR.

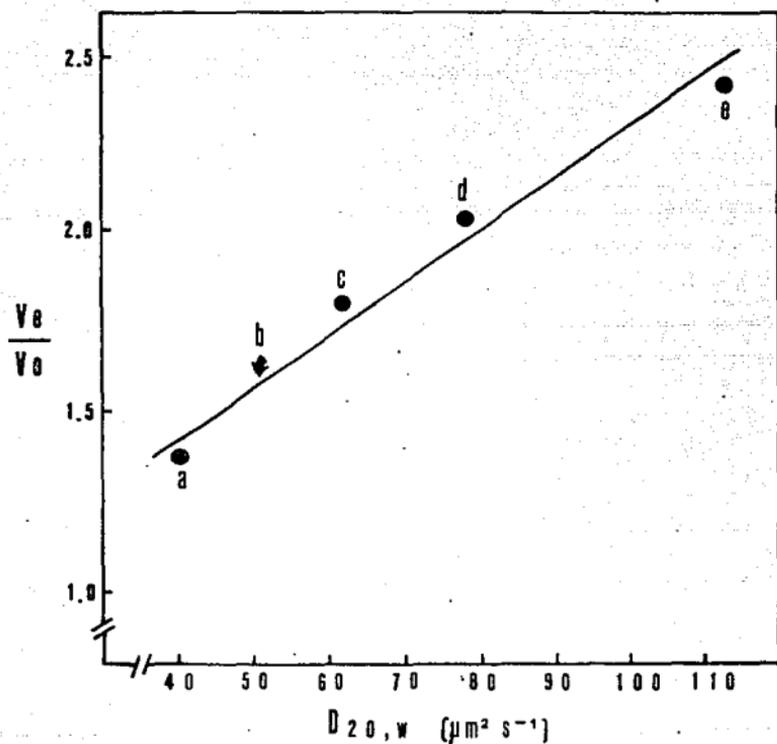


FIGURA 11.
 DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE DIFUSION DE LA GLUTATION
 REDUCTASA DE *R. rubrum* POR FILTRACION MOLECULAR EN SEPHADEX G-150.
 LAS PROTEINAS DE CALIBRACION FUERON: A) IgG (150000); C) FOSFATASA
 ALCALINA (86000); D) OVALBUMINA (45000) Y E) NIoglobINA (17000).
 LA FLECHA INDICA LA GR.

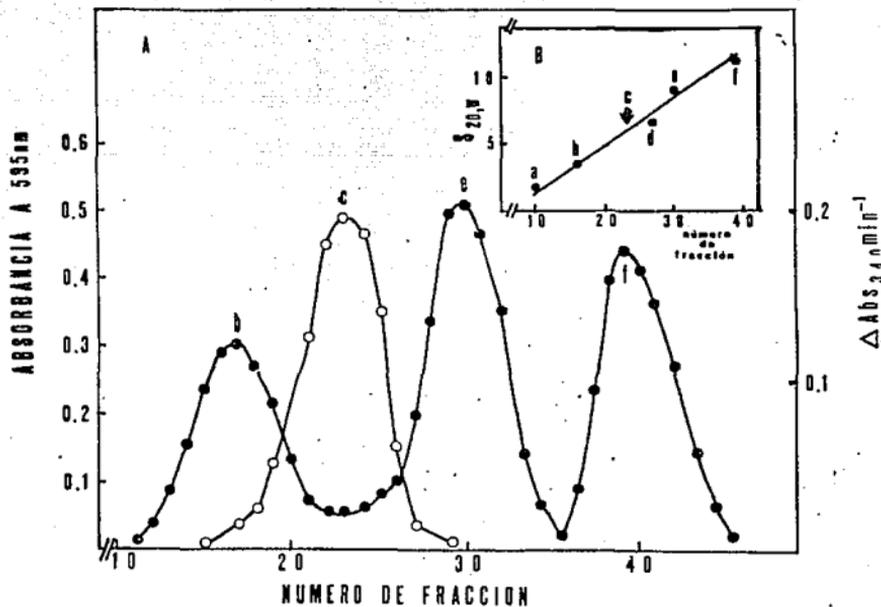


FIGURA 12. COMPORTAMIENTO DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum* EN SEDIMENTACION POR GRADIENTE DE DENSIDAD. EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL ESTA DESCRITO EN MATERIALES Y METODOS. A) DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR; B) CALCULO DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION. LAS PROTEINAS DE CALIBRACION FUERON: A) HEMOGLOBINA (17000); B) OVALBUMINA (45000); D) IgG (150000); E) GLUCOSAMINA ISOMERASA DE *E. coli* (190000) Y F) CATALASA (240000). EL PICO Y LA FLECHA (C) CORRESPONDE A LA GR EN LAS GRAFICAS A Y B, RESPECTIVAMENTE.

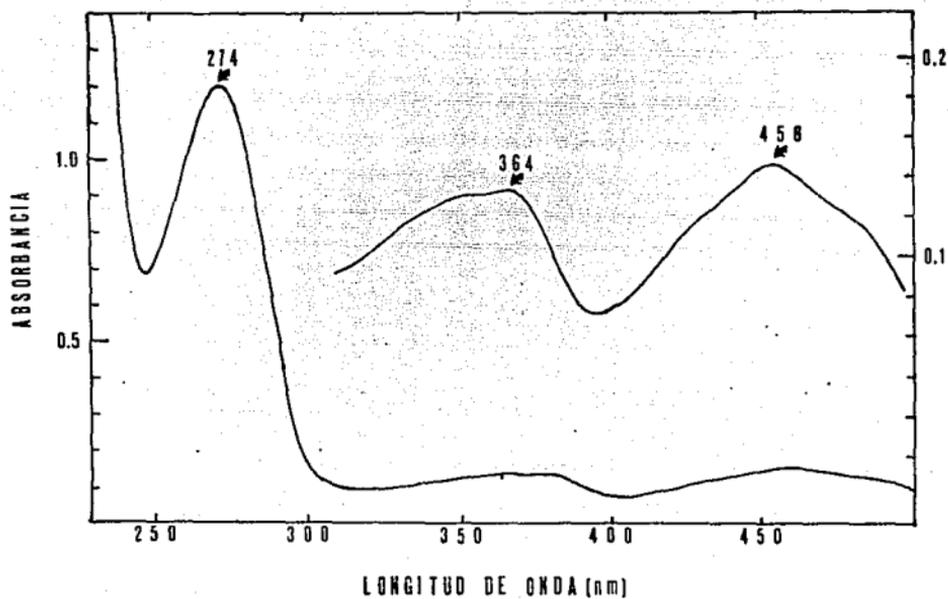


FIGURA 13.
 ESPECTRO DE ABSORCION DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*
 PURA. SE REGISTRO ALREDEDOR DE 1.25 mg/ml DE PROTEINA COMO SE
 DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS.

de 0.65 mol de FAD por mol de subunidad.

Número de SH libres.

El número de grupos SH libres en la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* determinados con el reactivo de Ellman (72), en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes, fue de 0.9 y 1.989 de SH por mol de subunidad, respectivamente (figura 14).

Estudios del efecto de la urea.

La proteína exhibió una inhibición gradual de la actividad enzimática conforme se aumentó la concentración de urea (figura 15). La actividad enzimática de la proteína disminuyó aproximadamente a la mitad en presencia de urea 1.5 M y fue totalmente inactivada a una concentración de urea 3.0 M, mientras que con hidrocloreuro de guanidina la inactivación total se alcanzó a una concentración de aproximadamente 0.7 M.

Por la técnica de ultracentrifugación en presencia de urea 1.5 M, los perfiles de actividad (50% menor comparada con el control) y de proteína obtenidos, fueron muy similares a los perfiles de actividad y proteína de la enzima en ausencia de urea. Por otro lado, de la ultracentrifugación en presencia de urea 3.0 M, no se observó actividad enzimática y el perfil de proteína también fue muy similar al perfil obtenido para la enzima en ausencia de urea.

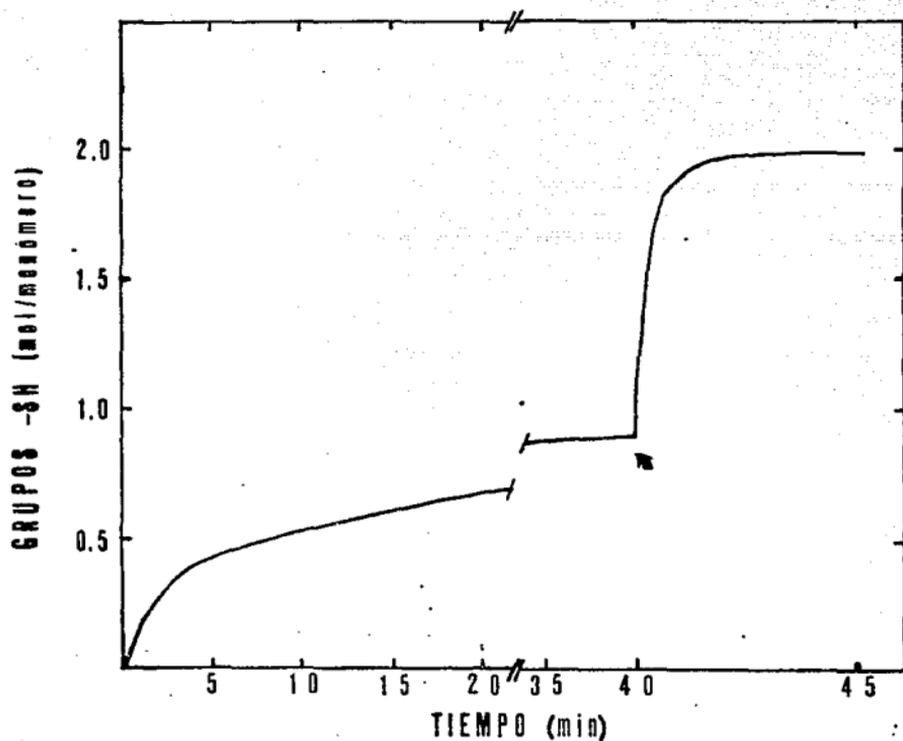


FIGURA 14.
 DETERMINACION DE LOS TIPOES LIBRES DE LA GLUTATION REDUCTASA
 DE *R. rubrum* EN CONDICIONES NATIVA Y DESNATURALIZANTE. LA FLECHA
 INDICA EL MOMENTO DE LA ADICION DEL SDS. EL PROCEDIMIENTO
 EXPERIMENTAL SE EXPLICA EN MATERIALES Y METODOS.

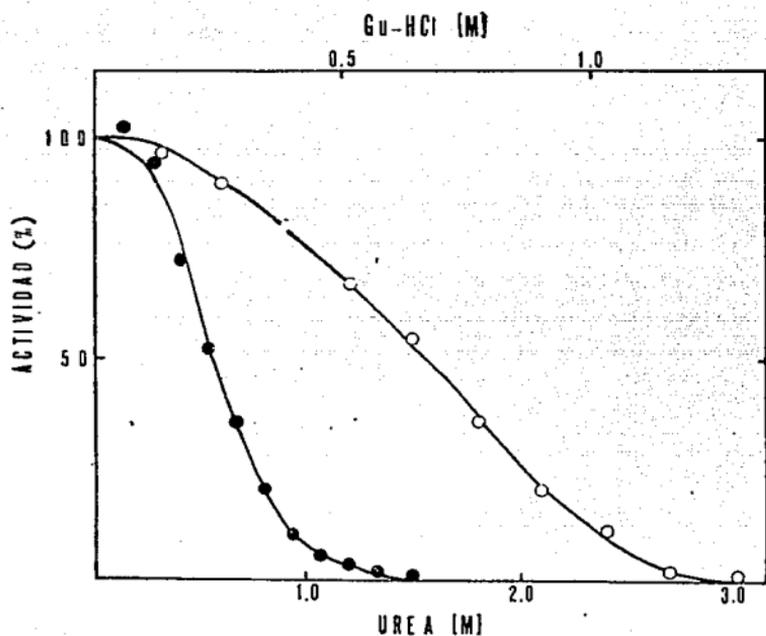


FIGURA 15.
EFECTO DE LA UREA (○) Y DEL HIDROCLORURO DE GUANIDINA (●) EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*. LA ACTIVIDAD ESTA EXPRESADA COMO EL PORCENTAJE DEL VALOR OBTENIDO EN AUSENCIA DE LOS DESNATURALIZANTES. EL DETALLE EXPERIMENTAL EN MATERIALES Y METODOS.

Composición de aminoácidos.

A partir de la composición de aminoácidos, y de acuerdo al método de McMeekin y Marshall (76), se calculó un volumen parcial específico de $0.724 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. El contenido del número de triptofanos - determinado de acuerdo al método de Harold Edelhoeh (75) - fue de 5.

La composición de aminoácidos de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* se muestra en la tabla III. Para fines comparativos también se incluye la composición de aminoácidos de varias glutatión reductasas de diferente fuente.

La tabla IV resume las propiedades físicas y químicas de la glutatión reductasa pura de *Rhodospirillum rubrum*.

Estudios de pH.

La enzima exhibió un pico máximo de actividad a pH 7.5 para GSSG y NADPH, siendo muy similar tanto en Tris como en fosfato (figuras 16a y 17a). A valores de pH 6.0 y 6.5 la enzima mostró inhibición por sustrato, tanto con GSSG como con NADPH (figura 18). Además, en ambos casos la enzima presentó un comportamiento histerético simultáneo con la inhibición.

Las constantes de ionización para el complejo enzima-GSSG, calculadas al variar el GSSG, fueron 6.96 y 8.08 para el lado ácido y básico de la curva, respectivamente. El pH óptimo obtenido a partir de estos valores fue de 7.5. Por otro lado, las constantes de ionización para el complejo enzima-NADPH, calculadas al variar el NADPH, fueron 6.95 y 8.5 para el lado ácido y básico

TABLA III

Composición de aminoácidos de la glutatión reductasa de
E. rubrum y de otras fuentes.

Aminoácido mol de subunidad	<u>Anabaena</u> sp.	<u>S. maxima</u>	<u>E. coli</u>	<u>E. rubrum</u>	Eritrocito de cerdo	Eritrocito de humano	Hígado de ternera	Hígado de ratón
Aspártico	41	42	49	47	39	37	40	41
Glutámico	44	47	43	38	48	43	42	43
Serina	43	29	16	20	39	27	30	32
Histidina	8	11	12	7	16	15	14	14
Glicina	59	47	45	83	49	44	41	50
Treonina	39	31	30	32	30	28	31	35
Arginina	29	18	14	39	19	15	19	14
Alanina	33	44	47	59	39	40	35	41
Tirosina	9	7	16	10	12	12	14	11
Metionina	9	11	11	13	8	16	10	10
Valina	49	33	43	45	43	44	41	48
Fenilalanina	15	18	15	15	14	13	13	19
Isoleucina	31	28	34	31	28	28	32	24
Leucina	34	34	30	34	36	33	32	36
Lisina	19	24	26	17	33	33	32	32
Prolina	23	7	22	22	20	21	21	24
Triptofano	3	4	3	5	3	4	4	4
Cisteína	6	6	7	4	12	10	12	ND

TABLA IV

Constantes cinéticas y moleculares de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum*.

Picos máximos de absorción (nm)	274,365 y 458
A ₂₈₀ /A ₄₅₈	7.61
A ₃₆₄ /A ₄₅₈	0.957
Peso molecular nativo (Da)	110000
Peso molecular de la subunidad (Da)	54400
Número de subunidades	2
Radio de Stokes (nm)	4.2
Coefficiente de difusión (D _{20,w}) (μm ² s ⁻¹)	51
Coefficiente de sedimentación (S)	5.71
K _m para NADPH, pH 7.5 [μM]	11
K _m para GSSG, pH 7.5 [μM]	60
K _m para CoASSG, pH 7.5 [mM]	3.2
Número de recambio (k _p) (s ⁻¹)	92.5
Punto isoelectrico (pI)	5.3
pH óptimo (NADPH como reductor)	7.5
Número de residuos de la subunidad	521
Volumen parcial específico (cm ³ g ⁻¹)	0.724
Relación friccional (f/f ₀)	1.33

de la curva, respectivamente. El pH óptimo calculado a partir de estos valores fue de 7.7. Además, el perfil de los gráficos de pH contra el logaritmo de la relación $V_{max_{app}}/K_{m_{app}}$, tanto para GSSG como para NADPH, muestran que en la región básica existe uno o varios grupos que se desprotonan (figuras 16b y 17b).

Estudios de velocidad inicial.

No se observó ningún efecto en las velocidades iniciales al variar el orden de adición del GSSG y el NADPH.

La figura 19a muestra la gráfica de dobles recíprocos de la concentración variable de GSSG contra la velocidad inicial, a concentraciones fijas de NADPH. Como se puede observar, el resultado es una familia de líneas paralelas en el intervalo de concentración usado. Los regráficos de las intersecciones sobre la ordenada y sobre la abscisa contra la concentración de NADPH también fueron lineales (figura 19b). La K_m calculada para NADPH, a partir de los regráficos fue de $6.52 \mu M$, y la V_{max} de $0.1486 \mu moles \times min^{-1}$.

Por otro lado, la figura 20a muestra la gráfica de doble recíprocos de la concentración variable de NADPH contra la velocidad inicial, a concentraciones fijas de GSSG. Al igual que en el caso anterior, el resultado es una familia de líneas paralelas en el intervalo de concentración usado, siendo también lineales los regráficos de las intersecciones sobre la ordenada y la abscisa contra el recíproco de la concentración de GSSG (figura 20b).

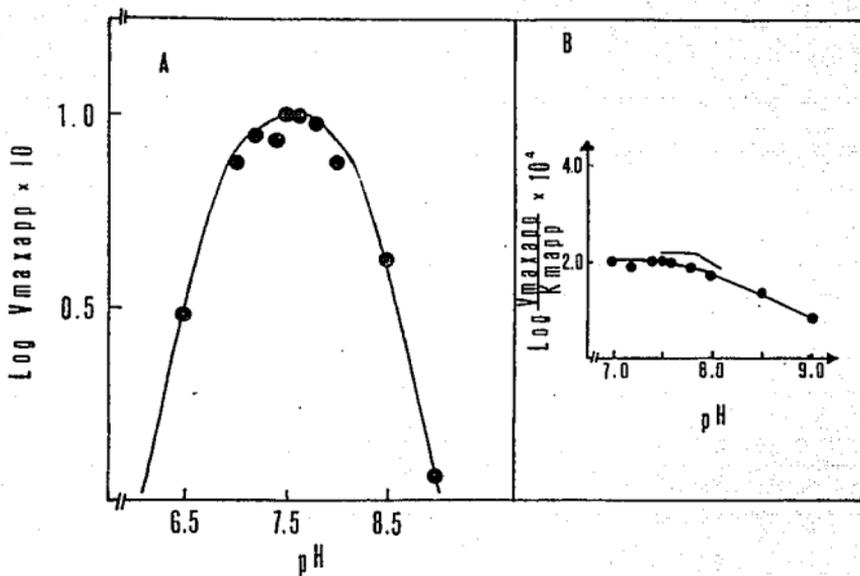


FIGURA 16.
 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*.
 A) DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GSSG MANTENIENDO CONSTANTE LA CONCENTRACION DE NADPH. LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SE DETERMINO COMO ESTA DESCRITA EN MATERIALES Y METODOS. B) PERFIL DEL LOG DE LA V_{maxapp} EN FUNCION DEL pH; C) PERFIL DEL LOG V_{maxapp}/K_{mapp} EN FUNCION DEL pH.

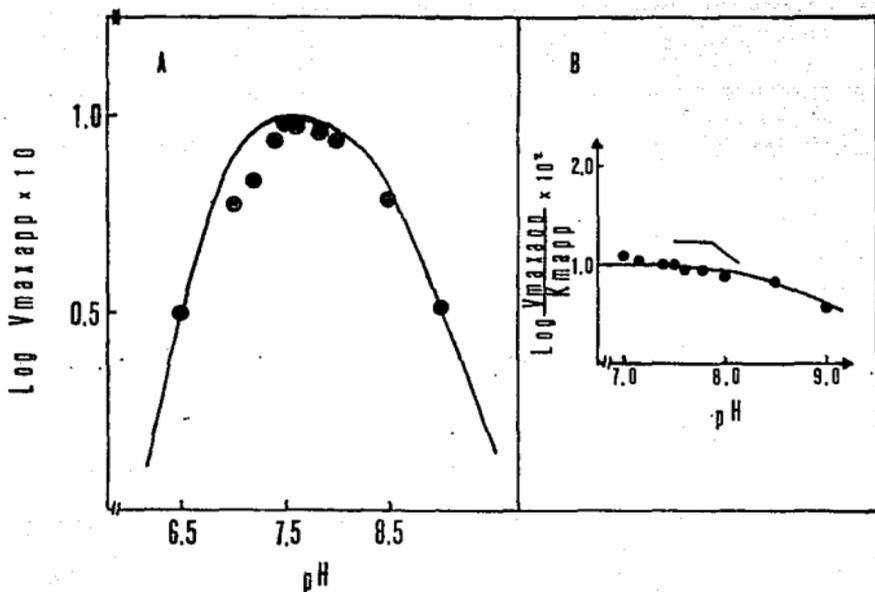


FIGURA 17.
 EFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*.
 A) DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NADPH Y MANTENIENDO CONSTANTE LA CONCENTRACION DE GSSG. LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SE DETERMINO COMO ESTA DESCRITA EN MATERIALES Y METODOS. A) PERFIL DEL LOG DE LA V_{maxapp} EN FUNCION DEL pH; B) PERFIL DEL LOG $V_{\text{maxapp}}/K_{\text{mapp}}$ EN FUNCION DEL pH.

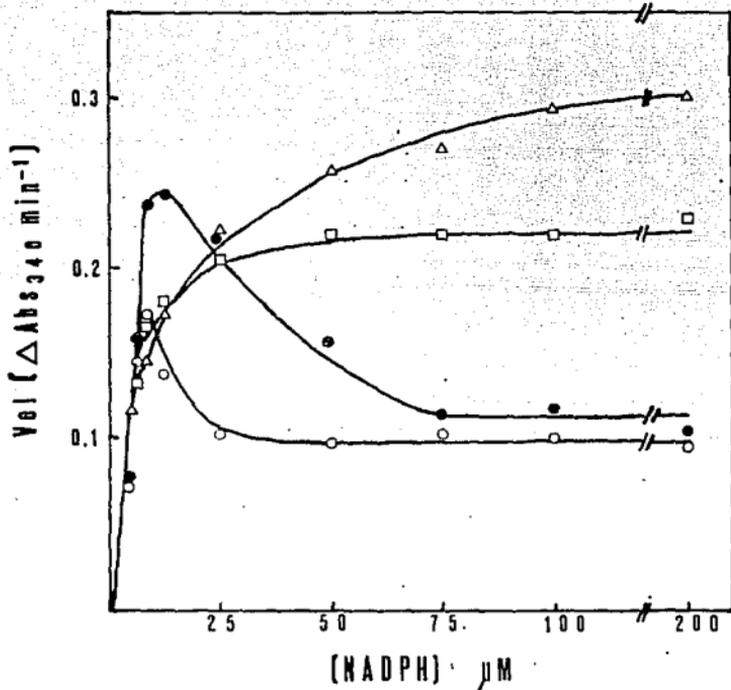


FIGURA 18.
 EFECTO DEL pH EN LA INHIBICION POR NADPH DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*. SE DETERMINO LA ACTIVIDAD A CONCENTRACION CONSTANTE DE GSSG (1mM) COMO SE DESCRIBE EN MATERIALES Y METODOS. SIMBOLOS: (○) pH=6.0; (□) pH=6.5; (△) pH=7.0 Y (●) pH=7.5.

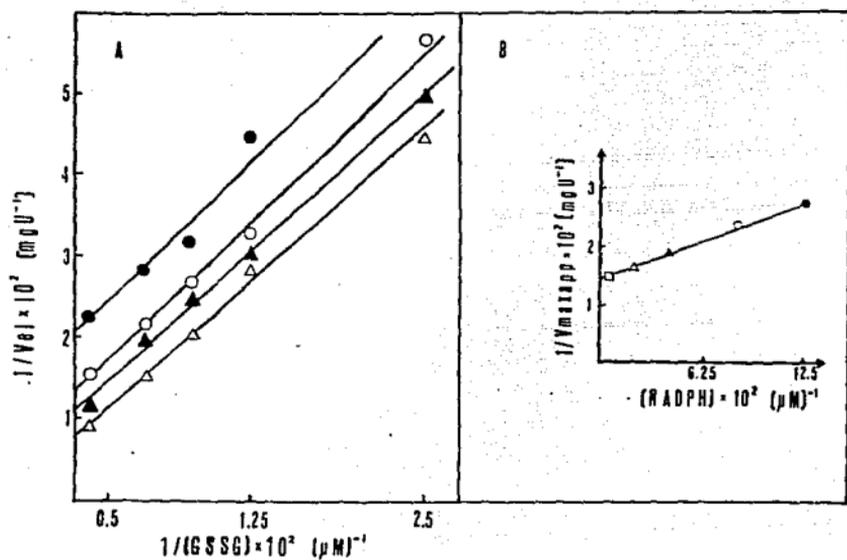


FIGURA 19.
 PATRONES DE VELOCIDAD INICIAL DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*. LA ACTIVIDAD SE DETERMINO COMO ESTA DESCRITA EN MATERIALES Y METODOS. A) GRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LA VELOCIDAD EN FUNCION DE LA CONCENTRACION VARIABLE DE GSSG. LAS CONCENTRACIONES DE NADPH FIJAS FUERON: (●) 8 μM ; (○) 12 μM ; (▲) 25 μM ; (△) 50 μM . EN ESTE GRAFICO SE OMITI LA CONCENTRACION DE 200 μM . B) REGRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LA CONCENTRACION DE NADPH CONTRA LA V_{maxapp} .

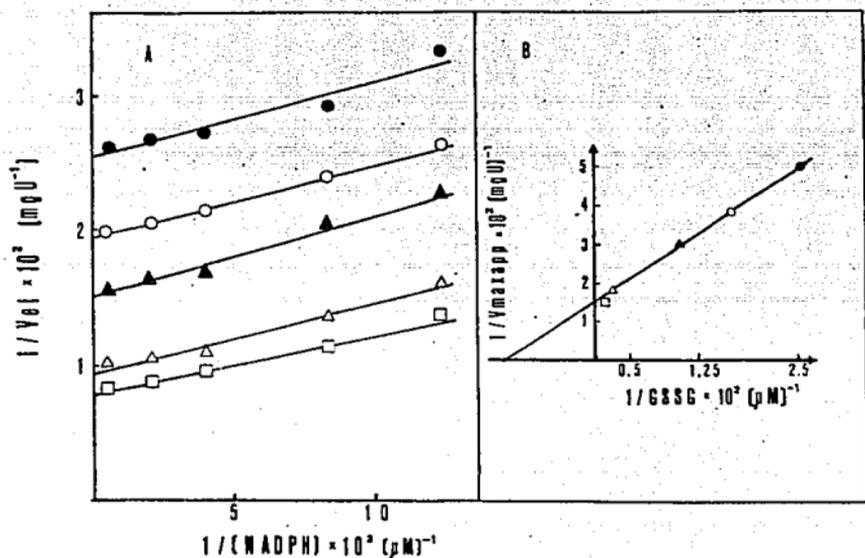


FIGURA 20. PATRONES DE VELOCIDAD INICIAL DE LA GLUTATION REDUCTASA DE *R. rubrum*. LA ACTIVIDAD SE DETERMINO COMO ESTA DESCRITA EN MATERIALES Y METODOS. A) GRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LA VELOCIDAD INICIAL EN FUNCION DE LA CONCENTRACION VARIABLE DE NADPH. LAS CONCENTRACIONES DE GSSG FIJAS FUERON: (●) 40 μM ; (○) 60 μM ; (▲) 100 μM ; (△) 500 μM Y (□) 1000 μM . B) REGRAFICO DE DOBLE RECIPROCOS DE LA CONCENTRACION DE GSSG CONTRA LA V_{maxapp} .

La Km calculada para GSSG, a partir de los regráficos fue de 78.7, μM y la Vmax de $0.1503 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1}$.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El objetivo principal del presente trabajo, fue el de purificar hasta homogeneidad la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* para su posterior caracterización cinética y molecular. Los resultados obtenidos se discuten a la luz de un reporte previo (61) con la enzima parcialmente pura, en el cual se sugiere que la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* exhibe una estructura monomérica.

La enzima fue prácticamente purificada hasta homogeneidad (95% de pureza), partiendo de un extracto libre de cromatóforos mediante el siguiente protocolo de purificación: fraccionamiento salino en sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico en DEAE - Sephacel y cromatografía de afinidad en 2', 5', ADP - Sepharosa 4B. Este último paso representó la etapa decisiva en el esquema de purificación empleado, ya que fue la etapa en la cual se logró el mayor incremento en la actividad específica y además marcó la diferencia con el esquema de purificación previamente reportado para la enzima de *Rhodospirillum rubrum* (61). En nuestra opinión, el presente procedimiento es notablemente más eficiente para la purificación de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* debido a las siguientes razones: 1) el rendimiento final de nuestra preparación es más alto (68,9%) que el rendimiento del 26% reportado previamente por Boll; 2) el producto final de nuestra preparación fue una enzima prácticamente pura, con una pureza aproximada de un 95%; 3) la actividad específica de la enzima

~~Los resultados de los experimentos realizados con el sistema de~~
~~la enzima preparada a partir de la levadura de cerveza~~
~~muestran que la actividad enzimática es~~
~~relativamente alta en el sistema de la levadura de cerveza~~
~~preparada a partir de la levadura de cerveza.~~

Por lo tanto, se puede concluir que la actividad enzimática
relativamente alta de nuestra preparación, es consecuencia de
la pérdida gradual del acetato por parte de las modificaciones
experimentales en las cuales se lleva a cabo la purificación de la
enzima. Sin embargo, la actividad de la enzima no aumenta al
añadir diferentes concentraciones de PAB a la mezcla de sustrato
además, la relación de absorción A_{280}/A_{410} de 2.0, es muy
similar a la de la enzima altamente purificada de origen humano
(tabla I). Estos datos sugieren que bajo estas condiciones
experimentales, la flavina se encuentra fuertemente unida a la
proteína y, por ende, la actividad enzimática relativamente baja
de nuestra preparación, es consecuencia de la pérdida gradual
del grupo prostético durante el procedimiento de purificación.

Por otro lado, se sabe que la enzima altamente purificada de
origen humano es inactiva y que la actividad enzimática depende
del almacenamiento de la enzima. En consecuencia, es probable
que la enzima a partir de levadura sea inactiva en consecuencia
de su almacenamiento en el laboratorio.

Los resultados de los experimentos realizados con el sistema de
la enzima preparada a partir de la levadura de cerveza
muestran que la actividad enzimática es relativamente alta en el
sistema de la levadura de cerveza preparada a partir de la levadura
de cerveza.

purificada fue de 102 unidades \times mg^{-1} , que es de hecho muy superior a aquella de 2.9 unidades \times mg^{-1} reportada previamente (61). La actividad específica reportada en el presente trabajo es relativamente baja en comparación a la actividad específica reportada de otras fuentes (tabla V).

Por un lado, se podría pensar que la actividad específica relativamente baja de nuestra preparación, fuese consecuencia de la pérdida gradual del cofactor FAD bajo las condiciones experimentales en las cuales se llevó a cabo la purificación de la enzima. Sin embargo, la actividad de la enzima no aumentó al adicionar diferentes concentraciones de FAD a la mezcla de ensayo; además, la relación de absorbancia A_{280}/A_{458} de 7,61, es muy similar a la de la enzima altamente purificada de otras fuentes (tabla I). Estos datos sugieren que bajo estas condiciones experimentales, la flavina se encuentra fuertemente unida a la proteína y, por ende, la actividad específica relativamente baja de nuestra preparación, no es consecuencia de la pérdida gradual del grupo prostético durante el procedimiento de purificación.

Por otro lado, otra causa de la baja actividad podría ser la inactivación de la proteína por degradación proteolítica durante el almacenamiento de los extractos. No obstante, la purificación de la enzima a partir de extractos recién obtenidos no representó un aumento en la actividad específica.

De acuerdo con ello, es probable que la actividad específica relativamente baja que nosotros reportamos, sea el resultado de la purificación de la enzima en una etapa del crecimiento donde la

actividad es baja "per se".

Al igual que la glutatión reductasa de otras fuentes, la enzima de *Rhodospirillum rubrum* mostró una alta especificidad por el NADPH a pH 7.5 y 25°C. En contraste a la glutatión reductasa de *Chromatium vinosum*, - la cual es específica por NADH - en *Rhodospirillum rubrum* se encontró poca actividad de reductasa dependiente de NADH a pH 7.5 y 25°C; además, la enzima de *Rhodospirillum rubrum* no mostró actividad de reductasa dependiente de NADH ni a pH 8.0 o pH 5.5, (como es el caso para la enzima de hojas de espinaca (37) y de hígado de rata (40), respectivamente). Una característica importante de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum*, es que las actividades con NADPH y NADH alcanzaron un óptimo a pH 7.5, en contraste con reportes previos en donde la actividad máxima con NADH se encontró a valores de pH más ácidos en relación con aquella encontrada con NADPH.

La glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* exhibió poca actividad por el disulfuro mixto de glutatión y Coenzima A (CoASSG) a pH 7.5 y 25°C. Cabe señalar que en reportes previos, se ha reportado que la actividad reductora del CoASSG alcanza un máximo a pH 5.5. Sin embargo, como consecuencia de la poca afinidad de la enzima por el CoASSG (en comparación con el GSSG) y por su costo tan elevado, no fue posible determinar la actividad con este disulfuro a valores de pH ácidos.

La tabla V ilustra la comparación de los parámetros cinéticos de la glutatión reductasa purificada de diversas fuentes, tanto para GSSG como para CoASSG. A excepción de la cianobacteria

Spirulina maxima, donde se reportó una relación alta de actividad, no se observó diferencia significativa entre procariotes y eucariotes. Aunque no se ha propuesto ningún papel metabólico para el CoASSG, se conoce que éste inhibe a un número de enzimas (77-79). También cabe señalar que en *E. coli*, bajo ciertas condiciones metabólicas, una fracción importante de la reserva de CoA está en forma de CoASSG (80).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, y en ausencia de un mecanismo reductor del CoASSG, toda la CoA presente en la célula se acumularía en forma de CoASSG. Lo anterior sugiere que en presencia de CoASSG, el organismo en cuestión estaría en la necesidad de desarrollar uno o más mecanismos para la reducción del CoASSG. De hecho, se ha propuesto que in vivo el CoASSG es reducido por la acción combinada de una tioltransferasa y la glutatión reductasa (60).

Por otro lado, ya se ha demostrado la presencia de GSH y CoASH en *R. rubrum* (57), y por ende es factible la formación del CoASSG. Lo anterior sugiere que probablemente la actividad de CoASSG reductasa en la glutatión reductasa, sea un mecanismo alternativo para regular el nivel intracelular del compuesto mencionado.

Como puede verse en la tabla V, el CoASSG también es reducido por la glutatión reductasa de hígado de rata (40,81) y levadura del pan (60,82) a pH 5.5; al igual que en *R. rubrum*, éste representa un sustrato débil comparado con el GSSG. La baja actividad de la glutatión reductasa hacia el CoASSG puede

TABLA V

Comparación de los parámetros cinéticos de la Glutación
 Reductasa de diferentes fuentes hacia
 el GSSG y el CoASSG

PROCARIOTES	V_m (GSSG)	$^a V_m$ (CoASSG)	K_m (GSSG)	$^b K_m$ (CoASSG)	GSSG/CoASSG
E. COLI.	66.7	5.7	41.5	1234	11.7
S. MAXIMA.	238.0	3.0	121.0	3300	79.0
R. RUBRUM.	102.0	507.0	60.0	3397	20.1
EUCARIOTES.					
LEVADURA. (S. CEREVICIAE)	260.0	28.6	58.0	200	9.1
HIGADO DE RATA	207.0	17.0	57.0	230	12.2
CUERPO CILIAR. DE BOVINO.	40.0 84.0	12.0 20.0	85.0 98.0	1010 1320	3.3 4.2

^a K_m en μM .

^b V_m en $\Delta \text{ Abs} \times \text{min}^{-1}$.

explicarse si se considera la estructura cristalina del complejo enzima-CoASSG (83), donde el grupo disulfuro del compuesto CoASSG no está localizado óptimamente con respecto al sulfuro de la cisteína número 58 de la GR de eritrocito humano, lo cual se debe al gran área de contacto que forma la Coenzima A con la superficie de la proteína que evita que su disulfuro adquiera la orientación correcta. La poca información disponible acerca de la actividad de

CoASSG reductasa en la glutatión reductasa purificada de otras fuentes, no permite asegurar que la baja actividad de CoASSG reductasa sea una característica general de estos organismos.

El peso molecular de la glutatión reductasa nativa de *R. rubrum* se determinó alrededor de 110000 Da. Por otro lado, por electroforesis en SDS, se determinó un peso de 54400 para la subunidad, lo cual corrobora consistentemente que la enzima nativa es un dímero con subunidades probablemente idénticas.

Nuestra estimación del peso molecular de 110000 Da coincide con el valor reportado para la glutatión reductasa de otras fuentes. Por otro lado, nuestro valor calculado difiere considerablemente del valor de 63000 Da reportado previamente por Boll (61), quien sugiere que la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* es un monómero. Este último dato resulta contradictorio. En este sentido, cabe señalar que una de las técnicas utilizadas por Boll para evaluar el peso molecular de la proteína, fue la sedimentación en equilibrio. Esto resulta sorprendente, ya que la caracterización reportada por dicho autor se hizo con una preparación parcialmente pura, y el análisis de una proteína mediante dicha técnica requiere un grado considerable de pureza.

Además, es poco probable encontrar monómeros con actividad de glutatión reductasa, toda vez que por estudios cristalográficos de la glutatión reductasa de eritrocito humano (62), se conoce que el sitio de unión del GSSG está formado por aminoácidos de las 2 subunidades, lo cual implica que el monómero como tal no debe

tener actividad reductora del GSSG.

El espectro de absorción de la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* presentó 3 picos de absorción con máximos a 274, 365 y 458 nm, los cuales son típicos de una flavoproteína. El contenido de flavina de nuestra preparación fue de aproximadamente 1 mol por mol de subunidad, de ahí que la molécula de enzima dimérica contiene probablemente 2 moléculas de flavina. Ambos, tanto el espectro de absorción como el contenido de flavina, fueron similares a los reportados para la enzima altamente purificada de otras fuentes (tabla I).

La composición de aminoácidos de nuestra preparación, en comparación a la reportada de otras fuentes de procariotes y eucariotes (tabla III), mostró un alto contenido de glicinas y argininas, y un número relativamente bajo de lisinas y cisteínas. De la tabla I observamos que el punto isoeléctrico calculado para la glutatión reductasa de *R. rubrum*, es relativamente alto comparado con el reportado para otras glutatión reductasas de procariotes, lo cual probablemente sea resultado del alto contenido de argininas de nuestra preparación. Sin embargo, a pesar de ello, el punto isoeléctrico de la enzima de *R. rubrum* es relativamente bajo si lo comparamos con el reportado para eucariotes, lo cual probablemente se explique por el alto contenido de lisinas en eucariotes; además, si consideramos el contenido de aspártico entre los diferentes organismos (tabla IV), observamos que éste es ligeramente mayor en la proteína de *R. rubrum*, lo cual también puede contribuir al carácter más ácido del

punto isoelectrico de la enzima de *R. rubrum* comparado con el reportado para la glutatión reductasa de eucariotes.

Con respecto al contenido de cisteínas, la composición de aminoácidos reveló un total de 4 cisteínas. Este valor es bajo comparado con el contenido de este aminoácido en la enzima de mamíferos. Por ejemplo, se conoce por estudios cristalográficos de la glutatión reductasa de eritrocito humano (62), que ésta posee 10 cisteínas por subunidad, 7 de las cuales se encuentran en forma de tioles y las otras 3 formando puentes disulfuro.

De la misma manera como se presentó para la enzima de *Spirulina sp* (84), la titulación de los grupos SH libres con el DTNB, sugiere que la proteína de *R. rubrum* posee, en condiciones nativas, un residuo de cisteína por monómero parcialmente oculto, ya que la reacción de la enzima con el reactivo de Ellman fue lenta. En condiciones desnaturalizantes, la enzima exhibió otro residuo de cisteína por monómero el cual se encuentra totalmente oculto en condiciones nativas.

Por otro lado, la actividad de reductasa de la enzima de *R. rubrum* se inhibió totalmente con reactivos para sulfhidrilos, lo cual sugiere fuertemente que la actividad enzimática depende de los tioles libres (-SH). Esto último confirma los resultados obtenidos sobre la titulación de los -SH libres de la enzima con el DTNB, que revelan un total de 2 tioles libres y 2 cisteínas no reactivas por subunidad.

De acuerdo a ello, lo más probable es que la enzima de *R. rubrum* presente un enlace disulfuro en el sitio activo reducible

por el NADPH, lo cual coincide con el mecanismo de reacción propuesto para la glutatión reductasa de eritrocito humano o de otras fuentes.

Otra característica importante de nuestra preparación, es la alta sensibilidad a la urea en comparación con otras glutatión reductasas. La enzima de *R. rubrum* se inactiva totalmente a una concentración de urea 3 M, mientras que la actividad catalítica de las enzimas de *Phycomyces blakesleeanus* (85) y de hígado de conejo (43), no es alterada en presencia de urea 8.0 M. Los resultados de las ultracentrifugaciones en presencia de urea 1.5 y 3.0 M, indican que la inactivación total de la enzima a 3.0 M de urea no se debe a un cambio de la estructura cuaternaria de la proteína, sino que probablemente es consecuencia de un cambio conformacional local de la proteína.

De acuerdo con esto, la alta sensibilidad de la enzima de *R. rubrum* se puede interpretar como resultado de un cambio de la estructura terciaria de la proteína, que probablemente afecte el sitio de fijación de los substratos, el sitio catalítico o ambos. Lo anterior es consistente con el comportamiento de algunas proteínas ante el efecto de la urea, las cuales se inactivan por cambios conformacionales sutiles que afectan el sitio catalítico de éstas (86,87). Por otro lado, la mayor sensibilidad de la proteína al hidrocloreuro de guanidina en comparación a la urea, se puede explicar por el hecho de que el hidrocloreuro de guanidina hace más hidrofóbico el medio en el cual se encuentra la proteína, y por ende, se altera la estructura terciaria de la enzima

causando la pérdida de la actividad catalítica. Al igual que la urea, el hidrocloreuro de guanidina también afecta la actividad de las proteínas, provocando pequeños cambios conformacionales que alteran el sitio activo y/o la unión de los sustratos (88).

Los estudios del efecto del ión hidrógeno revelaron que a valores de pH ácidos (6.0 y 6.5), la enzima exhibió inhibición por GSSG y por NADPH dependiente de la concentración del ión hidrógeno. Además, la enzima mostró un fenómeno histerético muy interesante el cual, podría ser objeto de estudio.

El gráfico de Dixon-Webb (89), esto es, la dependencia del logaritmo de la velocidad máxima aparente ($\log V_{maxapp}$) en función del pH, ilustra un óptimo a pH 7.5 tanto para el GSSG como para el NADPH. Sin embargo, con el ajuste de los datos a las ecuaciones de Dixon, se calculó un pH óptimo de 7.7 para NADPH, ligeramente mayor al calculado experimentalmente, lo cual puede ser resultado del error intrínseco que acompaña a los datos experimentales.

Por otro lado, el perfil de los gráficos de la relación $\log (V_{maxapp}/K_{mapp})$ en función del pH, tanto para el GSSG como para el NADPH indican que, en la región básica, la enzima libre presenta uno o varios grupos que se desprotonan causando la pérdida de la actividad catalítica. Lo anterior sugiere que dichos grupos ionizables, a pH alcalino, no se encuentran en la forma iónica apropiada para mantener la arquitectura del centro activo, fijar los sustratos, o catalizar la reacción. De los perfiles de los gráficos se puede observar que tanto para NADPH como para GSSG, el

punto de inflexión de las curvas es muy similar. En ese sentido, es probable que se trate del mismo grupo implicado para unir los substratos, catalizar la reacción, o ambos.

Con lo que respecta al mecanismo cinético, los estudios de los patrones de velocidad inicial revelaron que el mecanismo cinético de la enzima de *R. rubrum* es PING PONG, de acuerdo con la nomenclatura y notación de Cleland (63). Los patrones de velocidad paralelos observados en nuestro estudio, son consistentes con el mecanismo propuesto previamente por varios autores (35,36).

Sin embargo, en el caso de las enzimas de hígado de rata (40) y levadura (90), los patrones de inhibición por NADP^+ son difíciles de explicar en términos de un mecanismo de PING PONG simple. Dichos estudios revelaron un mecanismo de PING PONG a bajas concentraciones de substrato y un mecanismo secuencial a concentraciones altas de substrato.

De acuerdo con esto, nuestro estudio del mecanismo de reacción con base en los patrones de velocidad inicial no es concluyente, y se requiere un estudio adicional de los patrones de inhibición por producto, para obtener mayor información sobre el mecanismo de reacción.

Para concluir, la tabla I muestra que la glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* exhibe propiedades cinéticas y moleculares que coinciden con las reportadas de otras fuentes, principalmente con *Escherichia coli* y eritrocito humano que están ampliamente caracterizadas. Desafortunadamente no contamos con la secuencia de la enzima de *R. rubrum*; sin embargo, desde un punto

de vista funcional, lo anterior sugiere que la glutatión reductasa ha sido conservada en la evolución.

de vista funcional, lo anterior sugiere que la glutatión reductasa ha sido conservada en la evolución.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo se puede ampliar en el futuro realizando un análisis detallado de las propiedades más importantes de esta enzima. En forma paralela iniciaríamos un estudio comparativo más completo con la glutatión reductasa de otras fuentes.

Entre otros, sobresalen los siguientes aspectos:

1) Analizar el fenómeno histerético de la enzima al variar los siguientes parámetros: el pH, la fuerza iónica y la concentración de proteína.

2) Realizar el estudio de los patrones de inhibición por producto a altas y bajas concentraciones de sustrato, con el propósito de obtener información adicional acerca del mecanismo cinético de la enzima.

3) Alternativamente, se realizarán experimentos de modificación química con inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo, para determinar los pKa de los grupos de la enzima implicados en la catálisis y/o en la unión de los sustratos.

4) La glutatión reductasa de *Rhodospirillum rubrum* es muy sensible al hidrocloreuro de guanidina y a la urea en comparación a la GR de otras fuentes. Por esto, se realizarán estudios de los cambios estructurales que sufre la proteína ante la acción de dichos desnaturalizantes por medio de dicroísmo circular.

REFERENCIAS

- 1) Jocelyn, P.C. (1972) *Biochemistry of the SH group*, pp 10, Academic Press, New York.
- 2) Kosower, N.S., and Kosower, E.M. (1978) *Inter. Rev. Cytol.* 54, 109-160.
- 3) Dethmer, J.K., and Meister, A. (1981) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78, 7492-7496.
- 4) Durand, R.E. (1984) *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 10, 1235-1238.
- 5) Robins, R.J., and Davis, D.D. (1980) *Febbs Lett.* 111, 432.
- 6) Griffith, O.W., Bridges, R.J., and Meister, A.M. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76, 6319-6322.
- 7) Hopkins, F.G., and Elliot, K.A.C. (1931) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 109, 58-88.
- 8) Rall, T.W., and Lehninger, A.L. (1952) *J. Biol. Chem.* 194, 119-160.
- 9) Reed, L.J. (1974) *Acc. Chem. Res.* 7, 40-46.
- 10) Packman, L.C., Hale, G., and Perham, R.N. (1984) *EMBO. J.* 3, 1315-1319.
- 11) Fox, B., and Walsh, C.T. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2498-2503.
- 12) Perham, R.N., Harrison, R.A., and Brow, J.P. (1978) *Biochem. Soc. Trans.* 6, 47-50.
- 13) Williams, C.H. Jr., Arscott, L.D., and Swenson, R.P. (1984) in *Flavins and Flavoproteins.* (Bray, R.C., Engel, P.C., Mayhew, S.G., Eds). pp. 95-109, de Gruyter, Berlin.
- 14) Fox, B., and Walsh, C.T. (1983) *Biochemistry.* 22, 4082-4088.
- 15) Williams, C.H. Jr. "Flavin-Containing Dehydrogenases" in the *Enzymes.* Boyer, P.D., Ed. Academic Press, New York, (1976) 13, 89-173.
- 16) Holmgren, A. "Pyridine Nucleotido: Disulfide Oxidoreductases" in *Dehydrogenases Requiring Nicotinamide Coenzymes.* (Jeffery, J., Ed. Birkhauser Verlag: Basel). (1980) 149-180.

- 17) Carlberg, I., Ph.D. Thesis, Stockholm University. (1981).
- 18) Ondarza, R.N., Rendón, J.L., Ondarza, M. (1983) *J. Mol. Evol.* 19, 371-375.
- 19) Shames, S.L., Fairlamb, A.H., Cerami, A., Walsh, C.T. (1986) *Biochemistry.* 25, 3519-3526.
- 20) Krauth-Siegel, R.L., Enders, B., Henderson, G.B., Fairlamb, A.H., Schirmer, R.H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 164, 123-128.
- 21) Akerboom, T.P.M., Bilzer, M., Sies, H. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4248-4252.
- 22) Sies, H. (1986) *Angew. Chem.* 98, 1061-1075.
- 23) Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3672-3678.
- 24) Ziegler, D.M. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 305-329.
- 25) Wolosik, R.A., Buchanan, B.B. (1977) *Nature.* 266, 565-567.
- 26) Schirmer, R.H., Schulz, G.E. "Pyridine Nucleotide-Linked Sulfur Metabolism" in *Coenzymes and Cofactors.* (Dolphin, D., Poulson, R., Avromovic, A. Eds). Wiley: New York. (1987) 2, 161-204.
- 27) Urey, H.C. (1952) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 38, 351-363.
- 28) Williams, C.H.Jr., Zanetti, G., Arscott, L.D., McAllister, J.K. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 5226-5231.
- 29) Greer, S., Perham, R.N. (1986) *Biochemistry.* 25, 2736-2742.
- 30) Mata, A.M., Pinto, M.C., Lopez-Barea, J. (1984) *Z. Naturforsch.* 39, 908-915.
- 31) Chung, Y.C., Hurlbert, R.E. (1975) *J. Bacteriol.* 123, 203-211.
- 32) Serrano, A., Rivas, J., Losada, M. (1984) *J. Bacteriol.* 158, 317-324.
- 33) Rendón, J.L., Calcagno, M., Mendoza-Hernandez, G., Ondarza, R.N. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 215-233.
- 34) Carlberg, I., Mannervick, B. (1985) *Meth. Enzymol.* 113, 484-490.
- 35) Massey, V., Williams, C.H.Jr. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4470-4480.

- 36) Wooding, T.S., Segel, I.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta.* 167, 64-77.
- 37) Halliwell, B., Foyer, C.H. (1978) *Planta.* 139, 9-17.
- 38) Muramatsu, T., Iwanaga, S., Kan, S. (1980) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46, 757-762.
- 39) Lopez-Barea, J., Lee, C.Y. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 487-499.
- 40) Carlberg, I., Mannervick, B. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.
- 41) Taniguchi, M., Hara, T., Honda, H. (1986) *Biochem. Internatl.* 13, 447-454.
- 42) Le Trang, N., Bhargava, K.K., Cerami, A. (1983) *Anal. Biochem.* 133, 94-99.
- 43) Zanetti, G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 241-246.
- 44) Carlberg, I., Mannervick, B. (1981) *Anal. Biochem.* 116, 531-536.
- 45) Moroff, G., Kosow, D.P. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 527, 327-336.
- 46) Ogus, A., Tezcan, E.F. (1981) *Biochem. Med.* 25, 81-91.
- 47) Latta, K., Augusteyn, R.C. (1984) *Exp. Eye Res.* 39, 343-354.
- 48) Ray, L.E., Prescott, J.M. (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 402-409.
- 49) Boggaram, V., Larson, K., Mannervick, B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 527, 337-347.
- 50) Worthington, D.J., Rosemeyer, M.A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 167-177.
- 51) Krohne-Ehrich, G., Schirmer, R.H., Untucht-Grau, R. (1977) *Eur. J. Biochem.* 80, 65-71.
- 52) Nakashima, K., Miwa, S., Yamauchi, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 445, 309-323.
- 53) Harvey, J.W., Kaneko, J.J. (1957) *Am. J. Vet. Res.* 36, 1511-1513.
- 54) Rathbun, W.B., Bovis, M.G., Holleschan, A. (1986) *Curr. Eye Res.* 5, 195-199.

- 55) Giblin, F.J., McCreedy, J.P. (1983) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 24, 113-118.
- 56) Fahey, R.C., Brown, W., Adams, W.B., Worsham, M.B. (1978) J. Bacteriol. 133, 1126-1129.
- 57) Fahey, R.C., Buschbacher, R.M., Newton, G.L. (1987) J. Mol. Evol. 25, 81-88.
- 58) Krauth-Siegel, R.L., Blatterspiel, R., Saleh, M., Schiltz, E., Schirmer, R.H., Untucht-Gran, R. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 259-267.
- 59) Saleh, M., M.D. Thesis, Heidelberg University. (1979).
- 60) Carlberg, I., Mannervick, B. (1977) Biochim. Biophys. Acta. 484, 268-274.
- 61) Boll, M. (1969) Arch. Mikrobiol. 66, 374-389.
- 62) Thieme, R., Pai, E.F., Schirmer, R.H., and Schulz, G.E. (1981) J. Mol. Biol. 152, 763-782.
- 63) Cleland, W.W. (1963) Biochim. Biophys. Acta. 67, 103-173.
- 64) Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
- 65) Polyacrilamida Gel Electroforesis, Laboratory Techniques (1980) Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suecia.
- 66) Weber, K., and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- 67) Laemmli, U.K. (1980) Nature. 227, 680-685.
- 68) Laurent, T.C., and Killander, J. (1964) J. Chromatog. 14, 317-330.
- 69) Potechka, M. (1987) Anal. Biochem. 162, 47-64.
- 70) Tanford, C. (1961) Physical Chemistry of Macromolecules, pp 346-363, John Wiley and Sons, New York.
- 71) Erlichman, J., Rubin, C.S., and Rosen, O.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7607-7609.
- 72) Ellman, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
- 73) Rendón, J.L., and Calcagno, M. (1985) Experientia. 41, 382-383.
- 74) Martin, R.G., and Ames, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.
- 75) Edelhoch, H. (1967) Biochemistry. 6, 1948-1954.

- 76) McMeekin, T.L., and Marshall, K. (1952) *Science*. 116, 142-143.
- 77) Bees, W.C.H., and Loewen, P.C. (1979). *Can. J. Biochem.* 57, 336-345.
- 78) Harvey J. Brandwein, John A. Lewicki., and Ferid Murad. (1981) *The Journal of Biological Chemistry*. 256 (6), 2958-2961.
- 79) Hiram F. Gilbert. (1982) *The Journal of Biological Chemistry*. 257 (20), 12086-12091.
- 80) Loewen, P.C. (1978) *Can. J. Biochem.* 56, 753-759.
- 81) Ondarza, R.N., Escamilla, E., Gutiérrez, J., and De La Chica, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*. 341, 162-171.
- 82) Ondarza, R.N., Abney, R., and Lopez Colomé, A.M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*. 191, 239-248.
- 83) Pai, E.F., Ph.D. Thesis, Heidelberg University. (1978).
- 84) Jin-Yan Cui., Sadao Wakabayashi., Keishiro Wada., Keiichi Fukuyama., and Hiroshi Matsubara. (1989) *J. Biochem.* 105, 390-394.
- 85) Montero, S., De Arriga, D., and Soler, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*. 952, 56-66.
- 86) Qi-Zhi., Min Tian., and Chen-Lu Tsou. (1984). *Biochemistry*. 23, 2740-2744.
- 87) Gisele Le Bras., Wolfgang Teschner., Dominique Deville-Bonne., and Jean-Renaud Garel. (1989) *Biochemistry*. 28, 6836-6841.
- 88) Yong-Ze MA., and Chen-Lu TSOU. (1991). *Biochem. J.* 277, 207-211.
- 89) H.B.F. Dixon and K.F. Tipton. (1979) *Methods in Enzymology.*, Academic Press, Inc, 63, Ch. 9, pp. 183-234.
- 90) Mannervick, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1151-1158.