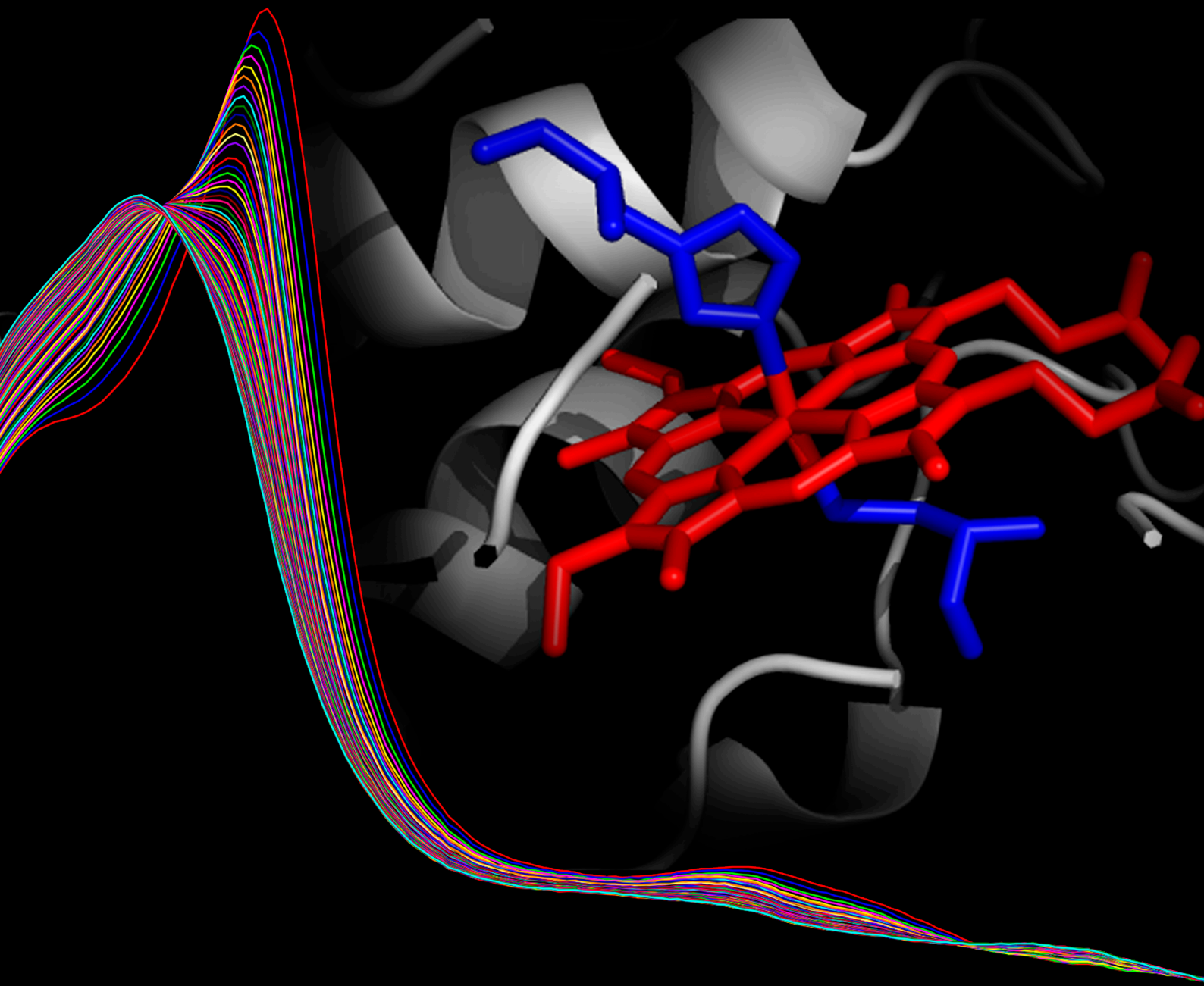


Tesina para la obtención del título de Licenciada en Bioquímica

Utilización de compuestos de mercurio para caracterizar la unión hemo-tiolato de la enzima cistationina β -sintasa



Dayana Benchoam

Orientador: Dr. Ernesto Cuevasanta
Coorientadora: Dra. Beatriz Alvarez

Laboratorio de Enzimología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo 2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. Metabolismo de aminoácidos azufrados	9
2.1.1. Metionina.....	10
2.1.2. Homocisteína	11
2.1.3. Cisteína.....	15
2.2. Cistationina β -sintasa.....	22
2.2.1. Estructura modular	23
2.2.2. Mecanismo catalítico	26
2.2.3. Hemo de la CBS	28
2.3. Utilización de compuestos de mercurio como herramienta bioquímica.....	35
2.3.1. Reactividad del mercurio	36
2.3.2. Aplicaciones bioquímicas	38
2.4. Hipótesis.....	40
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. Objetivo general.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.1. CBS.....	43
4.2. Soluciones	43
4.3. Cinética de reacción del hemo-tiolato de la CBS férrica con compuestos de mercurio ..	43
4.4. Separación del hemo de la proteína	44
4.4.1. CBS con HgCl ₂ por 24 horas.....	44
4.4.2. CBS con HgCl ₂ , <i>p</i> -CMB y mercurocromo por 48 horas	44
4.5. Medidas de actividad	44
4.5.1. Actividad de CBS.....	44
4.5.2. Actividad de CBS tratada con compuestos de mercurio	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1. Cinética de reacción del hemo-tiolato de la CBS férrica con compuestos de mercurio ..	47
5.1.1. Reacción con <i>p</i> -CMB.....	47
5.1.2. Reacción con HgCl ₂	55

5.1.3. Reacción con mercurocromo	67
5.1.4. Análisis de la cinética	72
5.2. Exposición del hemo de la CBS a compuestos que no contienen mercurio	78
5.2.1. Acetato de zinc	78
5.2.2. NEM	78
5.3. Separación del hemo de la proteína	80
5.3.1. CBS con HgCl ₂ por 24 horas	80
5.3.2. CBS con HgCl ₂ , <i>p</i> -CMB y mercurocromo por 48 horas	81
5.4. Medidas de actividad	84
5.4.1. Actividad de CBS	84
5.4.2. Actividad de CBS tratada con compuestos de mercurio	84
6. CONCLUSIONES	89
7. AGRADECIMIENTOS	91
8. REFERENCIAS	93

ABREVIATURAS

3-MST	3-mercaptopiruvato azufretransferasa
BSA	albúmina sérica bovina
CBS	cistationina β -sintasa
CDO	cisteína dioxigenasa
CGL	cistationina γ -liasa
CO	monóxido de carbono
DTT	ditiotreitól
Fe(II)-CBS	CBS con hemo ferroso
Fe(II)CO-CBS	CBS con hemo ferroso hexacoordinado y CO e His como ligandos
Fe(II)NO [•] -CBS	CBS con hemo ferroso pentacoordinado y NO [•] como ligando
Fe(III)-CBS	CBS con hemo férrico
GSH	glutati3n
H ₂ S	sulfuro de hidrógeno
Hcy	homocisteína
Hg ²⁺	ion mercúrico
HgCl ₂	cloruro de mercurio (II)
MSR	metionina sintasa reductasa humana
NEM	N-etilmaleimida
NO [•]	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
<i>p</i> -CMB	<i>p</i> -cloromercuribenzoato
PLP	piridoxal-5'-fosfato
<i>p</i> -MB	<i>p</i> -mercuribenzoato

RSH	tiol
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SO ₂ ^{•-}	radical anión dióxido de azufre
TCA	ácido tricloroacético
U	unidad enzimática

1. RESUMEN

La cistationina β -sintasa (CBS) participa en el metabolismo de aminoácidos azufrados catalizando el primer paso de la vía de transulfuración, la condensación de serina y homocisteína para formar cistationina y agua. Alternativamente, produce cistationina y sulfuro de hidrógeno a partir de cisteína y homocisteína. Es de interés la caracterización de esta enzima pues sus mutaciones pueden llevar a aumentos de homocisteína en plasma que está asociado a diversas patologías, así como a alteraciones en el metabolismo de cisteína y de sulfuro de hidrógeno. La CBS está formada por un dominio N-terminal de unión a hemo, un dominio catalítico de unión a PLP y un dominio C-terminal regulador. El hemo es de tipo b, se encuentra hexacoordinado por la His65 y la Cys52, y es capaz de reaccionar con compuestos de mercurio a través del tiolato de la cisteína. Con el fin de caracterizar la unión del tiolato al ion férrico y particularmente cuantificar la constante de disociación, en este trabajo se caracterizó la cinética de las reacciones entre *p*-cloromercuribenzoato, cloruro de mercurio (II), mercurocromo y la CBS trunca, una enzima recombinante que carece del dominio regulador. Estas reacciones son multifásicas. Las reacciones con *p*-CMB y HgCl₂ llevan a la formación de una especie pentacoordinada. La constante exponencial (k_{obs}) de la primera fase de estas reacciones presentó una dependencia hiperbólica con la concentración del compuesto de mercurio. Se plantean dos hipótesis para el mecanismo de la primera fase, un modelo de selección conformacional y otro de encaje inducido. Según el primer modelo, la constante de disociación de la cisteína es $k = 0.3-0.4 \text{ s}^{-1}$. A su vez, se observó que el HgCl₂ lleva a la separación del hemo de la proteína e inhibe su actividad completamente, mientras que el *p*-CMB altera la actividad enzimática marginalmente.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Metabolismo de aminoácidos azufrados

La metionina y la cisteína se consideran aminoácidos azufrados porque poseen un átomo de azufre. La metionina lo contiene como tioéter mientras que en la cisteína el azufre se encuentra en forma de tiol o sulfhidrilo (RSH) (Figura 1). Estos aminoácidos están metabólicamente relacionados por la vía de transulfuración, donde la metionina es la fuente de azufre para la síntesis de cisteína. Es importante destacar la irreversibilidad de esta vía en los mamíferos, la metionina puede ser transformada a cisteína pero la cisteína no puede ser transformada a metionina. Esto explica por qué la cisteína no es un aminoácido esencial (siempre que haya suficiente ingesta de metionina) y la metionina sí es esencial; el consumo de cisteína no podría reemplazar carencias de metionina (1–3).

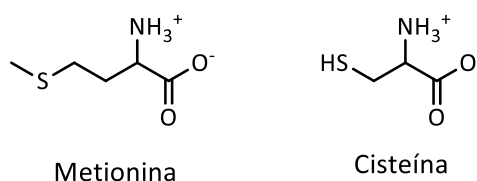


Figura 1. Estructuras de los aminoácidos azufrados. Las cadenas laterales de la metionina y la cisteína contienen azufre en un grupo tioéter y en un grupo tiol, respectivamente.

Los aminoácidos azufrados se ingieren con las proteínas de la dieta. La absorción a nivel del epitelio intestinal de los productos de la digestión proteica es altamente eficiente (2). La metionina puede ser transportada por transportadores de aminoácidos neutros y por sistemas que transportan péptidos. La cisteína es transportada por transportadores de aminoácidos neutros en la mucosa intestinal. También es transportada por sistemas de transporte peptídicos en péptidos que tienen cisteína. Además, se absorbe como cistina, que es transportada por el sistema $b^{0,+}$ que se encuentra en la membrana apical de la mucosa intestinal.

Los aminoácidos entran en el plasma y circulan como aminoácidos libres hasta que son eliminados de la circulación por los tejidos. El hígado utiliza los aminoácidos azufrados tanto para sintetizar proteínas y glutatión (GSH) como para producir taurina y sulfato. La reabsorción renal de cisteína y metionina es muy alta siendo la pérdida de aminoácidos en la orina despreciable (2).

En los humanos adultos el azufre está balanceado, es decir que la ingesta diaria de aminoácidos azufrados es igual a la cantidad de metionina y cisteína catabolizada por día. El metabolismo de metionina comienza con la transmetilación, un conjunto de reacciones que resulta en la formación de homocisteína. Ésta puede ser posteriormente remetilada a metionina. Por lo tanto, la transmetilación y la remetilación forman el ciclo de metionina que se produce en la gran mayoría de las células. Sin embargo, en este ciclo no se cataboliza la metionina, sino que

esto se logra en el proceso irreversible de transulfuración, donde la homocisteína formada a partir de metionina se convierte en cisteína (2, 4). La metionina también podría ser degradada por transaminación al cetoácido correspondiente, pero esto no es fisiológicamente relevante. Por lo tanto, el catabolismo de la metionina depende casi completamente de las vías de transmetilación y transulfuración con la transferencia del azufre al esqueleto carbonado de la serina para formar cisteína (1).

El azufre proveniente de metionina y cisteína termina siendo oxidado en las vías catabólicas de cisteína produciendo derivados con roles metabólicos adicionales. Por ejemplo, los enlaces disulfuro de los residuos de cistina estabilizan la estructura terciaria de las proteínas. Derivados más oxidados como el sulfato y la taurina tienen importantes funciones fisiológicas en la desintoxicación, formación de ácidos biliares, estabilización de membranas y neurotransmisión. Estos metabolitos terminan siendo excretados en la orina (2, 5). A su vez, a partir de cisteína se sintetizan un conjunto de moléculas relevantes incluyendo el sulfuro de hidrógeno.

2.1.1. Metionina

Metionina en proteínas

La metionina, al igual que el resto de los aminoácidos presentes en las proteínas, cumple determinados roles en cuanto a la estructura y función proteica. Es posible destacar tres aspectos de este aminoácido. Para empezar, el grupo metilo terminal le confiere la característica de hidrofobicidad, de hecho, la metionina es uno de los aminoácidos más hidrofóbicos. Gracias a esto, más de dos tercios de los residuos de metionina presentes en las proteínas globulares se encuentran en entornos hidrofóbicos. A pesar de la hidrofobicidad, un tercio de los residuos pueden estar ubicados en la superficie proteica, quedando susceptibles al ataque de especies reactivas del oxígeno para formar sulfóxido (3). Es de interés mencionar que recientemente se identificó una flavoproteína capaz de realizar la oxidación enzimática de residuos de metionina en actina (6, 7).

Aparte de los roles ya mencionados, la metionina se distingue por su función en la iniciación de la síntesis proteica. Es el aminoácido iniciador en la síntesis de proteínas eucariotas y *N*-formilmetionina es el iniciador en la síntesis de proteínas procariotas. Muchos de estos residuos son posteriormente removidos, lo que demuestra la vital importancia de la metionina en la iniciación de la traducción (3).

Transmetilación

El metabolismo de metionina comienza con la transmetilación que a su vez involucra tres reacciones, la formación de *S*-adenosilmetionina (SAM o AdoMet), la transmetilación dependiente de SAM para formar *S*-adenosilhomocisteína (SAH o AdoHcy) y la hidrólisis de SAH para formar homocisteína (Hcy) (Figura 2).

La transmetilación comienza con la formación de SAM a partir de ATP y metionina en una reacción catalizada por metionina adenosiltransferasa. SAM es un compuesto de alta energía que contiene un sulfonio capaz de donar un grupo metilo a una gran variedad de aceptores en reacciones catalizadas por metiltransferasas.

En el segundo paso de la transmetilación, por la donación del grupo metilo de la SAM se forma SAH como coproducto (Figura 2). Las metilaciones dependientes de SAM son esenciales para la biosíntesis de una variedad de componentes celulares (creatina, epinefrina, fosfatidilcolina), la modificación de macromoléculas (proteínas, ADN, ARN), la desintoxicación de xenobióticos (tioles, arsenito) y la inactivación metabólica de neurotransmisores (epinefrina, norepinefrina, dopamina) (3). Se estima que las reacciones de transmetilación en conjunto consumen el 95 % del SAM formado.

Finalmente, SAH es hidrolizado por adenosilhomocisteinasa (S-adenosilhomocisteína hidrolasa) formando adenosina y homocisteína (Figura 2). La adenosina es eliminada por adenosina desaminasa o adenosina quinasa mientras que la homocisteína generada es eliminada por remetilación o transulfuración (2, 5).

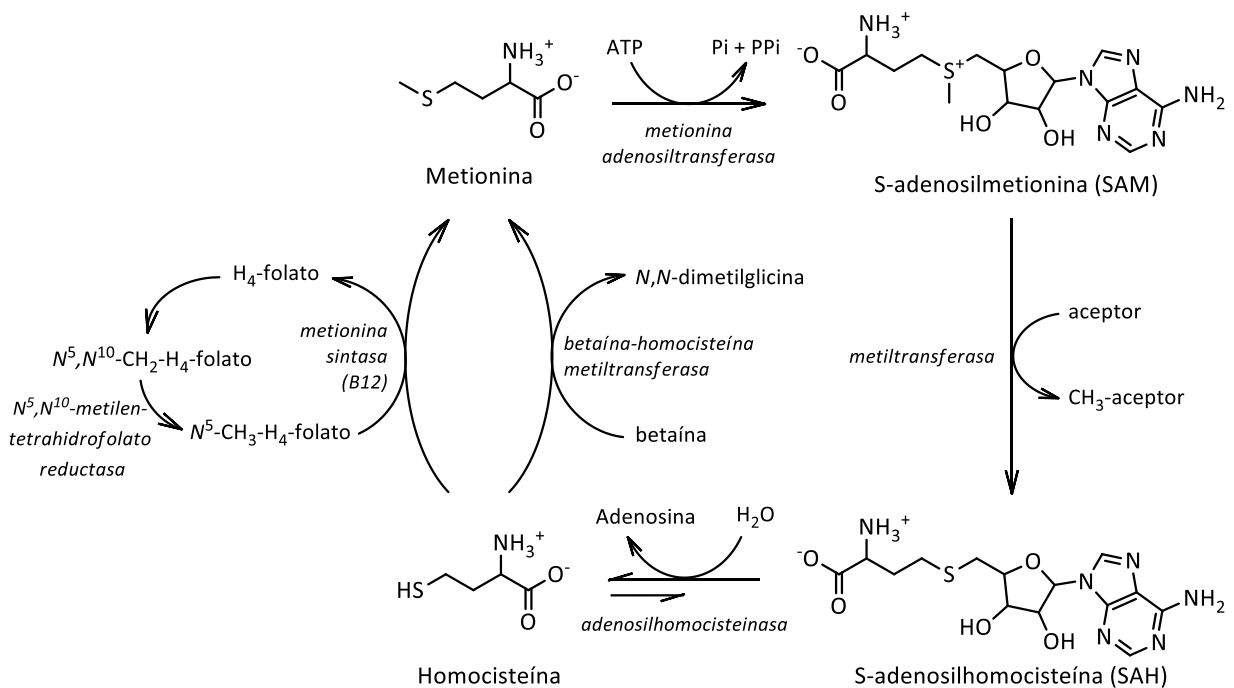


Figura 2. Transmetilación y remetilación. La transmetilación de metionina consiste en la formación de S-adenosilmetionina (SAM), catalizada por metionina adenosiltransferasa; la formación de S-adenosilhomocisteína (SAH), catalizada por una metiltransferasa; y la hidrólisis de SAH, catalizada por adenosilhomocisteinasa para formar homocisteína y adenosina. La homocisteína formada puede ser remetilada a metionina por dos reacciones, por la enzima metionina sintasa a partir de N⁵-metiltetrahidrofolato (N⁵-CH₃-H₄-folato) y por la enzima betaína-homocisteína metiltransferasa a partir de betaína.

2.1.2. Homocisteína

La homocisteína está ubicada en un punto importante para la regulación, teniendo cinco destinos posibles. Es capaz de sintetizar SAH por la reacción reversa de la adenosilhomocisteinasa, puede ser remetilada para formar metionina, puede β-sustituir a la serina para formar cistationina y agua (primer paso de la transulfuración) y a la cisteína para

formar cistationina y sulfuro de hidrógeno, o puede ser exportada desde la célula al plasma, lo que puede generar hiperhomocisteinemia.

Remetilación

La remetilación permite regenerar metionina utilizando nuevos grupos metilo, ya sean sintetizados en el ciclo del folato o grupos metilos preformados que provienen de la dieta. Biológicamente, éstas son las únicas reacciones de metilación que no utilizan SAM como dador de grupos metilo. De todas formas, los grupos metilo formados pueden ser transferidos posteriormente en metilaciones dependientes de SAM.

Los grupos metilo sintetizados en el ciclo del folato son transferidos a la homocisteína desde N^5 -metiltetrahidrofolato en una reacción catalizada por metionina sintasa (N^5 -metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa), una enzima presente en todos los tejidos que contiene metilcobalamina derivada de la vitamina B12, como cofactor (Figura 2). El grupo metilo de N^5 -metiltetrahidrofolato es sintetizado *de novo* en el ciclo del folato. El paso final de la síntesis de N^5 -metiltetrahidrofolato es la reducción irreversible de N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato que es catalizada por la flavoenzima N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa utilizando NADH como dador de electrones (Figura 2). Esta reacción está regulada por SAM y SAH, donde SAM inhibe la conversión de N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato a N^5 -metiltetrahidrofolato y SAH revierte la inhibición.

El otro dador de grupos metilo para la remetilación de homocisteína es la betaína. Esta metilación es catalizada por la betaína-homocisteína metiltransferasa, una metaloenzima que contiene zinc y se encuentra principalmente en el hígado (Figura 2). Esta enzima utiliza grupos metilos preformados de la betaína de la dieta o de la betaína que deriva de otros compuestos de la dieta como colina. Además, la betaína-homocisteína metiltransferasa es inhibida por su producto, N,N -dimetilglicina y por SAM.

Una pequeña proporción de la N,N -dimetilglicina generada se elimina en la orina pero la mayoría se convierte en sarcosina y glicina. Esta reacción es catalizada por dimetilglicina deshidrogenasa, una flavoproteína mitocondrial capaz de transferir una unidad carbonada a tetrahidrofolato para producir N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato. En suma, aunque el flujo de los grupos metilo por la vía de betaína-homocisteína metiltransferasa no dependa del folato ni de la vitamina B12, existe cierta comunicación entre los mecanismos de metilación. Es más, hay evidencia que sugiere que deficiencias de folato pueden ser parcialmente atenuadas con la ingesta de colina (fuente de betaína) y viceversa (8).

Transulfuración

La transulfuración de homocisteína a cisteína está catalizada por dos enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP): la cistationina β -sintasa (CBS) y la cistationina γ -liasa (CGL). La cistationina β -sintasa cataliza la condensación de homocisteína y serina para formar cistationina y agua. La cistationina es luego hidrolizada por cistationina γ -liasa para formar cisteína, α -cetobutirato y amonio (Figura 3). El α -cetobutirato es posteriormente catabolizado por descarboxilación oxidativa a propionil-CoA que ingresa al ciclo de Krebs al nivel de succinil-CoA.

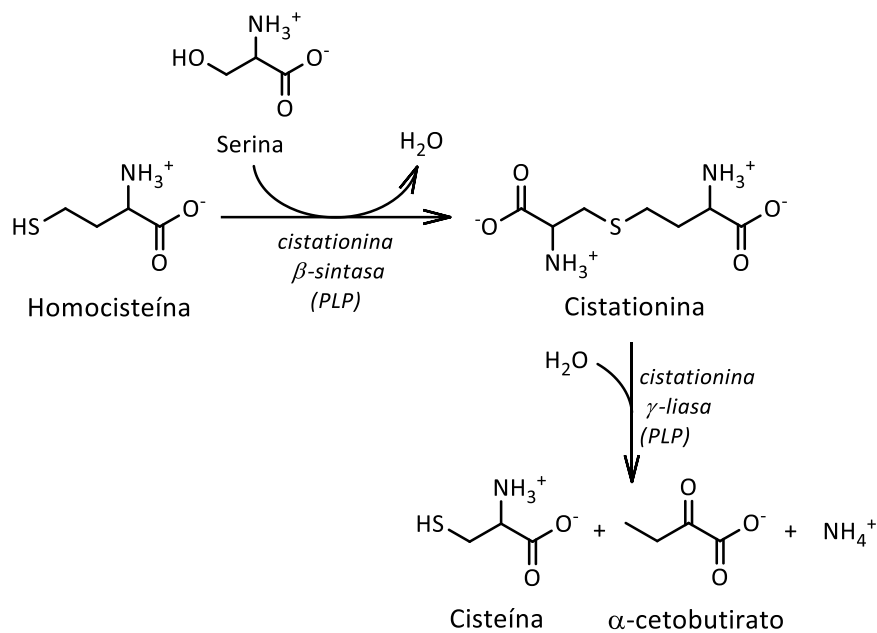


Figura 3. Transulfuración de homocisteína. La transulfuración consiste en la condensación de homocisteína y serina para formar cistationina y agua, y en la hidrólisis de cistationina para formar cisteína, α -cetobutirato y amonio. Estas reacciones son catalizadas por las enzimas cistationina β -sintasa y cistationina γ -liasa respectivamente.

Aunque en todas las células la transmetilación y la remetilación son posibles, la transulfuración está restringida a tejidos que tengan presente ambas enzimas, CBS y CGL, que se expresan en el hígado, riñón y cerebro (9). Los tejidos que carecen de estas enzimas requieren una fuente exógena de cisteína y deben exportar la homocisteína para que sea eliminada por otros tejidos.

Regulación de la remetilación y transulfuración

Podría considerarse que las vías de remetilación y transulfuración compiten por la homocisteína disponible. El destino de la homocisteína está regulado por diversos factores.

Un factor regulatorio es la concentración de homocisteína que a su vez depende de los parámetros cinéticos de las enzimas que participan en la remetilación y la transulfuración. Las K_M de las enzimas involucradas en la transulfuración son mayores que las K_M de las enzimas de la transmetilación y remetilación. Por ejemplo, la K_M de CBS es al menos un orden de magnitud mayor que las K_M de ambas metiltransferasas (2). Por lo tanto, la remetilación tenderá a ocurrir a velocidad constante mientras que la transulfuración podrá responder a cambios en la concentración de homocisteína.

Otro factor que determinará el destino de la homocisteína es la disponibilidad de grupos metilo. En una dieta pobre en grupos metilo lábiles es más probable que la homocisteína sea remetilada a que sea catabolizada. Por el contrario, frente a un exceso de grupos metilo la tasa de remetilación decrece. En el hígado, este cambio metabólico es regulado por el nivel celular de SAM. En primer lugar, la isoforma hepática de la metionina adenosiltransferasa es estimulada

por retroalimentación positiva por su producto, SAM. Es decir que el nivel hepático de SAM será elevado cuando la disponibilidad de metionina sea alta. En segundo lugar, SAM es un inhibidor alostérico de N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa y un activador alostérico de cistationina β -sintasa. En suma, en una dieta con exceso de metionina (rica en grupos metilo lábiles) se producirán altas concentraciones de SAM, éste estimulará la transulfuración mediante la activación de CBS e inhibirá la remetilación mediante la inhibición de N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa. En un escenario pobre en metionina, la formación de SAM decrece y se favorece la remetilación de la homocisteína que producirá metionina (2, 3, 10, 11).

Por último, el estrés oxidativo también podría ser clave en la regulación. La síntesis de cisteína en la vía de transulfuración es importante para sintetizar glutatión, una molécula crucial para la desintoxicación de peróxidos. En este sentido, el estrés oxidativo generado por oxidantes aumenta la transulfuración, aumentando también, la síntesis de glutatión, aunque no está claro el mecanismo molecular (3, 12).

Hiperhomocisteinemia

En adultos, la concentración normal de homocisteína en plasma es entre 5 y 15 μM . Cuando la concentración es mayor a 15 μM se considera que el paciente tiene hiperhomocisteinemia, que puede ser clasificada en moderada (de 15 a 30 μM), intermedia (de 30 a 100 μM) y severa (mayor a 100 μM) (13, 14). El aumento del nivel de homocisteína puede deberse a un aumento en la tasa de producción, es decir, transmetilación, a una disminución en la tasa de eliminación, ya sea por transulfuración o remetilación, o a una alteración en la captación y excreción del riñón.

La causa más común de hiperhomocisteinemia severa es la presencia de mutaciones en la CBS (15). Hasta la fecha se han identificado más de 160 mutaciones que están detalladas en *CBS mutation database* (<http://cbs.lf1.cuni.cz/index.php>). Además, una deficiencia en la vitamina B6 también puede afectar la transulfuración, porque las dos enzimas, cistationina β -sintasa y cistationina γ -liasa, dependen de PLP (16, 17). La segunda causa más común de hiperhomocisteinemia severa es la alteración en la actividad de N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolato reductasa que disminuye la remetilación.

Existen otras causas menos frecuentes como las deficiencias en folato o en vitamina B12. Por otro lado, la remetilación por metionina sintasa se bloquea en pacientes que poseen mutaciones que afecten tanto la enzima como la síntesis de metilcobalamina (2). Sorprendentemente, la betaína-homocisteína metiltransferasa es la única enzima del metabolismo de aminoácidos azufrados que hasta la fecha no se encuentra en la lista de mutaciones que generan hiperhomocisteinemia.

Debido a que la homocisteína plasmática se une a proteínas, la filtración en el riñón está limitada. De la homocisteína libre que es filtrada, solo 1-2 % es excretada, el resto es reabsorbido por el riñón. Esto significa que la excreción urinaria de homocisteína extracelular es mínima. Los valores normales se encuentran entre 3.5 y 9.8 $\mu\text{mol/día}$ (18). Un nivel alto de homocisteína en la orina indica una concentración muy alta de homocisteína en plasma como resultado de una mutación que altera el metabolismo.

La hiperhomocisteinemia ya sea hereditaria o adquirida se asocia a ciertas patologías como enfermedades cardiovasculares (14), enfermedades neurodegenerativas incluyendo Alzheimer, Parkinson, autismo y Huntington (19), y defectos en el tubo neural (20).

La aterosclerosis es la enfermedad cardiovascular más asociada al aumento de homocisteína. Sin embargo, no existe un mecanismo generalmente aceptado que explique cómo un nivel alto de homocisteína en plasma causa enfermedades vasculares. Además, la suplementación de folato y vitaminas B6 y B12 disminuye el nivel homocisteína pero no influye en el riesgo de estas enfermedades (21, 22). La relación causal entre homocisteína y enfermedades vasculares es un tema controversial. Una explicación es que la hiperhomocisteinemia no sea una causa sino que un biomarcador de otro factor de riesgo. Diversos estudios sugieren que la SAH plasmática es mejor indicador de enfermedades cardiovasculares que la homocisteína (23).

A su vez, el Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más vinculada a la hiperhomocisteinemia. En el Alzheimer, la suplementación de folato y vitaminas B6 y B12 reduce el nivel de homocisteína y además disminuye la reducción de neuronas. Esto se debe a que en esta enfermedad la hiperhomocisteinemia es causada por las deficiencias de folato, vitamina B12 y posiblemente vitamina B6 (24, 25).

Asimismo, para disminuir las fallas en el tubo neural se recomienda la suplementación periconcepcional de ácido fólico (20, 26). Además, la hiperhomocisteinemia se vincula a ciertos tipos de cáncer, osteoporosis, trombosis venosa profunda, entre otras enfermedades.

2.1.3. Cisteína

La cisteína es un precursor de la síntesis de proteínas y centros ferrosulfurados, así como de otros metabolitos importantes. Entre ellos se encuentran GSH, coenzima A, taurina y azufre inorgánico, incluyendo sulfuro de hidrógeno. El GSH es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina que entre otras funciones actúa como reservorio de cisteína. La γ -glutamil transpeptidasa hidroliza GSH formando el dipéptido de cisteína y glicina que puede ser degradado por dipeptidasas liberando cisteína al plasma (2).

La cisteína proveniente de la vía de transulfuración y de la dieta, puede ser degradada por reacciones de desulfuración y de oxidación. En las reacciones de desulfuración se obtienen productos en un estado de oxidación bajo, azufre sulfano y sulfuro de hidrógeno (H_2S), que pueden ser oxidados a sulfato. En las reacciones de oxidación, el tiol de la cisteína se oxida a cisteínasulfinato, de la cual se produce taurina y sulfato en una proporción 2:1. Los productos del catabolismo de cisteína, taurina y sulfato, son luego excretados en la orina (Figura 4) (27).

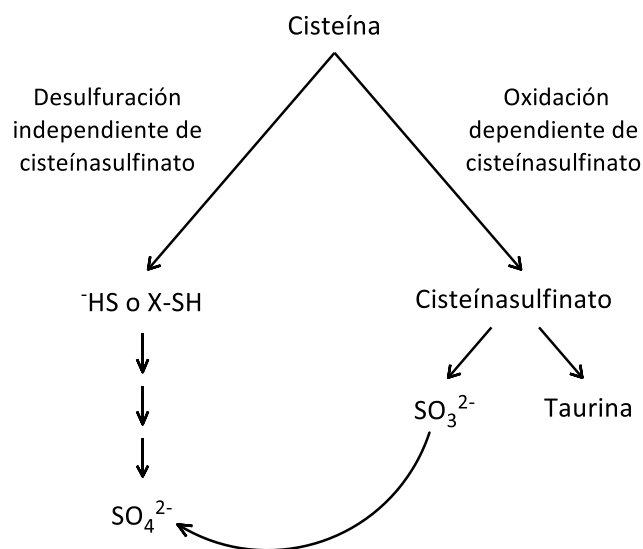


Figura 4. Metabolismo del azufre de la cisteína. La cisteína es catabolizada por reacciones de desulfuración y oxidación para formar los productos finales sulfato (SO_4^{2-}) y taurina. *Esquema adaptado de (27).*

Desulfuración independiente de cisteínasulfinato

La desulfuración de la cisteína para formar H_2S o azufre sulfano es catalizada por la cistationina β -sintasa o por la cistationina γ -liasa. También es catalizada por aminotransferasas en conjunto con 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (28). Estas reacciones son importantes no solo para el catabolismo de cisteína, sino que también para la producción de azufre reducido en los estados de oxidación 0 y -2.

Cistationina β -sintasa

La CBS es conocida por catalizar el primer paso de la transulfuración donde a partir de serina y cisteína se forma cistationina y se desprende agua (reacción [1] de Figura 5). Sin embargo, en condiciones fisiológicas existe una reacción alternativa donde la cisteína toma el lugar de la serina obteniéndose cistationina y H_2S (reacción [2] de Figura 5) (29).

La reacción alternativa es capaz de consumir homocisteína y producir cistationina efectivamente. A partir de esta última se puede formar cisteína en la segunda reacción de la vía de transulfuración catalizada por CGL. Sin embargo, en estas condiciones donde la CBS cataliza la desulfuración de cisteína, la cisteína actúa como sustrato de la primera reacción de transulfuración y como producto de la segunda, por lo que no hay producción neta de cisteína.

La CBS cataliza reacciones adicionales que producen H_2S a partir de cisteína. Éstas son la sustitución β de cisteína por agua para formar serina (reacción [3] de Figura 5) y la sustitución β de cisteína por una segunda molécula de cisteína para producir lantionina (reacción [4] de Figura 5). A niveles normales de homocisteína (10 μM), la reacción [3] representa el 2.6 % del H_2S

formado por CBS mientras que la reacción [4] el 1.6 %. La reacción [2] es la más eficiente y representa el 95.8 % (30).

Recientemente se observó que la CBS es capaz de catalizar la formación de persulfuro de cisteína (CysSSH), piruvato y amonio a partir de cistina (CysSSCys) (reacción [5] de Figura 5). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, la actividad de CBS en esta reacción es despreciable en comparación con la suma de las actividades en las reacciones que producen H₂S (31, 32).

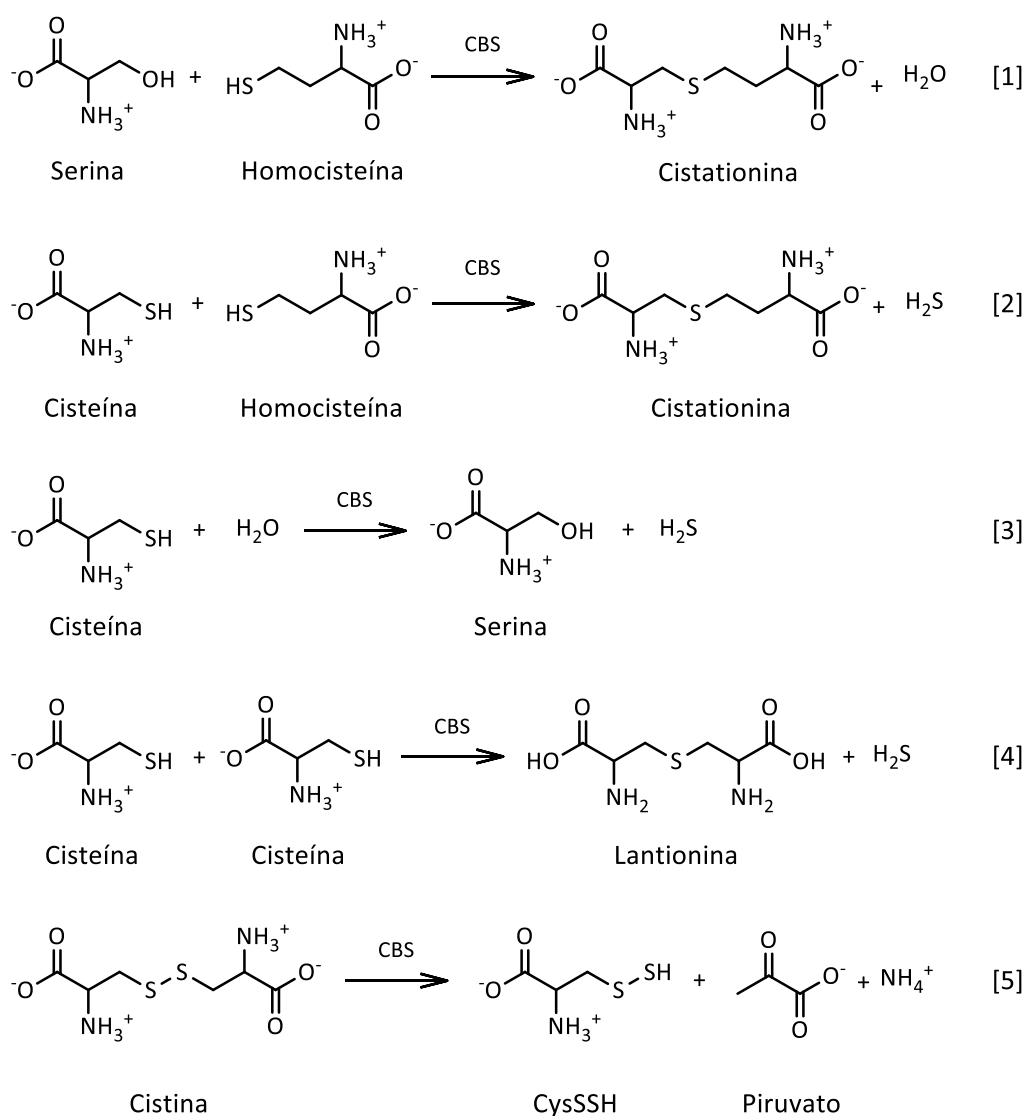


Figura 5. Reacciones catalizadas por CBS. La CBS cataliza [1] el primer paso de la vía de transulfuración, [2-4] la formación de H₂S y [5] la producción de persulfuro de cisteína (CysSSH).

Cistationina γ -liasa

La principal función de la CGL, también abreviada CSE, es catalizar la segunda reacción de la transulfuración, donde a partir de cistationina se obtiene cisteína, α -cetobutirato y amonio (reacción [1] de Figura 6). La CGL además cataliza reacciones secundarias que producen H₂S

utilizando cisteína y/o homocisteína como sustratos. Teniendo en cuenta los parámetros cinéticos de la CGL humana, se hicieron simulaciones que predijeron que la eliminación α,β de la cisteína (reacción [2] de Figura 6) formaría el 70 % del H_2S formado por CGL y la eliminación α,γ de homocisteína (reacción [3] de Figura 6) el 29 % (33). Por su parte, las sustituciones β o γ para ambos sustratos no tienen relevancia a las concentraciones fisiológicas. La CGL también cataliza la desulfuración de cistina y homocistina. La eliminación α,β de cistina resulta en la formación de persulfuro de cisteína, piruvato y amonio (reacción [4] de Figura 6). En la eliminación α,γ de homocistina (HcySSHcy) se produce persulfuro de homocisteína (HcySSH), α -cetobutirato y amonio (reacción [5] de Figura 6) (31–33).

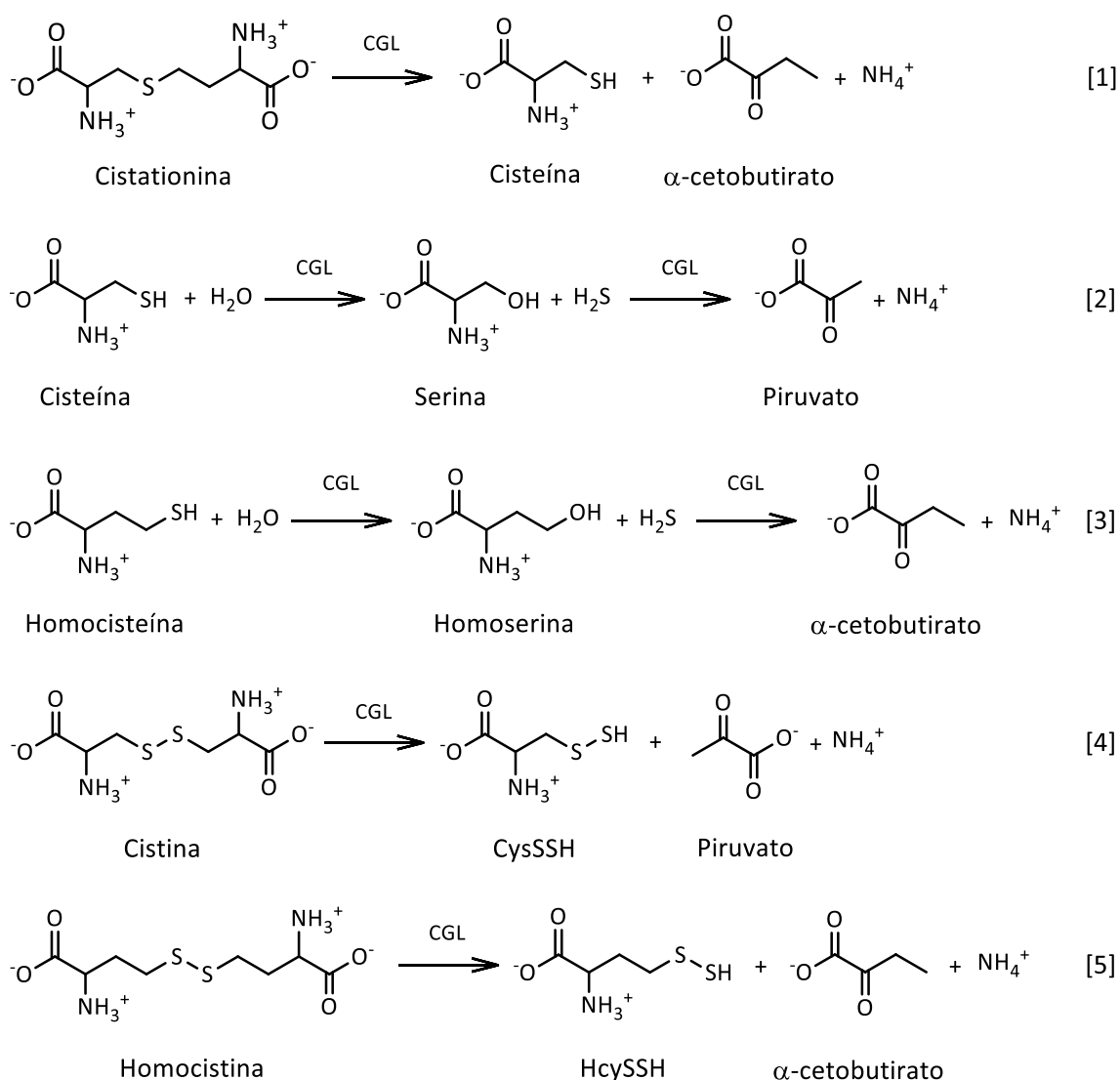


Figura 6. Principales reacciones catalizadas por CGL. [1] La reacción canónica de la CGL es el segundo paso de la vía de transulfuración. Las principales reacciones secundarias de CGL que sintetizan H_2S son [2] la eliminación α,β de cisteína y [3] la eliminación α,γ de homocisteína. Además, cataliza la producción de [4] persulfuros de cisteína (CysSSH) a partir de cistina y [5] persulfuros de homocisteína (HcySSH) a partir de homocistina.

En lo que respecta a la formación de H_2S , simulaciones cinéticas que asumen que la desulfuración de cisteína solo ocurre por las reacciones catalizadas por CBS y CGL sugieren que

el 75 % de la desulfuración es catalizada por CBS mientras que el 25 % por CGL (30). Se debe tener en cuenta que en estas simulaciones se asumieron altas concentraciones de SAM que activa completamente la CBS, por lo que su contribución podría estar sobrestimada. Además se asumió la misma concentración para CBS y CGL, cuando en realidad la expresión de cada enzima varía en los distintos tejidos.

Se demostró que existen diferencias significativas entre los tejidos en cuanto a la contribución de CBS y CGL, y en cuanto a su capacidad para producir H₂S (9). Por ejemplo, en el cerebro el alto nivel de expresión de CBS en relación con CGL sugiere que la primera enzima es la principal contribuyente. Esto es consistente con que la concentración de H₂S se mantuvo inalterada en experimentos con ratones con CGL silenciada. En estos experimentos el nivel de H₂S en suero y la tasa de producción de H₂S en la aorta y el corazón disminuyeron significativamente, sugiriendo que la CGL es la principal fuente de H₂S en los tejidos periféricos (34). No obstante, en estos ratones, la contribución de CBS podría estar subestimada por dos razones, en primer lugar, en la mayoría de los ensayos se utilizó solo cisteína como sustrato y no homocisteína que es el otro sustrato de la CBS. En segundo lugar, al silenciar el gen que codifica para CGL, se inhibe la síntesis de cisteína por la vía de transulfuración y por lo tanto se disminuye la disponibilidad de uno de los sustratos de CBS. Es decir que el silenciamiento de CGL afecta a la producción de H₂S por parte de CGL pero también por parte de CBS. A su vez, la disrupción del gen de CBS lleva a la acumulación de homocisteína, que es un sustrato de CGL. Dada la complejidad y la variedad de reacciones capaces de generar H₂S catalizadas por CBS y CGL, se debe prestar atención al diseño del experimento y a la interpretación de resultados. Se debe comparar la formación de H₂S en presencia de cisteína versus cisteína y homocisteína para tener un mejor estimado de la contribución de cada enzima (35).

Aminotransferasa y 3-mercaptopiruvato azufretransferasa

Si bien la cisteína no es buen dador del grupo amino, puede sufrir transaminación formando el cetoácido correspondiente 3-mercaptopiruvato. A su vez, el 3-mercaptopiruvato puede ser sustrato de la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (3-MST) sintetizando H₂S (Figura 7) (27, 36).

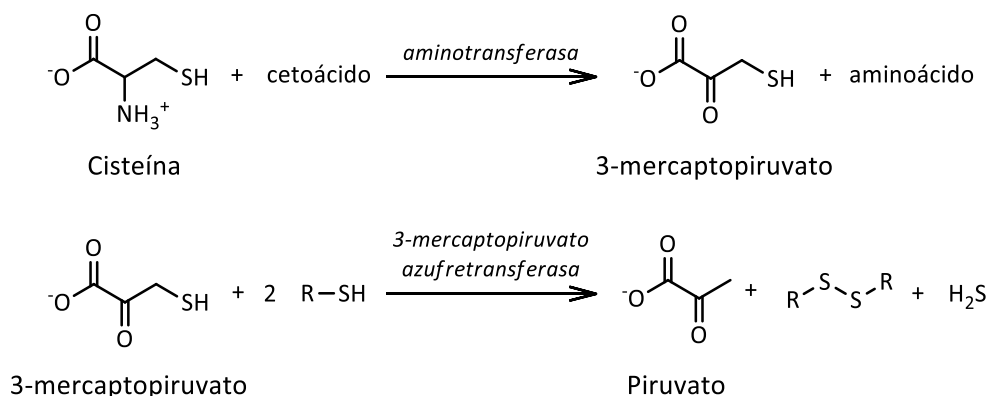


Figura 7. Transaminación de cisteína y 3-mercaptopiruvato azufretransferasa. La transaminación de cisteína forma 3-mercaptopiruvato que a su vez produce H₂S en una reacción catalizada por 3-mercaptopiruvato azufretransferasa.

Es decir que a partir de la transaminación de cisteína se puede formar H₂S. De hecho, hay evidencia de que la transaminación de cisteína ocurre *in vivo* (37–39). Por su parte, la 3-MST tiene roles fisiológicos como antioxidante, antídoto de cianuro (40) e incluso podría jugar un rol importante en el sistema nervioso central (41). En el cerebro el H₂S es sintetizado principalmente por estas enzimas y no por la CBS como se creía (42). Además, son las principales productoras de H₂S en las neuronas periféricas (43).

Sulfuro de hidrógeno y su oxidación

En el pasado, el H₂S se consideraba tóxico para organismos aeróbicos; hoy en día, se lo considera una molécula de señalización capaz de modular una variedad de procesos celulares. Sus funciones incluyen neuromodulación, regulación del tono vascular, inflamación, energética celular, regulación de canales iónicos y apoptosis (44–48).

Las células pueden almacenar sulfuro como azufre sulfano, el otro producto de la desulfuración de la cisteína, donde el azufre se encuentra unido de manera covalente únicamente a otro átomo de azufre o a protones ionizables. Algunos ejemplos de azufre sulfano son, persulfuros (RSSH), tiosulfato (S₂O₃²⁻), hidropolisulfuros (RS_nH), polisulfuros (RS_nR, n > 2) y azufre elemental (S₈) (35, 49).

En cuanto a la reactividad del H₂S, se ha observado su capacidad para producir persulfuros. Los produce en reacciones con disulfuros de bajo peso molecular y disulfuros mixtos en proteínas por un mecanismo concertado. También se forman persulfuros en la reacción entre H₂S y el ácido sulfénico de la albúmina (50). El H₂S además reacciona con peroxinitrito. La reacción comienza con una sustitución nucleofílica bimolecular donde el HS⁻ ataca al peroxinitrito (ONOOH) y produce HSOH y nitrito (NO₂⁻). En esta oxidación se observa un producto amarillo con un pico de absorbancia a 408 nm y al menos uno de los productos parece ser HSNO₂ o HSONO (51). El sulfuro de hidrógeno también reacciona con peróxido de hidrógeno, hipoclorito y cloramina de taurina (52). Sin embargo, debido a la concentración estimada *in vivo* (~15 nM) (53), los efectos protectores del H₂S en células expuestas a oxidantes (54, 55) no parecen suceder por la reacción directa entre el H₂S y los oxidantes.

El catabolismo del sulfuro (HS⁻ o H₂S) ocurre fundamentalmente en la mitocondria. El H₂S sufre reacciones de oxidación rindiendo sulfato y tiosulfato como productos finales. Éste es el principal sistema de detoxificación de H₂S. Además, los electrones liberados en este proceso son transferidos a la cadena respiratoria para generar energía (56). En la primera reacción, la sulfuroquinona oxidorreductasa (SQR) oxida H₂S a azufre sulfano por el ataque a un disulfuro interno de la enzima de manera de formar un persulfuro intermediario (SQR-SSH) (57). Si bien esta reacción es generalmente aceptada, no hay un consenso en cuanto al aceptor del azufre del persulfuro de SQR. Se ha postulado al GSH como aceptor para formar persulfuro de glutatión (GSSH) (57, 58) y al sulfito para formar tiosulfato (59). El orden de las siguientes reacciones dependerá de cuál es el aceptor preferencial. El GSSH puede ser oxidado por la azufre dioxigenasa (SDO) a GSH y sulfito. A su vez, dependiendo del aceptor, la tiosulfato azufretransferasa (rodanasa) cataliza la formación de tiosulfato y GSH a partir de sulfito y GSSH, o la reacción inversa. Por último, el sulfito es oxidado a sulfato por la sulfito oxidasa (SO) (57, 60). El sulfato formado puede o ser excretado por la orina o activado a 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), que funciona como dador de sulfato en la formación de ésteres de sulfato (27).

Oxidación dependiente de cisteínasulfinato

Además de las vías de desulfuración de cisteína, los mamíferos catabolizan cisteína en vías oxidativas dependientes de cisteínasulfinato (Figura 8). En primer lugar, el tiol de la cisteína es oxidado a ácido sulfínico a expensas de oxígeno para formar cisteínasulfinato. Esta reacción es catalizada por cisteína dioxigenasa (CDO). La cisteínasulfinato es luego catabolizada por dos vías paralelas. Por un lado, la cisteínasulfinato descarboxilasa la descarboxila a hipotaurina que es posteriormente oxidada a taurina. Por otro lado, la cisteínasulfinato puede ser transaminada con α -cetoglutarato en una reacción unidireccional donde se forma β -sulfinilpiruvato. Éste se disocia espontáneamente en piruvato y dióxido de azufre, que es hidratado a sulfito *in vivo*. Al igual que en las reacciones de desulfuración, el sulfito es oxidado a sulfato por sulfito oxidasa (27).

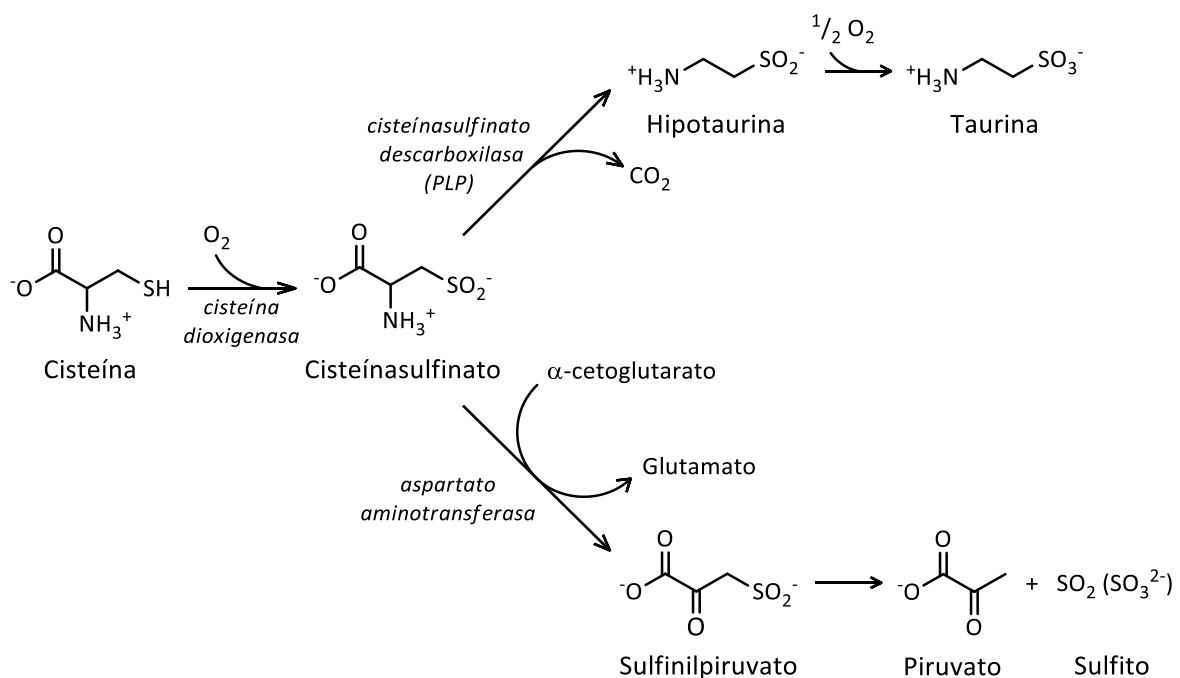


Figura 8. Vías oxidativas dependientes de cisteínasulfinato. La cisteína es oxidada a cisteínasulfinato por cisteína dioxigenasa. La cisteínasulfinato es catabolizada por dos vías paralelas para producir taurina y sulfito; este último es capaz de oxidarse a sulfato.

Oxidación de cisteína a cisteínasulfinato

La regulación de las vías dependientes de cisteínasulfinato se da principalmente en el primer paso donde la cisteína dioxigenasa oxida la cisteína para formar cisteínasulfinato. La CDO se expresa a altas concentraciones en el hígado y a menores concentraciones en los riñones, pulmones, páncreas y tejido adiposo en ratones y ratas (27). Es una de las enzimas metabólicas más reguladas capaces de responder a la dieta. La concentración de CDO, tanto hepática como adiposa, depende de la concentración de cisteína; se bloquea la ubiquitinación de CDO y por lo tanto disminuye la degradación proteasomal permitiendo la acumulación de

CDO en la célula (61–63). La actividad de CDO también está regulada por la concentración de cisteína. Cuando hay escasez de cisteína, la actividad disminuye con el fin de conservar la cisteína existente. Por el contrario, cuando la cisteína abunda, la actividad aumenta rápidamente y la enzima cataboliza la cisteína para prevenir citotoxicidad. Los cambios en la actividad enzimática pueden observarse a los minutos de variar la disponibilidad de cisteína mientras que cambios en la concentración de la enzima se perciben a las pocas horas. A su vez, la especificidad de la cisteína dioxigenasa por cisteína como su único sustrato es muy alta (64).

Metabolismo de cisteínasulfinato

La cisteínasulfinato formada es metabolizada por dos enzimas, la cisteínasulfinato descarboxilasa que produce hipotaurina, que a su vez es posteriormente oxidada a taurina, y aspartato aminotransferasa que forma piruvato y sulfito (Figura 8). El destino de cisteínasulfinato dependerá de la afinidad de cada una de ellas por el sustrato y de la concentración de ambas enzimas en un tejido dado (27).

2.2. Cistationina β -sintasa

La enzima cistationina β -sintasa (EC: 4.2.1.22) es la única enzima dependiente de PLP que posee un grupo hemo identificada hasta ahora. Tiene un rol central en el metabolismo de aminoácidos azufrados. Cataliza el primer paso de la vía de transulfuración donde se consume homocisteína. Alteraciones en la CBS generan desórdenes metabólicos que ocasionan el aumento de la concentración de homocisteína en plasma generando hiperhomocisteinemia, que se asocia a diversas patologías como se mencionó previamente. La CBS se encuentra en múltiples órganos como el cerebro, riñón, hígado, íleon, útero, placenta e islotes pancreáticos. La cuantificación de CBS en tejidos de ratón demuestra que la enzima se expresa mayormente en el cerebro y riñón (9, 65). Dentro de las células, la CBS se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (66). En este trabajo, a no ser que se especifique, CBS hace referencia a la enzima humana.

En la transulfuración, la CBS cataliza la condensación de serina y homocisteína para formar cistationina y agua (reacción [1] de Figura 5). No obstante, no es la única reacción que cataliza; como se explicó anteriormente, la CBS también cataliza cuatro reacciones adicionales. Tres de estas reacciones rinden H_2S (reacciones [2-4] de Figura 5). Entre éstas, la formación de H_2S a partir de cisteína y homocisteína representa el 95.8 % del H_2S formado por esta enzima, mientras que la contribución de las reacciones restantes es despreciable. La cuarta reacción adicional es la formación de persulfuro de cisteína, piruvato y amonio a partir de cistina (reacción [5] de Figura 5). La actividad enzimática en esta reacción es cuantitativamente despreciable.

La proporción del uso de serina versus cisteína como sustrato de la CBS dependerá de la concentración tisular de cada sustrato. Al ser la serina más abundante que la cisteína dentro de la célula, es de esperar que la serina sea el sustrato de elección (30). En un experimento *in vitro* se observó que al imitar las concentraciones de serina, cisteína y homocisteína del hígado de ratón y utilizando CBS humana, el 5 % de la cistationina formada provenía de la cisteína (29). Al aumentar las concentraciones de los sustratos, la reacción alternativa representó hasta un 44 % de la cistationina formada. Es decir que en estos experimentos se vio que la producción de H_2S a partir de cisteína y homocisteína *in vivo* es posible y que la principal reacción para el primer paso de la transulfuración posee a la serina como sustrato. Otros investigadores realizaron

simulaciones cinéticas para evaluar la contribución de cada sustrato en la producción de cistationina (30). Asumiendo las concentraciones fisiológicas para serina, cisteína y homocisteína, predijeron que la reacción alternativa con cisteína como sustrato contribuye ~56 % de la cistationina formada. Esto significa que la desulfuración de cisteína contribuiría en gran medida en la vía de transulfuración y que sería un productor significativo de H₂S. Aunque la predicción (56 %) sea muy superior al valor medido experimentalmente (5 %) y sea necesario seguir investigando la contribución de cada sustrato, se puede afirmar que en condiciones fisiológicas la CBS produce H₂S a partir de cisteína.

2.2.1. Estructura modular

La CBS humana está formada por 551 aminoácidos y tiene un peso molecular de ~63 kDa por subunidad (67). La enzima existe en múltiples estados de oligomerización, desde dímero hasta hexadecámero, aunque no han sido purificados y caracterizados por separado (68). Varios experimentos sugieren que la enzima funcional forma homotetrámeros (69, 70), aunque no se ha podido confirmar mediante cristalografía debido a que la proteína se agrega. Otros autores por su parte sugieren que la enzima salvaje podría formar homodímeros (71). Todas las subunidades son iguales (72) y cada una de ellas une un grupo hemo y un PLP (73). Cada monómero puede además unir SAM, que tiene una función activadora. La CBS presenta una organización modular (74) con tres dominios, el dominio N-terminal de unión al hemo (residuos 1-70), el dominio catalítico que posee PLP (residuos 71-413) y el dominio regulatorio C-terminal capaz de unir el activador alostérico SAM (residuos 414-551) (Figura 9).

El dominio N-terminal de unión al hemo, compuesto por 70 aminoácidos, no se asemeja a la secuencia primaria ni a la estructura terciaria de otras hemoproteínas. Es más, se desconoce cuándo apareció el antecesor evolutivo (75). El hemo presente en la CBS humana se observa en otros organismos eucariotas pero no en todos, por ejemplo, las CBS de *Trypanosoma cruzi* y de levaduras lo carecen (75–77). El hemo está hexacoordinado, la quinta posición de coordinación está ocupada por un tiolato y la sexta por un ligando nitrogenado (78). Más específicamente, el hemo está coordinado por el tiolato de Cys52 y el átomo N_{ε2} de His65 (79). Al hemo se le han adjudicado diferentes funciones como estructural y sensor redox, pero su rol en la CBS sigue siendo un tema controversial.

El dominio central es la porción conservada de la proteína. Es similar a otros miembros de la familia β de las enzimas dependientes de PLP, como O-acetilserina sulfurohidrolasa, treonina desaminasa, triptofano sintasa y aminociclopropano desaminasa (80, 81). El cofactor PLP se ubica a ~20 Å del hemo (82) en una hendidura entre los dominios N- y C-terminal, siendo el acceso al sitio activo angosto. La coenzima interactúa con el grupo amino de Lys119 a través de una base de Schiff formando una “aldimina interna” (83) y forma enlaces de hidrógeno con los residuos que lo rodean: el nitrógeno del anillo de piridina con un oxígeno de Ser349 y el hidroxilo 3' con un nitrógeno de Asn149. Los residuos 256-260 forman una red de enlaces de hidrógeno con la mitad del fosfato del PLP, anclando el cofactor a la proteína. Además, la carga del grupo fosfato está compensada por el polo positivo del dipolo de una α-hélice (79).

0	MPSETPQAEV	GPTGCPHRSG	PNSAKGSLEK	GSPEDKEAKE	PLWIRPDAPS	RCTWQLGRPA
60	SESPHHTTAP	AKSPKILPDI	LKKIGDTPMV	RINKIGKKFG	LKCELLAKCE	FFNAGGSVKD
120	RISLRMIEDA	ERDGLKPGD	TIIEPTSGNT	GIGLALAAAV	RGYRCIIVMP	EKMSSEKVDV
180	LRALGAEIVR	TPTNARFDSP	ESHVGVAVRL	KNEIPNSHIL	DQYRNASNPL	AHYDTTADEI
240	LQQCDGKLDL	LVASVGTGGT	ITGIARKLKE	KCPGCRIGV	DPEGSILAEF	EELNQTEQTT
300	YEVEGIGYDF	IPTVLDRTVV	DKWFKSNDEE	AFTFARMLIA	QEGLLCGGSA	GSTVAVAVKA
360	AQELQEQRC	VVILPDSVRN	YMTKFLSDRW	MLQKGFLKEE	DLTEKKPWWW	HLRVQELGLS
420	APLTVLPTIT	CGHTIEILRE	KGFDQAPVVD	EAGVILGMVT	LGNMLSSLLA	GKVQPSDQVG
480	KVIYKQFKQI	RLTDTLGRLS	HILEMDHFAL	VVHEQIQYHS	TGKSSQROMV	FGVVTAIDLL
540	NFVAAQERDQ	K				

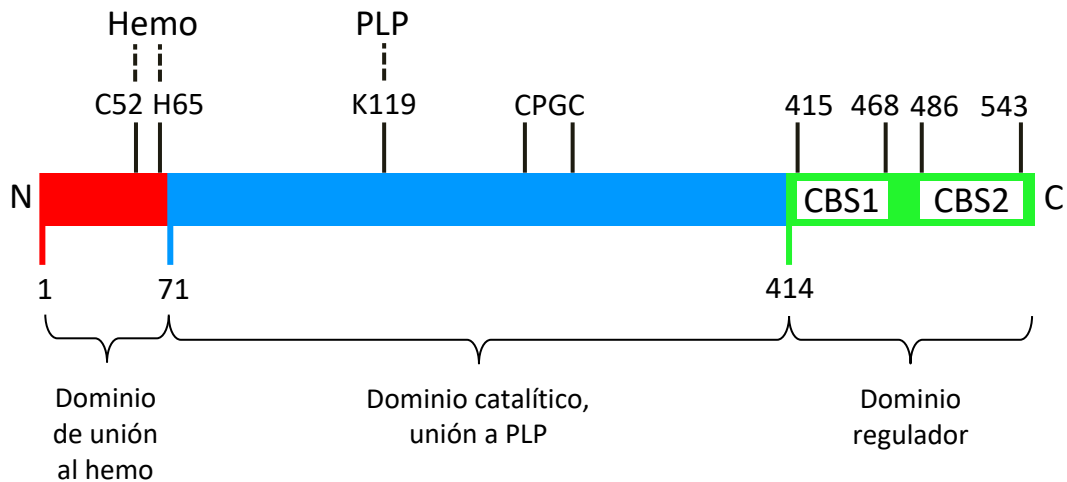


Figura 9. Secuencia aminoacídica y estructura modular de la CBS. La CBS está compuesta por tres dominios: de unión al hemo (rojo), catalítico y de unión a PLP (azul), y regulador (verde). Se resaltan los ligandos del hemo, Cys52 y His65, el residuo que forma la base de Schiff con PLP, Lys119, el motivo CPGC y los dominios CBS. Esquema modificado de (81, 84).

El dominio C-terminal tiene un rol regulatorio, contiene una región autoinhibitoria que al unirse a SAM se desplaza del sitio activo y la actividad de la enzima aumenta. En este dominio se identificó un motivo también presente en otras proteínas al que se denominó “dominio CBS”. Los dominios CBS no tienen similitud en su secuencia sino en el plegamiento, poseen una estructura secundaria β - α - β - α . La CBS humana presenta dos dominios CBS: CBS1, una secuencia hidrofóbica que abarca los residuos 415-468 (85), y CBS2, que involucra los residuos 486-543 (Figura 9) (86). Los motivos CBS siempre se encuentran en pares fuertemente asociados formando “módulos de Bateman” (87).

En el estado basal de la CBS, los módulos de Bateman de cada monómero distan entre sí y no interactúan, se ubican en la entrada del sitio catalítico de la subunidad complementaria impidiendo la entrada de los sustratos. En ausencia de SAM, el dominio C-terminal regulador interactúa con el centro catalítico a través de interacciones hidrofóbicas (residuos del motivo CBS2 con residuos del centro proteico) y de enlaces de hidrógeno (residuos del motivo CBS1 con residuos en la entrada de la cavidad catalítica). Entre los dominios CBS existen dos cavidades (sitios S1 y S2) que representan dos posibles sitios de unión a SAM. En la conformación basal, la cavidad S1 es ocluida por la presencia de elementos del centro catalítico y es ocupada por residuos hidrofóbicos voluminosos. Contrariamente, el sitio S2 está expuesto.

En los últimos años se han publicado estructuras correspondientes a la CBS de cadena completa con pequeñas mutaciones que han permitido elaborar una hipótesis acerca del cambio estructural vinculado a la unión de SAM. Partiendo de la CBS en su conformación basal, una molécula de SAM se une al sitio S2 expuesto. La acomodación de SAM en este sitio desencadena una rotación de los motivos CBS1 y CBS2 sin afectar los elementos de la estructura secundaria. Como consecuencia de la rotación, las interacciones entre el módulo de Bateman y el centro catalítico se debilitan y/o rompen ocasionando el alejamiento del módulo de Bateman y liberación de la entrada de la cavidad catalítica. Aunque en esta situación el sitio S1 quede accesible al solvente, SAM no ocupa esta cavidad. La liberación de SAM del sitio S2 promovería el cambio conformacional que retorna la enzima al estado basal (69, 88, 89).

La estimulación por SAM puede ser simulada por la desnaturalización térmica de la CBS nativa, ya que el calor desnaturaliza el dominio regulatorio irreversiblemente (90). A su vez, la unión de SAM al dominio C-terminal altera propiedades de unión del hemo. El hemo en estado reducido es capaz de unir monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (NO•) resultando en una enzima con actividad catalítica inhibida. La presencia de SAM aumenta la afinidad del hemo por CO y NO• y como consecuencia disminuye de la actividad (91).

Entre el dominio catalítico y el dominio regulatorio existe un sitio hipersensible que conduce a la proteólisis limitada de la enzima de cadena completa, generando un “núcleo activo” (residuos aminoacídicos 40-413). La proteólisis genera alteraciones en la actividad específica de la enzima y en su estado de oligomerización. El núcleo activo tiene alrededor del doble de actividad que la enzima de cadena completa y forma dímeros con monómeros iguales de 45 kDa. Esta enzima une los cofactores hemo y PLP, pero no es activada por SAM (92), ya que carece del dominio regulador.

La CBS de cadena completa tiende a agregarse, por lo que su estudio resulta difícil. Para facilitar los experimentos, se puede utilizar la CBS humana trunca recombinante que no se agrega. La enzima trunca (residuos 1-413) se parece al núcleo activo, ya que ~140 residuos del extremo C-terminal, incluyendo los dominios CBS, están ausentes (Figura 10). La CBS trunca es más activa que la enzima salvaje y forma homodímeros cuyas subunidades tienen un peso molecular de 45 kDa (93). Al igual que el núcleo activo, la enzima trunca une un hemo y un PLP por subunidad (79). Además, debido a la ausencia del dominio regulador, la actividad catalítica no es alterada ni por la presencia de SAM ni por la exposición al calor (70). A su vez, en la enzima trunca, la afinidad del hemo ferroso por CO y NO• resulta indiferente a la presencia de SAM (91).

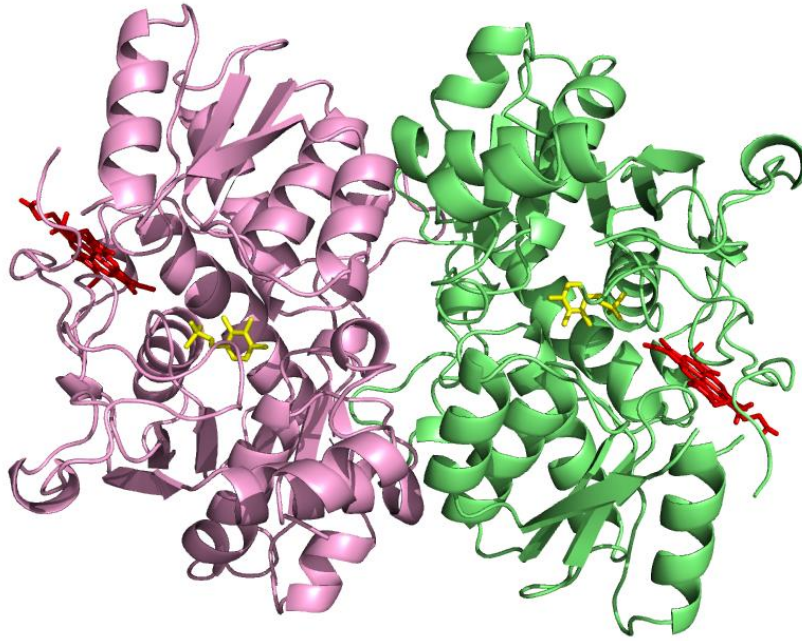


Figura 10. CBS trunca. La enzima trunca es un homodímero que contiene un grupo hemo (rojo) y un PLP (amarillo) por subunidad. Cada monómero (violeta y verde) está formado por el dominio N-terminal y el dominio catalítico pero carecen del dominio regulador. *La imagen fue creada con The PyMOL Molecular Graphics System 1.3 y la información se obtuvo del RCSB Protein Data Bank (código 1JBQ) (94).*

La CBS de cadena completa contiene once cisteínas de las cuales dos son accesibles al solvente, Cys15 y Cys431, ubicadas en el dominio de unión al hemo y el dominio regulador respectivamente. La CBS trunca por lo tanto posee diez cisteínas (68). En la estructura cristalográfica de la CBS trunca se observa un par de cisteínas separadas por dos residuos, uno de los cuales es prolina. Este motivo no guarda relación estructural con los dominios tioredoxina. En la CBS este motivo consiste en la secuencia C₂₇₂PGC₂₇₅ que se ha observado en dos estados, como disulfuro (79) y ditiol (82). En la enzima trunca, este par de cisteínas se ubica en la superficie, mientras que en la enzima de cadena completa no es accesible al solvente (68). En cuanto a su conservación, el motivo CPGC se encuentra en otras CBS de mamíferos que contienen hemo pero no está presente en especies más distantes que carecen de hemo (79). A diferencia del motivo CPGC, se ha reportado que la Cys346, también ubicada en el dominio catalítico, podría funcionar como un sensor redox en condiciones de estrés oxidativo, ya que esta cisteína puede ser oxidada y posteriormente glutationilada por GSH (95). Esta modificación postraduccional explica por qué la vía de transulfuración aumenta en condiciones de estrés oxidativo (12).

2.2.2. Mecanismo catalítico

Por lo general, los espectros en el UV-visible y de fluorescencia proporcionan información sobre los intermediarios catalíticos de las reacciones de enzimas dependientes de PLP. Sin embargo, el hemo de la CBS humana domina el espectro de absorción de la enzima dificultando la visualización de los intermediarios unidos a PLP. Por esta razón, los estudios cinéticos en un

principio se enfocaron en la CBS de levadura, donde el PLP es el único contribuyente en el espectro visible. Para poder estudiar el mecanismo de reacción de la CBS humana, se construyó una variante sin los 69 aminoácidos N-terminales, es decir una mutante sin hemo (96).

La variante sin hemo, que mostró ~40 % de actividad de la enzima salvaje, permitió por primera vez observar directamente los intermediarios unidos a PLP (Figura 11). La adición de serina resulta en la formación de una aldimina externa. Esta última es sometida a la desprotonación en el C_α y a la eliminación para formar un intermediario aminoacrilato. El ciclo catalítico finaliza con el ataque nucleofílico del tiolato de la homocisteína al aminoacrilato y la reprotonación del C_α generando la aldimina externa de cistationina. Los máximos de absorción asignados para cada intermediario se observan en la Figura 11 (81, 96).

Tanto la enzima trunca como la de cadena completa, tienen una K_M alta para homocisteína, en el rango de milimolar, mientras que la concentración intracelular de este sustrato está en el rango de micromolar. La actividad de la CBS es sensible al aumento de concentración de Hcy, consistente con el rol de la vía de transulfuración. Los parámetros cinéticos para la CBS humana de cadena completa y trunca se pueden observar en la Tabla 1.

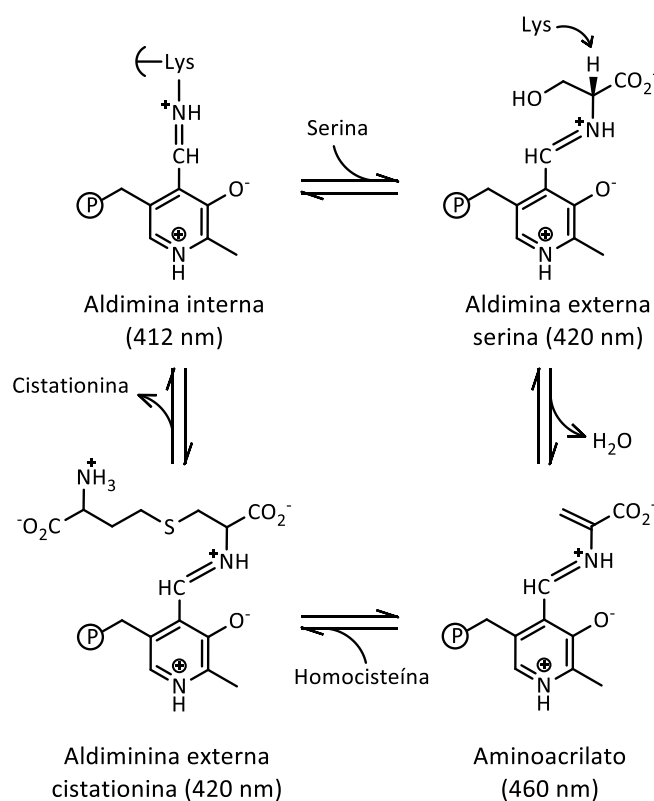


Figura 11. Mecanismo catalítico de la CBS humana. La CBS humana forma una aldimina interna con Lys119. La adición de serina genera una aldimina externa que al liberar agua se transforma en aminoacrilato. La adición de homocisteína forma otra aldimina externa que regresa al estado de aldimina interna tras la liberación de cistationina. Entre paréntesis se indican los máximos de absorción de cada intermediario. *Mecanismo adaptado de (81).*

Tabla 1. Comparación de los parámetros cinéticos para la CBS humana de cadena completa y trunca

Parámetro	CBS de cadena completa	CBS trunca
Actividad específica (-SAM) ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	159	750
Actividad específica (+SAM) ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	295	750
k_{cat} (-SAM) (s^{-1})	2.8	10
k_{cat} (+SAM) (s^{-1})	5.2	10
$K_{\text{M(Hcy)}}$ (mM)	5 ± 0.9	18 ± 8
$K_{\text{M(Ser)}}$ (mM)	2 ± 0.3	9.7 ± 4.3

Los parámetros cinéticos fueron tomados de (97) para la enzima de cadena completa y de (74) para la enzima trunca. Los valores de actividad específica son a 37 °C. La concentración de SAM en estos ensayos fue 380 μM . k_{cat} fue calculada por mol de sitio activo. *Tabla modificada de (81).*

2.2.3. Hemo de la CBS

En la CBS humana, el hemo tipo b, protoporfirina IX, se ubica en un bolsillo hidrofóbico formado por los residuos 50-67 (73). En la CBS trunca, los hemo se posicionan en los extremos distales de cada dímero con una distancia entre ellos mayor a 40 Å. La distancia del hemo al PLP y del hemo al motivo CPGC en una misma subunidad es de 20 Å. El ion de hierro está hexacoordinado y en ambos estados de oxidación, férrico y ferroso está formando complejos de bajo espín. La coordinación del hemo a la proteína es a través del tiolato de Cys52 y $\text{N}_{\delta 2}$ de His65 que tienen una disposición perpendicular respecto al plano del hemo (Figura 12). El $\text{N}_{\delta 1}$ de His65 es accesible al solvente y no forma enlaces de hidrógeno con otros residuos. El azufre de Cys52 está desprotonado y forma interacciones polares con el nitrógeno de la cadena principal de Trp54 y la cadena lateral de Arg266. Los grupos carboxilatos del hemo interactúan iónicamente con Arg51 y Arg224 y son parcialmente accesibles al solvente (79, 82).

En experimentos de fotólisis de flash y resonancia Raman utilizando la CBS ferrosa unida a CO (Fe(II)CO-CBS) se determinó la constante de asociación de Cys52 en la CBS ferrosa. Se obtuvo un valor de $\sim 10^3 \text{ s}^{-1}$. La constante de asociación no varía con el pH, indicando que el pK_a de la cisteína debe ser menor que 7.6 (98). A su vez, no se observaron cambios al mutar la Arg266 por metionina (99). La constante de unión de la cisteína debería ser aún mayor para la forma férrica, pero no se cuenta con estimaciones.

El espectro de absorción en el UV-visible de la enzima de cadena completa y trunca no se distinguen y están dominados por el hemo (100). El espectro de Fe(III)-CBS (hemo férrico) exhibe un máximo de Soret a 428 nm y una banda ancha α/β centrada en 550 nm, típicos de un hemo de bajo espín y hexacoordinado. Tras la reducción a Fe(II)-CBS (hemo ferroso), el pico de Soret tiene un corrimiento hacia 449 nm y la banda α/β se transforma en dos picos a 571 y 540 nm (101, 78, 97).

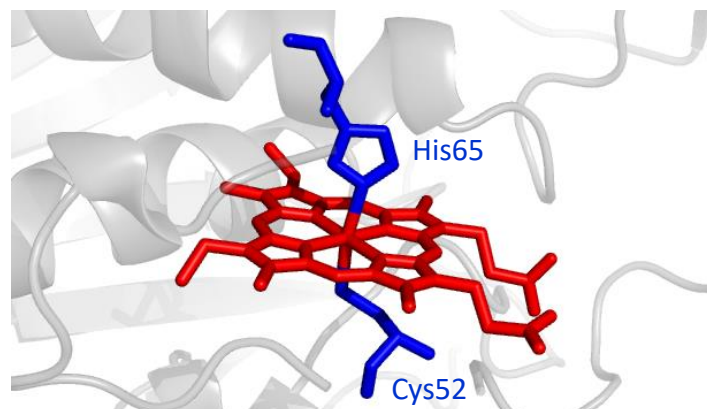


Figura 12. Coordinación del hemo. El hemo de la CBS humana se encuentra coordinado en la proteína por los residuos His65 y Cys52. La imagen fue creada con The PyMOL Molecular Graphics System 1.3 y la información se obtuvo del RCSB Protein Data Bank (código 1JBQ) (94).

Reactividad del hemo férrico

La CBS férrica tiene un potencial de reducción de -0.350 V y es muy estable (99). El potencial de reducción de la enzima trunca es muy similar al de la enzima nativa, con un valor de -0.291 V (102). La CBS no reacciona con los típicos ligandos exógenos de los hemos férricos como cianuro, azida, fluoruro, piridinas, aminas, isonitrilos e imidazoles. La Fe(III)-CBS solo se ha mostrado sensible al ion mercuríco (Hg^{2+}) y a altas concentraciones de peroxinitrito (75). Recientemente se ha observado que en condiciones anaeróbicas la enzima férrica reacciona con NO^\bullet generando una especie reducida nitrosilada. No obstante, la afinidad por el NO^\bullet es muy baja y la reacción es muy lenta, con una vida media mayor a 2 horas (103).

Reacción con cloruro de mercurio (II)

El cloruro de mercurio (II) (HgCl_2) es el único compuesto que a bajas concentraciones genera cambios en el espectro de la CBS férrica (78). Estudios realizados por investigadores del grupo de Ruma Banerjee mostraron que la adición de HgCl_2 a la CBS trunca lentamente convierte el pico de 428 nm en un pico ancho con máximo a ~ 395 nm (Figura 13). Este corrimiento en el máximo de Soret es acompañado de una pérdida de actividad y es consistente con la conversión de una especie hexacoordinada de bajo espín a una especie pentacoordinada de alto espín, sugiriendo que la adición de HgCl_2 genera la pérdida del ligando de azufre. Este cambio espectral se detectó a concentraciones superiores a HgCl_2 200 μM y CBS 4.5 μM . A concentraciones menores de HgCl_2 los autores no observaron cambios en el espectro. En esta reacción, el HgCl_2 permaneció unido a la enzima. La adición de homocisteína u otros tioles a la enzima tratada con HgCl_2 resultó en la formación de una especie hexacoordinada con el pico de Soret a 424 nm y no 428 nm como era de esperarse (100, 104).

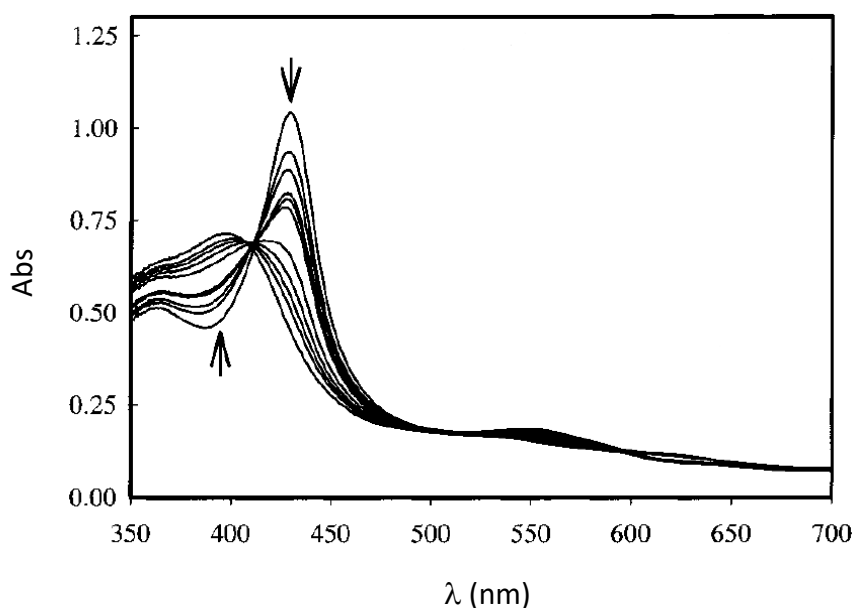


Figura 13. Cambios en el espectro de la CBS tras la adición de HgCl₂. La adición de HgCl₂ (0.2 mM) a la CBS trunca (12 μM) genera una disminución en el máximo de Soret a 428 nm y un aumento a ~395 nm. *Figura modificada de (100).*

Reacción con peroxinitrito

El peroxinitrito es un agente oxidante y nitrante producido en sistemas biológicos por la reacción de NO• y radical superóxido (O₂•⁻). La reacción entre el peroxinitrito y la CBS trunca, cuya constante de velocidad global es $(2.4-5.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C), genera cambios en el espectro de absorción de la enzima. La exposición al peroxinitrito resulta en la disminución en la absorbancia del máximo de Soret de 429 nm, su corrimiento a 425.5 nm y el aumento de absorbancia a 364 nm. En la región de baja energía del espectro, el peroxinitrito también genera variaciones; la absorbancia a 550, 650 y 703 nm disminuye, mientras que la absorbancia a 630 nm aumenta (Figura 14). Estos cambios en el espectro de absorción sumados a alteraciones en espectros de EPR, son consistentes con la pérdida del ligando de cisteína y la conversión del hierro bajo espín a alto espín.

La exposición de Fe(III)-CBS a peroxinitrito resulta en la inactivación dosis dependiente, a concentraciones mayores que 1000 μM la enzima se inactiva completamente y el IC₅₀ para inactivación es de ~150 μM para CBS 5 μM. La pérdida de actividad enzimática se debe a la reacción con el peroxinitrito en sí y con sus radicales derivados, dióxido de nitrógeno (NO₂•) y radical carbonato (CO₃•⁻), generado en la presencia de dióxido de carbono. La inactivación no se debe a una modificación del PLP, sino a las alteraciones a nivel del hemo, la pérdida en la coordinación del tiolato, la conversión del hierro bajo espín a alto espín y “bleaching”, y a la nitración de los residuos Trp208, Trp43 y Tyr223. Debido al valor de la constante de velocidad y al relativamente alto valor de IC₅₀, es probable que esta enzima no sea un blanco para peroxinitrito *in vivo* (105).

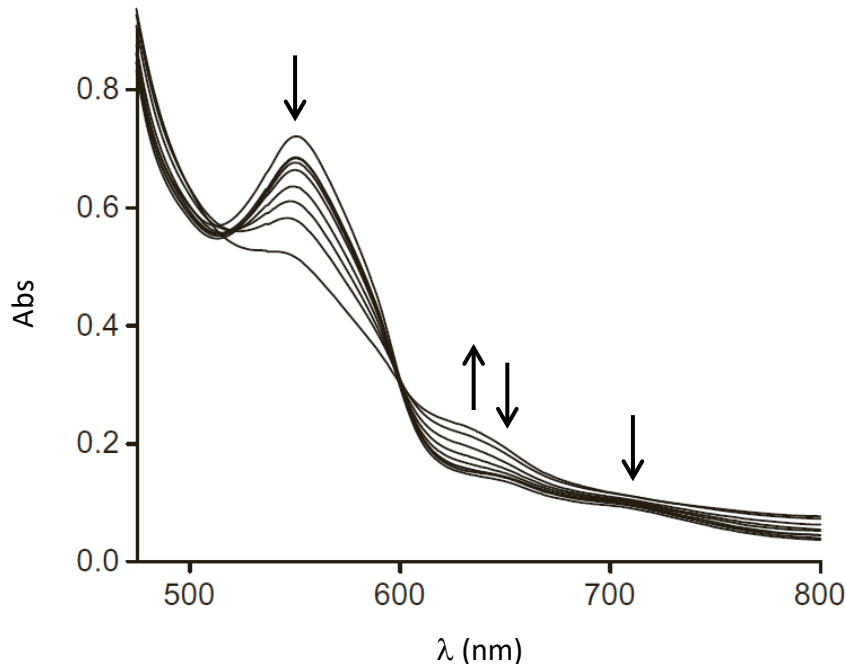


Figura 14. Espectro de CBS tratada con peroxinitrito. El espectro en la zona de baja energía de la CBS férrica trunca (123 μM) expuesta a concentraciones crecientes de peroxinitrito (0-3000 μM) exhibe una disminución en la absorbancia a 550, 650 y 703 nm y aumento a 630 nm. *Figura modificada de (105).*

Reducción del hemo

En condiciones anaeróbicas, el hemo de la CBS puede ser reducido por reductores fuertes como citrato de titanio y ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) (97). En la reducción por ditionito, la formación de Fe(II)-CBS no es proporcional a la concentración del reductor, sino a la raíz cuadrada de su concentración. Esto es consistente con que el agente reductor sea el radical anión dióxido de azufre ($\text{SO}_2^{\bullet-}$), que se forma en la homólisis del ditionito (106). La reducción de Fe(III)-CBS por $\text{SO}_2^{\bullet-}$ tiene una constante cinética de $(1.58 \pm 0.03) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 $^\circ\text{C}$) (107). Es importante evitar la incubación de la enzima con ditionito a tiempos prolongados (más de 30 minutos), ya que el sulfito, producto de la descomposición del ditionito, se une y oxida lentamente a la CBS ferrosa ($k \sim 1.7 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (103). Tampoco es conveniente reducir la enzima con concentraciones muy elevadas o a pH ácido (108).

La reducción de Fe(III)-CBS puede además ser llevada a cabo por al menos un sistema bioquímico. La metionina sintasa reductasa humana (MSR) en presencia de NADPH y CO es capaz de producir Fe(II)CO-CBS formando Fe(II)-CBS como intermediario (109). La presencia del CO es necesaria para la reducción de la enzima por MSR y aún en estas condiciones, solo $\sim 15\%$ de la CBS inicial se reduce. Esto podría deberse a que la constante cinética de formación de Fe(II)-CBS, $(9.3 \pm 2.5) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 $^\circ\text{C}$), es tres órdenes menor que la constante cinética de la reacción inversa, $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (106).

Reactividad del hemo ferroso

A diferencia del hemo férrico, el hemo ferroso es más lábil y puede sufrir diversas reacciones. Por ejemplo, reoxidación por oxígeno o NO_2^- , unión de CO y unión de NO^\bullet . Las constantes cinéticas de las diferentes reacciones pueden compararse en la Tabla 2.

Reoxidación por reacción con dióxígeno

La CBS ferrosa puede ser rápidamente reoxidada con dióxígeno formando el O_2^\bullet . Esta reacción tiene una constante de velocidad de orden dos de $(1.13 \pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la enzima de cadena completa y $(1.11 \pm 0.07) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la trunca, ambas a pH 7.4 y 25 °C. Al agregar dióxígeno a Fe(II)-CBS, el espectro de absorción de la enzima reducida con máximo a 449 nm se convierte en el espectro de la enzima oxidada con el pico de Soret a 428 nm. En el espectro además se observa un punto isosbético a 438 nm, descartando la formación de intermediarios y sugiriendo una transferencia de electrones por esfera externa (102).

Reacción con CO y su reoxidación

La Fe(II)-CBS puede unir CO desplazando el ligando de cisteína y formando Fe(II)CO-CBS, una especie con un máximo de Soret a 420 nm (106, 109, 110). Esta reacción posee una k_{obs} que aumenta hiperbólicamente con la concentración de CO con un valor máximo de $0.0166 \pm 0.0008 \text{ s}^{-1}$ (pH 8.6, 24.5 °C) (98) y 0.012 s^{-1} (pH 7.0, 25 °C) (103). A su vez, nuestro grupo de investigación encontró un valor de $(3.1 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a CO 1 mM (pH 7.4, 25 °C) (106). Se ha interpretado que estos valores de constantes de velocidad representan la disociación de la cisteína en la especie Fe(II)-CBS. Nuestro grupo de investigación observó que luego de 500 s el máximo del espectro de absorción es lentamente desplazado a 414 nm. La razón de este corrimiento es desconocida y no se continuó estudiando (106). Fe(II)CO-CBS tiene menor actividad catalítica con una K_i para CO de 5.6 μM , este valor es fisiológicamente relevante ya que está dentro del rango de concentraciones de CO endógeno generado por hemo oxigenasas de diferentes tejidos (110–112). La adición de SAM aumenta la afinidad del hemo por CO y estimula la inactivación de la enzima de cadena completa pero no de la trunca (91).

La exposición de Fe(II)CO-CBS al aire (O_2) resulta en la rápida reoxidación a Fe(III)-CBS y recuperación de la actividad enzimática (109). Ésta es una reacción multifásica, donde el mayor cambio de amplitud se detecta en la segunda fase de tres totales. En la segunda fase, la constante observada depende hiperbólicamente de la concentración de O_2 , con una k_{obs} máxima de $0.033 \pm 0.013 \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C). Este comportamiento multifásico es compatible con diversas reacciones en paralelo o consecutivas y sugiere la coexistencia de diversas especies de hemo. Aparte, el comportamiento de saturación podría reflejar un paso previo y limitante a la reacción con O_2 , como la disociación del CO (106).

Reacción con NO^\bullet y su reoxidación

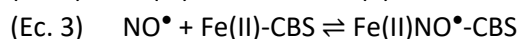
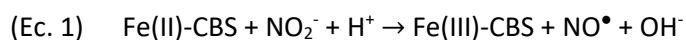
El NO^\bullet reacciona con Fe(II)-CBS para formar una especie pentacoordinada hierro-nitrosilo (Fe(II)NO $^\bullet$ -CBS) inactiva que absorbe a $\sim 394 \text{ nm}$, consistente con la pérdida de ambos ligandos endógenos. Ante la exposición a NO^\bullet no es posible diferenciar la CBS de cadena completa de la trunca, ya que los cambios espectrales son idénticos (113). NO^\bullet se une con una $K_d \leq 0.23 \mu\text{M}$ y con las constantes cinéticas $k_{\text{on}} = 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{off}} = 0.003 \text{ s}^{-1}$. La k_{on} de segundo orden indica la dependencia lineal de las k_{obs} respecto a la concentración de NO^\bullet , sugiriendo que la unión no

depende de la lenta disociación de Cys52. Este hecho favorece la hipótesis en la que el NO• se une del lado de His65 generando la rápida disociación de Cys52 y así resultando en la formación de una especie Fe(II)NO•-CBS pentacoordinada (103). La presencia de SAM aumenta la afinidad del hemo por NO•, lo que lleva a una mayor inactivación de la enzima de cadena completa pero no de la enzima trunca; esto ocurre en menor grado que para el CO (91).

Tras la exposición de Fe(II)NO•-CBS al aire, se genera la CBS férrica activa (103, 113). Al mezclar la especie nitrosilada con exceso de O₂, el pico de absorción a 394 nm se convierte en el pico de Fe(III)-CBS a 428 nm; en este proceso no se observan puntos isobésticos claros. La reoxidación de Fe(II)NO•-CBS es bifásica, la primer fase, que depende linealmente de la concentración de dióxígeno, tiene una constante aparente de $2.0 \pm 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que la segunda fase, con k_{obs} de $\sim 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, es constante respecto a la concentración de O₂. Estos resultados se pueden interpretar como dos mecanismos paralelos, uno que involucra la lenta disociación de NO• como paso limitante seguido de la rápida reacción con O₂ y otro en donde primero reacciona el O₂ con Fe(II)NO•-CBS pero de manera lenta (114).

Reacción con NO₂⁻

La CBS ferrosa es capaz de reducir NO₂⁻ a NO•, desencadenado la posterior formación de Fe(II)NO•-CBS. Esto se lleva a cabo en una serie de reacciones que involucran la formación de NO• y Fe(III)-CBS (Ec. 1), la reducción de Fe(III)-CBS por el reductor preferente en exceso con formación de Fe(II)-CBS (Ec. 2) y la reacción de esta última especie y NO• para generar Fe(II)NO•-CBS (Ec. 3).



Estas reacciones se visualizan en el espectro UV-visible a través del corrimiento del pico de Soret de 449 nm a 394 nm. A pesar de que en el proceso se forma Fe(III)-CBS, su concentración representa < 10 % de la CBS total y conforme decrece Fe(II)-CBS, se genera Fe(II)NO•-CBS. La reacción entre la CBS ferrosa de cadena completa y el NO₂⁻ posee una constante cinética de $0.66 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C). En presencia del activador SAM, la constante cinética tiene un valor de $1.32 \pm 0.06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que para la enzima trunca vale $2.37 \pm 0.07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Desde el punto de vista mecanístico, la reducción de NO₂⁻ por Fe(II)-CBS podría involucrar una transferencia de electrones de esfera externa o la implicancia de una especie pentacoordinada (Fe(II)5c-CBS) (114, 115).

Decaimiento a Fe(II)424-CBS

La enzima ferrosa puede decaer lentamente a una forma inactiva, Fe(II)424-CBS, que posee un máximo de Soret a 424 nm y un ligando neutro desconocido en lugar de la cisteína. La formación de esta especie es favorecida en condiciones no fisiológicas como altas temperaturas y pH básico. Al ser expuesta a oxidantes como el aire, Fe(II)424-CBS se convierte en una nueva especie con el pico de Soret a 412 nm y una banda ancha α/β centrada en $\sim 530 \text{ nm}$ (116, 117).

Reacción con compuestos de mercurio

La adición de HgCl_2 a la CBS reducida genera un decrecimiento en el pico de absorción a 450 nm y un aumento a 425 nm. El corrimiento del máximo indica la presencia de una especie hexacoordinada y la pérdida del ligando tiolato, es decir que la cisteína es reemplazada por otro ligando, que no ha sido caracterizado. La especie hexacoordinada generada no presenta actividad (100, 104).

Por otro lado, se observó que la adición de *p*-cloromercuribenzoato (*p*-CMB) a la CBS ferrosa genera un corrimiento del pico de absorción de 448 nm a 428 nm con un punto isobéptico a 438 nm (118).

Tabla 2. Reacciones del hemo de la CBS

Reacción	Constante cinética	Referencia
$\text{Fe(III)-CBS} + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{P}_{\text{CBS}}$	$(2.4\text{-}5.0) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(105)
$\text{Fe(III)-CBS} + \text{SO}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe(II)-CBS} + \text{SO}_2$	$(1.58 \pm 0.03) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(107)
$\text{Fe(III)-CBS} + \text{MSR}_{\text{red}} \rightleftharpoons \text{Fe(II)-CBS} + \text{MSR}_{\text{ox}}$	$(9.3 \pm 2.5) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (d) $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (r)	(106)
$\text{Fe(II)-CBS} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)-CBS} + \text{O}_2^{\bullet-}$	$(1.13 \pm 0.05) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(102)
$\text{Fe(II)-CBS} + \text{CO} \rightarrow \text{Fe(II)CO-CBS}$	$0.0166 \pm 0.0008 \text{ s}^{-1}$ 0.012 s^{-1} $(3.1 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a $\text{CO } 1 \text{ mM}^{\text{a}}$	(98) (103) (106)
$\text{Fe(II)CO-CBS} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)-CBS} + \text{productos}$	$0.033 \pm 0.013 \text{ s}^{-1}$ a O_2 infinito ^b	(106)
$\text{Fe(II)-CBS} + \text{NO}^{\bullet} \rightleftharpoons \text{Fe(II)NO}^{\bullet}\text{-CBS}$	$8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (d) 0.003 s^{-1} (r)	(103)
$\text{Fe(II)NO}^{\bullet}\text{-CBS} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)-CBS} + \text{productos}$	Primera fase: $2.0 \pm 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ Segunda fase: $\sim 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1\text{c}}$	(114)
$\text{Fe(II)-CBS} + \text{NO}_2^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe(III)-CBS} + \text{NO}^{\bullet} + \text{OH}^-$	$0.66 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(114)

Los valores de las constantes cinéticas son a 25 °C, excepto las reacciones con peroxinitrito (ONOO^-) y NO_2^- que son a 37 °C, y a pH 7.4, excepto las reacciones con CO que son a pH 8.6 y 7.0. d, reacción directa, r, reacción reversa. ^aConstante cinética de pseudo-primer orden (k_{obs}) obtenida con CO 1 mM. ^bProceso multifásico, el valor corresponde a la constante cinética limitante de pseudo-primer orden de la fase con mayor amplitud. ^cLa segunda fase de la reoxidación de $\text{Fe(II)NO}^{\bullet}\text{-CBS}$ es independiente de la concentración de O_2 , las constantes observadas tienen valores $\sim 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Rol del hemo

Si bien en los últimos años el rol del hemo en la CBS ha sido muy estudiado, su función sigue siendo desconocida. Se ha descartado un rol catalítico mientras que se le han atribuido diferentes roles, como estructural y regulador.

El rol catalítico del hemo fue inicialmente descartado por estudios espectroscópicos (119), consistente con que las CBS de *Trypanosoma cruzi* y levadura catalizan la misma reacción pero no contienen hemo (76, 77). Años más tarde, las estructuras cristalográficas de la enzima trunca humana y la enzima de cadena completa de *Drosophila* revelaron que el hemo se localiza a ~20 Å del PLP, reafirmando que el hemo no participa en la catálisis (79, 82, 120).

No obstante, alteraciones a nivel del hemo parecen modular la actividad de la enzima sugiriendo un rol de sensor (97, 82, 81). Por ejemplo, la unión de CO o NO• a la enzima ferrosa lleva a una enzima inactiva que se reactiva tras la reoxidación y recuperación del hemo hexacoordinado férrico (106, 103, 114). Teniendo en cuenta que el hemo férrico solo reacciona con HgCl₂, peroxinitrito y NO• en condiciones no relevantes fisiológicamente, la asignación de un rol modulador o sensor redox al hemo depende de la factibilidad de la reducción al estado ferroso y su reacción con un modulador antes de ser reoxidado por O₂. Si bien desde el punto de vista cinético el CO no sería un buen modulador en presencia de O₂, se ha observado que la exposición a CO inhibe la síntesis de cistationina en cultivos celulares (121).

Se ha propuesto que el hecho de que el hemo sea capaz de modular la actividad enzimática se debe a que alteraciones en su coordinación afectan el equilibrio entre los tautómeros de PLP. La comunicación entre ambos cofactores es bidireccional y ocurre a través de una α hélice que en un extremo interactúa con Cys52, a través de Arg266, y en el otro extremo con PLP, a través de dos residuos de treonina, Thr257 y Thr260. Se ha sugerido que la comunicación entre el PLP y el hemo se extiende hasta el sitio de unión a SAM, ya que mutantes de la arginina y las treoninas responden a SAM de diferente manera (96, 99, 122–125).

Adicionalmente, al hemo se le ha asignado un rol estructural. La postulación de esta hipótesis se debe a varias observaciones. Por ejemplo, la expresión de CBS humana deficiente en hemo resulta en la producción de una enzima mal plegada y degradada (126). La alta resistencia al calor y desnaturalización térmica por parte de la CBS con hemo, en contraposición a la CBS de levadura carente de hemo, también es consistente con el rol estructural propuesto para el hemo (70). Por otro lado, la caracterización de una CBS con el hemo mutado, llevando cobalto en lugar de hierro, indica la importancia del enlace metal-cisteína para que la CBS funcione normalmente. No es necesario que el metal sea hierro, mientras que la enzima esté correctamente plegada y mantenga los ligandos, la identidad del metal parecería no modificar la actividad (127).

2.3. Utilización de compuestos de mercurio como herramienta bioquímica

El mercurio es uno de los elementos o sustancias más tóxicas del planeta, existe naturalmente y es liberado al ambiente como contaminante por actividades industriales. La liberación del mercurio procesado puede llevar al aumento progresivo de mercurio atmosférico. Asimismo, el mercurio presente en el suelo o agua contaminada tiene el potencial de entrar en la cadena alimenticia a través de plantas y ganado. La exposición al mercurio o a compuestos de mercurio

genera efectos tóxicos a nivel celular, cardiovascular, hematológico, pulmonar, renal, inmunológico, neurológico, endócrino, reproductivo y embrionario (128).

El mercurio puede ser inorgánico, en estado mercurioso (Hg_2^{2+}) o mercúrico (Hg^{2+}), u orgánico, siendo el metilmercurio el más común y dimetilmercurio uno de los más peligrosos (Figura 15) (128). Por lo general, la química del ion mercúrico en los sistemas biológicos involucra complejos de tiolato de bajo número de coordinación. En las enzimas, los ligandos más frecuentes son los grupos tiolato de las cadenas laterales de cisteína. Al ser buen dador y fácilmente polarizable, el átomo de azufre del tiolato tiene alta afinidad por los iones metálicos grandes y polarizables como el Hg^{2+} . Los biopolímeros pueden presentar otros ligandos como tioéteres, carboxilatos, imidazoles y aminas. Dependiendo del organismo y su entorno, haluros, agua, sulfuro y seleniuro también son potenciales ligandos (129).

A pesar de la alta afinidad de Hg^{2+} por los tioles, los complejos que forman sufren un rápido intercambio de ligandos; estas características han convertido al mercurio en una herramienta bioquímica muy útil. El mejor método para unir mercurio a una proteína dependerá de las características de la proteína en cuestión. Si dicha proteína posee varios residuos de cisteína, será posible quelar un único ion metálico con alta afinidad, como en el caso del factor metaloregulador MerR. En esta situación la incubación de la proteína en solución con exceso de mercurio es suficiente. Algunas proteínas, sin embargo, son capaces de unir el metal a uno o más sitios de baja afinidad rindiendo un complejo inespecífico. Una solución para este escenario es el agregado de tioles al amortiguador con el fin de evitar que el mercurio se una a los sitios de baja afinidad y así impedir la formación de complejos inespecíficos. Paralelamente, esta técnica previene la oxidación de cisteínas a disulfuros por acción de oxidantes. Otro método utilizado para unir Hg^{2+} es la diálisis, la cual es conveniente para reemplazar un metal lábil con Hg^{2+} (129, 130).

Los métodos más prácticos para determinar la concentración de Hg^{2+} en proteínas incluyen espectroscopía de absorción atómica (AAS), espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), mercurio radiomarcado ^{203}Hg , extracción con ditizona y absorción atómica de vapor frío. Para estudiar los complejos Hg^{2+} -proteína se pueden aplicar diversas técnicas como espectroscopía extendida de estructura fina por absorción de rayos X (EXAFS), espectroscopía electrónica y dicroísmo circular. Varios ejemplos de la aplicación de estas técnicas para la elucidación de las propiedades de diversas proteínas se pueden encontrar en (129).

2.3.1. Reactividad del mercurio

El mercurio es un elemento del grupo 12 y por ende su máximo estado de oxidación es +2. Es electropositivo, blando, tiene bajo punto de fusión y alta volatilidad. Posee una alta tendencia para formar complejos, especialmente complejos lineales con número de coordinación dos y tetraédricos con número de coordinación cuatro (131).

El mercurio puede interactuar con los tioles y disulfuros de diversas proteínas y coenzimas (132). Dada la alta afinidad entre el mercurio y los tioles sería lógico pensar que la reacción entre un compuesto de mercurio y una proteína es un indicativo de la presencia de cisteínas. Si bien la mayoría de las veces esto es correcto, no siempre es así. Por ejemplo, el *p*-CMB (Figura 15) se une al sitio activo de la apocarboxipeptidasa que no posee grupos tioles (133, 134). Al igual que

con las proteínas, las reacciones con coenzimas no siempre se deben a la presencia de tioles, como es el caso de la interacción con NADH (135).

Por consiguiente, los compuestos de mercurio no solo reaccionan con tioles y este hecho debe ser tenido en cuenta para prevenir conclusiones erróneas. Los compuestos de mercurio pueden interactuar con triptofanos alterando el espectro de absorción y disminuyendo la señal fluorescente y fosforescente. Asimismo disminuye la fluorescencia y fosforescencia de tirosinas y fenilalanina e incluso interactúa con los grupos amino y carboxilo de las enzimas (131, 136, 137).

Aparte de reaccionar con proteínas, los compuestos de mercurio reaccionan con purinas, pirimidinas y ácidos nucleicos. Se han medido tanto las constantes de formación de complejos entre Hg^{2+} y citidina, adenosina y guanosina como la interacción entre Hg^{2+} con nucleósidos, nucleótidos y ADN. El Hg^{2+} afecta el espectro de dispersión óptica rotatoria de los fosfatos di y trinucleótidos que varían con la secuencia de bases. Los compuestos de mercurio interactúan con los ácidos nucleicos adicionándose a las bases, no solo a los grupos fosfato, generando alteraciones en algunas de sus propiedades (138–140). Estas reacciones también deben ser consideradas a la hora de sacar conclusiones, ya que su olvido puede dar lugar a conclusiones equivocadas, como sucedió con la endonucleasa de la bacteria *Serratia marcescens*. Al observar que el *p*-CMB inhibía la actividad de la endonucleasa, se concluyó que la proteína contenía tioles. Pero estudios posteriores demostraron que no poseía tioles y que el efecto del *p*-CMB sobre la actividad radica en la interacción del compuesto de mercurio con el sustrato, ADN, y no con la enzima (141).

Adicionalmente, se ha observado la reacción del mercurio con partículas subcelulares, cromosomas y virus. Muchos compuestos de mercurio producen anomalías cromosómicas e inducen efectos genéticos y teratogénicos. Por otro lado, Hg^{2+} reacciona con el ARN del virus de mosaico del Bromus y con el virus en sí sin degradar la partícula viral (142, 131).

Por último, el mercurio inorgánico puede ser convertido a mercurio orgánico, metilmercurio. La metilación biológica puede ocurrir por diversas vías. Existen tres agentes metilantes en los sistemas biológicos: SAM, derivados de N^5 -metiltetrahidrofolato y metilcorrinoideos. Los primeros dos transfieren el metilo como ion carbonio (CH_3^+), por lo que son incapaces de metilar Hg^{2+} . Los metilcorrinoideos, por su parte, pueden metilar Hg^{2+} ya que además de generar grupos metilo como iones carbonio (CH_3^+), generan carbaniones (CH_3^-), capaces de metilar sales inorgánicas de Hg, y radicales (CH_3^\bullet), capaces de metilar el metal Hg. La metilcobalamina, un grupo dentro de los metilcorrinoideos, puede dar lugar a la síntesis enzimática y no enzimática de monometilmercurio y dimetilmercurio (143). Algunas bacterias no solo sintetizan compuestos de mercurio orgánicos, sino que también los descomponen rindiendo Hg metálico (131).

Todos los compuestos de mercurio son citotóxicos para las células, pero los orgánicos son por lo general un orden de magnitud más efectivos que los inorgánicos (131). El metilmercurio reacciona covalentemente con los grupos tiol de las proteínas celulares ocasionando citotoxicidad. Se ha reportado que la CBS contribuye a la protección de la célula contra el metilmercurio. El sulfuro de dimetilmercurio ((MeHg)₂S) es un metabolito detoxificado del metilmercurio. Se ha detectado como producto en células SH-SY5Y e hígados de ratas expuestos a metilmercurio. La formación de (MeHg)₂S puede atribuirse a las interacciones entre

persulfuros libres endógenos o proteínas unidas a persulfuro de cisteína y metilmercurio (144, 145).

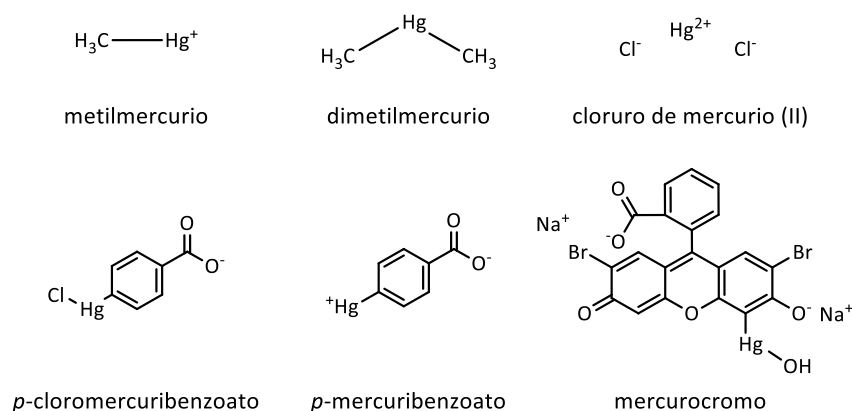


Figura 15. Estructuras de compuestos de mercurio. Estructura de metilmercurio, dimetilmercurio, cloruro de mercurio (II) (HgCl₂), *p*-cloromercuribenzoato (*p*-CMB), *p*-mercuribenzoato (*p*-MB) y mercurocromo.

2.3.2. Aplicaciones bioquímicas

El uso del mercurio como herramienta bioquímica se basa principalmente en la reactividad con los tioles. A pesar de que el *p*-mercuribenzoato (*p*-MB) (Figura 15) puede unirse a otros grupos o compuestos en una proteína, solo la interacción con los grupos tiol resulta en el gran aumento del coeficiente de extinción molar a 250 nm. Consecuentemente, las medidas espectrales a 250 nm son útiles para distinguir la interacción de compuestos de mercurio con tioles respecto a la interacción con otros grupos (146). Esta observación se ha convertido en un método de titulación de tioles. Las medidas del aumento de absorbancia a 250 nm al agregar *p*-CMB han permitido determinar la cantidad de tioles en albúmina sérica humana oxidada (147) y en hemoglobina humana antes y después de ser tratada con N-etilmaleimida (NEM) (148).

Otro método de cuantificación de tioles biológicos que implica el uso de compuestos de mercurio es el método de Saville. Los tioles reaccionan con ácido nitroso a pH bajo para formar el derivado S-nitroso correspondiente. El derivado se hace reaccionar con sulfamato de amonio con el fin de remover el exceso de ácido nitroso. El S-nitrosotiol es luego descompuesto con iones de mercurio. El ácido nitroso liberado puede ser determinado por sulfanilamida, que se convierte en el diazocompuesto y posteriormente reacciona con *N*-(1-naftil)-etilendiamina para producir un cromóforo que absorbe con un máximo a 550 nm. La reacción puede ser calibrada y su linealidad lo convierte en un método sensible para determinar la concentración de tioles (149–151). Variantes de este método se utilizan para determinar nitrosotioles (152).

El *p*-CMB puede a su vez ser utilizado como sonda de cisteínas en enzimas. Las enol-lactona hidrolasas y CoA transferasas de *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas putida* fueron inhibidas completamente por el *p*-CMB, indicando probablemente la modificación de cisteínas cerca o en el sitio activo de dichas enzimas (153).

El mercurocromo (Figura 15), que por décadas fue utilizado como antiséptico tópico, puede usarse para determinar la cantidad de tioles y disulfuros proteicos en cortes histológicos (154, 155). Además se ha estudiado la interacción con proteínas en solución; el mercurocromo forma un aducto con β -lactoglobulina A a través del tiol de la única cisteína libre de la cadena aminoacídica (156).

Recientemente se diseñó un procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar diferentes isoformas de albúmina sérica humana (HSA) según su punto isoeléctrico que implica la utilización de HgCl_2 (Figura 15). Al oxidar el tiol de la HSA a ácido sulfénico o disulfuro mixto, HSA-SH no puede ser diferenciada del resto de las isoformas ya que en todas, la carga neta de la superficie de la proteína es cero. Al agregar HgCl_2 a la solución de HSA, se bloquea el tiol generando una especie HSA-SHg⁺ con una carga positiva extra permitiendo su diferenciación (157).

Caracterización de hemoproteínas

Las aplicaciones bioquímicas del mercurio presentadas previamente han sido utilizadas para caracterizar hemoproteínas coordinadas por residuos de cisteína o proteínas hemotiolato. La CBS es un ejemplo de hemotiolato y como se describió anteriormente, la adición de HgCl_2 tanto a la enzima férrica como ferrosa, resulta en la pérdida del ligando de cisteína y formación de un hemo pentacoordinado y hexacoordinado con ligando desconocido, respectivamente (100). El espectro de la CBS está dominado por el hemo y, a pesar de que los compuestos de mercurio no solo reaccionan con tioles, es de esperar que la reacción entre compuestos de mercurio y CBS únicamente produzca cambios en el espectro cuando la cisteína involucrada sea la Cys52, ligando del hemo (104). La unión del mercurio a la CBS se explorará en profundidad en esta tesis.

Aparte de la CBS, los compuestos de mercurio han revelado propiedades de otras hemoproteínas. El uso de acetato de metilmercurio permitió observar por primera vez una hemoproteína, DGCR8, con dos cisteínas endógenas como ligandos (158).

A su vez, han permitido el estudio de mPer2, un factor transcripcional asociado con los ritmos circadianos compuesto por un dominio C-terminal y dos dominios PAS (PAS-A y PAS-B) capaces de unir hemo. Para evaluar la posibilidad de que los hemos de cada dominio tuvieran cisteína como ligando, se agregó HgCl_2 a ambos dominios por separado y se observaron los cambios espectrales ocasionados. El corrimiento de la banda de Soret de 421 a 412 nm del dominio PAS-A, permitió concluir que el hemo es coordinado por cisteína, mientras que el espectro del dominio PAS-B fue indiferente a HgCl_2 , indicando la ausencia de un hemo coordinado por cisteína (159, 160).

La cloroperoxidasa, una peroxidasa capaz de clorar sustratos, contiene un hemo coordinado por la Cys29 (161). En condiciones alcalinas, se transforma en una especie inactiva con características espectrales distintas. La titulación con *p*-MB fue utilizada para determinar si la Cys29, la única cisteína que no forma disulfuro en la cloroperoxidasa, continúa coordinando el hemo tras la conversión a la cloroperoxidasa alcalina (C420). La alteración del espectro de absorción de C420-*p*-MB férrica respecto al espectro de C420, sugiere que la Cys29 permanece al menos parcialmente unida como ligando, mientras que otros estudios sugieren la existencia de una mezcla de las especies hexacoordinada unida a tiolato y pentacoordinada no unida. Por otro lado, la C420 ferrosa no parece tener tiolato como ligando (162).

La HRI (inhibidor regulado por hemo) es una de las cuatro eIF2 α quinasas que fosforila la subunidad α del factor de iniciación eucariota 2, promoviendo la terminación de la síntesis de proteínas. HRI sensa la concentración de hemo en eritrocitos y actúa en condiciones de escasez de hemo. En condiciones normales donde hay suficiente hemo, el hemo bloquea el sitio activo de la quinasa y no se lleva a cabo la fosforilación. Cuando hay escasez de hemo, el sitio activo queda expuesto permitiendo la fosforilación de eIF2 α (163). Se estudió la adición de Hg²⁺ a la proteína por espectroscopía de absorción y se detectó un aumento de absorbancia a 412 nm y disminución a 421 nm, indicando la conversión de una especie hexacoordinada de bajo espín a una pentacoordinada de alto espín. La estequiometría de la unión de Hg²⁺ reveló que el metal interactúa con cuatro cisteínas de la enzima, de las cuales al menos una es ligando del hemo. Al alterar el enlace hierro-tiol del hemo, el Hg²⁺ inhibe la actividad de HRI y como consecuencia estimula la síntesis proteica. Se cree que HRI podría tener la función de sensor de Hg²⁺ (164).

2.4. Hipótesis

Teniendo en cuenta la alta afinidad de los compuestos de mercurio por los tioles y considerando que la exposición de la CBS a estos compuestos lleva a la formación de una especie donde el ion de hierro esté pentacoordinado, es nuestra hipótesis que la constante de velocidad de formación de esta especie estará limitada por la constante de disociación del tiolato. Así, la caracterización de la cinética de interacción con los compuestos de mercurio permitiría estudiar la unión hemo-tiolato. Es de destacar que existen valores en la literatura para la disociación del tiolato en la CBS ferrosa, estimados a partir de la cinética de unión de CO ($0.0166 \pm 0.0008 \text{ s}^{-1}$ a 24.5 °C y pH 8.6, 0.012 s^{-1} a 25 °C y pH 7.0, $(3.1 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a CO 1 mM, 25 °C y pH 7.4), no existiendo valores disponibles para la CBS férrica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la interacción de compuestos de mercurio con el hemo-tiolato de la cistationina β -sintasa con el fin de comprender la unión de la cisteína al hierro.

3.2. Objetivos específicos

Caracterizar cinéticamente las reacciones entre la cistationina β -sintasa férrica y los compuestos de mercurio *p*-cloromercuribenzoato, cloruro de mercurio (II) y mercurocromo.

Analizar si la cinética de interacción entre el hemo y los compuestos de mercurio permite determinar el valor de la constante de disociación del tiolato.

Determinar si compuestos que no contienen mercurio, N-etilmaleimida y acetato de zinc, reaccionan con el hemo-tiolato de la enzima.

Determinar si los compuestos de mercurio llevan a la separación del hemo de la cistationina β -sintasa.

Estudiar los efectos de los compuestos de mercurio en la actividad específica de la cistationina β -sintasa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CBS

Se utilizó CBS recombinante purificada por Ernesto Cuevasanta en el marco de su tesina de grado. La enzima se purificó a partir de una cepa BL-21 (DE3) de *Escherichia coli* transformada con el plásmido pGEX4T1/hCBS Δ C143 que codifica para la CBS humana trunca unida al dominio de unión de la glutatión S-transferasa. La enzima tenía un peso molecular de 45 kDa, una concentración de $57 \pm 17 \mu\text{M}$, $2.6 \pm 0.8 \text{ mg/mL}$ y una actividad específica de $(1.01 \pm 0.06) \times 10^3 \text{ U/mg}$. Fue almacenada a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior uso (165). Previo al uso de los stocks de CBS, se redeterminó la concentración de enzima por absorbancia a 428 nm utilizando el coeficiente de extinción molar basado en el hemo a pH 7.4, $\epsilon_{428} = 92700 \pm 4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, obteniéndose un valor de $\sim 45 \mu\text{M}$ (102).

4.2. Soluciones

El HgCl_2 (Sigma-Aldrich o Riedel) se preparó en agua destilada en solución stock de concentración 119 mM y se hicieron diluciones en agua destilada a partir de la misma. Se realizaron soluciones stock de *p*-CMB (Sigma-Aldrich) de concentración 12.29, 13.03 y 15.4 mM en agua destilada. Para lograr la disolución de *p*-CMB fue necesario agregar 30 μL de NaOH 5 M a un volumen total de 3030 μL . A partir de las soluciones stock de *p*-CMB se hicieron diluciones en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4. El mercurocromo (Sigma-Aldrich) se preparó en agua destilada en solución stock de concentración 14.65 mM y se realizaron diluciones a partir de ella. Luego de utilizarlas, las soluciones y las mezclas de reacción se colocaron en depósitos para su descarte posterior; no se descartaron al sistema de red de desagüe habitual.

El NEM (Sigma-Aldrich) se preparó en agua destilada en una solución stock de concentración 200 mM. El acetato de zinc (Sigma-Aldrich) se preparó en solución stock de concentración 0.5 M.

4.3. Cinética de reacción del hemo-tiolato de la CBS férrica con compuestos de mercurio

Para caracterizar la cinética de las reacciones entre CBS y los compuestos de mercurio (*p*-CMB, HgCl_2 y mercurocromo), cada reacción se siguió por espectroscopía UV-visible en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la mayoría de los experimentos se utilizó un espectrofotómetro Varian Cary 50. Para los experimentos de cinética rápida se utilizó un accesorio de flujo detenido (*stopped flow*) Applied Photophysics RX2000 acoplado al mismo instrumento. Los estudios de cursos temporales largos se realizaron en el mismo Varian Cary 50 o en un lector de placas Varioskan Flash. Los cursos de reacción se siguieron realizando espectros cinéticos sucesivos en el tiempo o siguiendo la absorbancia a una longitud de onda fija (430 nm) correspondiente al máximo de Fe(III)-CBS.

Además de compuestos de mercurio, se realizaron experimentos de cinética utilizando acetato de zinc y NEM. Se siguió la absorbancia a 430 nm de la enzima en presencia de acetato de zinc

en el lector de placas Varioskan Flash. La interacción con NEM se estudió mediante espectros sucesivos en el tiempo en un espectrofotómetro Cary 60.

4.4. Separación del hemo de la proteína

4.4.1. CBS con HgCl₂ por 24 horas

Para determinar si el hemo continuaba unido a la enzima o no luego de ser expuesta a HgCl₂ por largos períodos de tiempo, se preparó una muestra con CBS 7.5 μM y HgCl₂ 100 μM y un control con CBS 7.5 μM sin compuesto de mercurio en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4. Luego de 24 horas en heladera ambas muestras se centrifugaron (10 min, 10000 g, 4 °C) para que quedaran homogéneas y se realizaron espectros UV-visible de una dilución del sobrenadante de cada muestra. Luego se realizó una ultrafiltración en concentradores Spin-X UF 500 (MWCO 10 kDa) de Corning centrifugando durante 15 min a 10000 g y 4 °C. A cada filtro se le agregó más muestra y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. A continuación se realizaron espectros UV-visible de las fracciones retenidas en la parte superior de cada filtro (mayor a 10 kDa) y de las fracciones filtradas que se encontraban en la parte inferior de cada filtro (menor a 10 kDa), en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4. Todos los espectros se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 barriendo de 200 a 800 nm.

4.4.2. CBS con HgCl₂, *p*-CMB y mercurocromo por 48 horas

Para comparar el efecto generado en el hemo por el HgCl₂ con el resto de los compuestos de mercurio, el experimento se repitió con algunas variantes. Se prepararon muestras con CBS 11 μM y 100 μM de HgCl₂, *p*-CMB y mercurocromo por separado y un control con CBS 11 μM sin compuesto de mercurio en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4. Después de 48 horas en heladera, las cuatro muestras se centrifugaron en concentradores Spin-X UF 500 (MWCO 10 kDa) de Corning durante 15 minutos a 10000 g y 4 °C. Con el fin de aumentar el volumen de la fracción concentrada, a cada filtro se le agregó más muestra y se volvió a centrifugar en dos ocasiones. Se realizaron espectros UV-visible de las fracciones retenidas en la parte superior de cada filtro (mayor a 10 kDa) y de las fracciones filtradas (menor a 10 kDa), en amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4. Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 barriendo de 250 a 600 nm.

4.5. Medidas de actividad

4.5.1. Actividad de CBS

La actividad de la CBS se determinó mediante la formación de producto (cistationina) a partir de los sustratos de la reacción canónica (Ser y Hcy). Es posible seguir la aparición de cistationina por espectrofotometría ya que ésta reacciona con ninhidrina formando un compuesto coloreado que absorbe a 453 nm (166).

A 37 °C y en amortiguador Tris 0.1 M (concentración final), pH 8.6, se incubaron diferentes concentraciones de CBS (0-0.52 μM) con PLP 250 μM, albúmina sérica bovina (BSA) 0.5 μg/mL,

Ser 30 mM y H₂O c.s.p 200 µL (72). La reacción se inició con el agregado de Hcy 30 mM. Luego de 30 min se detuvo la reacción con 25 µL de ácido tricloroacético (TCA) 45 %. Se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó (10 min, 17000 rpm, 4 °C) para remover las proteínas. Se tomó 50 µL del sobrenadante de cada muestra y se agregó 950 µL de ninhidrina. Las muestras se calentaron a 100 °C por 5 min, se enfriaron en hielo por 2 min y se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 min. Una vez finalizado el procedimiento, se midió la absorbancia de cada muestra a 453 nm y se restó la absorbancia del control sin enzima. Para calcular la concentración de cistationina formada, el día del ensayo se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de cistationina (0-400 µM) y 950 µL de ninhidrina en un volumen total de 1000 µL. Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 µmol de cistationina en 1 hora a 37 °C. La actividad específica se expresa en U/mg de proteína (167).

Para este ensayo se prepararon soluciones de Ser 0.6 M, PLP 5 mM y cistationina 10 mM por pesada directa y se utilizó BSA de una solución de 10 mg/mL. La Hcy debe ser preparada el día que se utilice; se preparó una solución 0.2 M a partir de homocisteína tiolactona. Se disolvieron 0.03 g de homocisteína tiolactona en 200 µL de NaOH 5 M y se dejó incubar durante 5 min a 37 °C. Después se agregó 390 µL de HCl 2 M, 40 µL de NaOH 5 M, 100 µL de amortiguador Tris 0.2 M, pH 8.6, 0.0031 g de ditiotretitol (DTT) y 270 µL de agua destilada (167). La ninhidrina se preparó disolviendo 0.5 g de ninhidrina en 50 mL de ácido acético glacial y 16.5 mL de ácido fosfórico glacial.

4.5.2. Actividad de CBS tratada con compuestos de mercurio

Para ver el efecto de los compuestos de mercurio en la actividad de la enzima, se midió la actividad de la CBS tras la incubación con HgCl₂ y *p*-CMB por separado y de CBS sola como control. Este experimento se realizó en dos oportunidades. Se expuso CBS (5.7 µM) a HgCl₂ y *p*-CMB (100 µM) durante períodos de 0.5 y 72 horas en heladera en un experimento, y 1.5 y 48 horas en heladera en otro. En ambos experimentos, los controles llevaban la misma concentración de enzima que las muestras con compuestos de mercurio. Antes de medir la actividad, las muestras se ultrafiltraron y se realizaron espectros de absorción siguiendo un procedimiento similar al de 4.4.2, excepto que en estos experimentos se realizaron cinco centrifugaciones intercaladas por lavados de 100 µL de amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4 para remover los compuestos de mercurio. Únicamente se analizó la fracción retenida en la parte superior del filtro y no la fracción filtrada como en el procedimiento anterior.

Las fracciones retenidas de cada filtro se resuspendieron y diluyeron en 100 µL de amortiguador Tris 0.1 M, pH 7.4, para homogeneizar, aumentar el volumen y disminuir la concentración de enzima. Se midió la actividad siguiendo el mismo procedimiento que en 4.5.1 pero en lugar de utilizar distintas concentraciones de CBS se utilizaron las diluciones de las fracciones retenidas; la concentración de enzima en éstas se midió realizando $Ab_{5280} - Ab_{500}$ ($\epsilon_{280} = 92200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (165). La Hcy y la curva de calibración de cistationina se realizaron los días del ensayo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cinética de reacción del hemo-tiolato de la CBS férrica con compuestos de mercurio

5.1.1. Reacción con *p*-CMB

La exposición de CBS férrica (o Fe(III)-CBS) a *p*-CMB llevó a la desaparición de la especie con pico de Soret a 428 nm y a la formación de una especie con máximo de absorbanza a 395 nm sin la presencia de un punto isobéptico claro (Figura 16). El cambio no se dio en un paso único sino que en un proceso multifásico. Como en el experimento de la Figura 16 la concentración de *p*-CMB fue alta (1 mM), la reacción correspondiente a la primera fase ocurrió durante el mezclado de las soluciones y el cambio espectral no se pudo detectar; el espacio entre los dos primeros espectros registrados corresponde a la dilución de la enzima (de 4.35 a 4 μ M) y al transcurso de la primera fase. Para caracterizar la cinética multifásica, se estudió cada fase por separado.

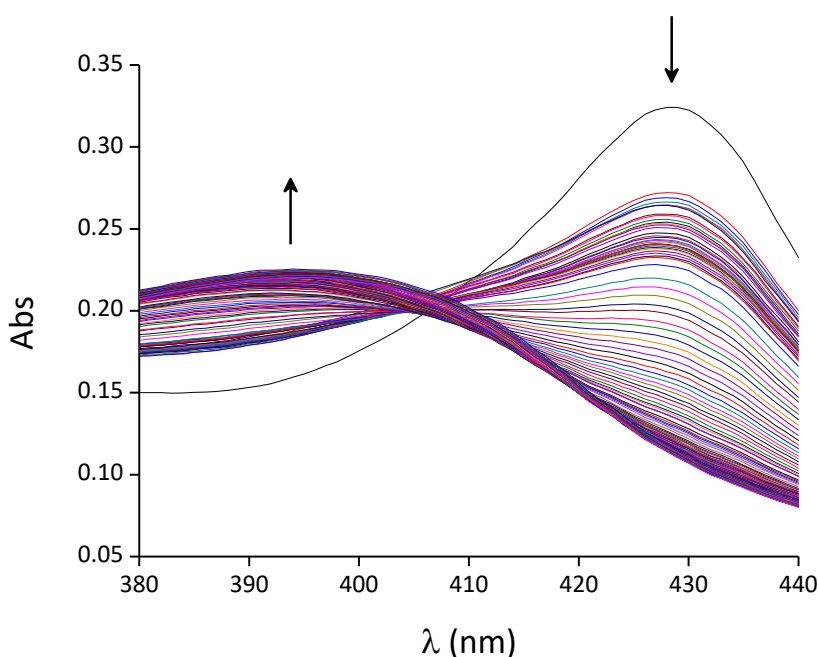


Figura 16. Espectro UV-visible de CBS en presencia de *p*-CMB. Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (4 μ M) con *p*-CMB (1 mM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 $^{\circ}$ C. El primer espectro registrado (negro) corresponde a la CBS (4.35 μ M) antes de añadir *p*-CMB. Durante los primeros 4 min los espectros fueron registrados cada 7 s, en los siguientes 86 min fueron registrados cada 1 min y en los 630 min finales cada 15 min. Las flechas indican la disminución de absorbanza a 428 nm y el aumento a 395 nm. No se detectan isobépticos claros.

Primera fase

Para poder caracterizar la primera fase, se procedió a utilizar concentraciones menores de *p*-CMB. En la Figura 17 se puede observar el cambio espectral de la primera fase de la reacción entre CBS (2 μ M) y *p*-CMB (100 μ M). La absorbancia a 428 nm disminuye, a \sim 390 nm aumenta y a 410 nm se observa un punto isobéptico. Los cambios de absorbancia son pequeños y luego de transcurrir la primera fase, la especie formada todavía mantiene el máximo de absorbancia a 428 nm.

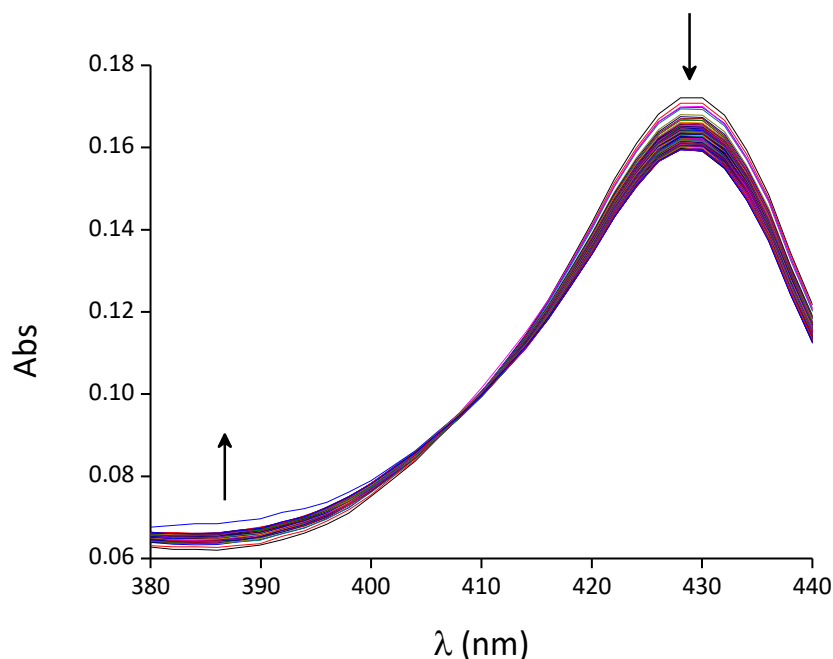


Figura 17. Espectro cinético de la primera fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB. Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (2 μ M) con *p*-CMB (100 μ M) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 $^{\circ}$ C. Los espectros fueron registrados cada 7.6 s durante 20 min. Al finalizar la primera fase se forma una especie con máximo de absorbancia a 428 nm. Las flechas indican la disminución de absorbancia a 428 nm y el aumento a \sim 390 nm. Se observa un punto isobéptico a 410 nm.

Debido a que la cinética de la primera fase es relativamente rápida, esta reacción se caracterizó utilizando un accesorio de flujo detenido acoplado al espectrofotómetro. La cinética se siguió por la disminución de absorbancia a 430 nm al mezclar diferentes concentraciones de *p*-CMB en exceso (al menos diez veces la concentración de enzima) y CBS. La caída de absorbancia para cada concentración de *p*-CMB fue ajustada a una función exponencial más recta durante diez vidas medias utilizando el programa OriginPro 8 (Figura 18-A). Las constantes observadas y las amplitudes obtenidas de cada trazo, permitieron determinar la dependencia hiperbólica de ambos parámetros respecto a la concentración de *p*-CMB (Figura 18-B,C). De la curva de k_{obs} versus $[p\text{-CMB}]$ se determina el valor límite para concentraciones infinitas de *p*-CMB, $0.301 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ (asíntota horizontal), y la concentración de *p*-CMB a la cual k_{obs} es la mitad del máximo, $(7.8 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ M}$. Con el fin de elucidar si la curva parte del origen o no, el experimento se repitió a menores concentraciones del compuesto de mercurio. La gráfica obtenida de los datos

de seis experimentos independientes indica un valor de k_{obs} de $0.009 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ cuando la concentración de $p\text{-CMB}$ es cero (Figura 18-D).

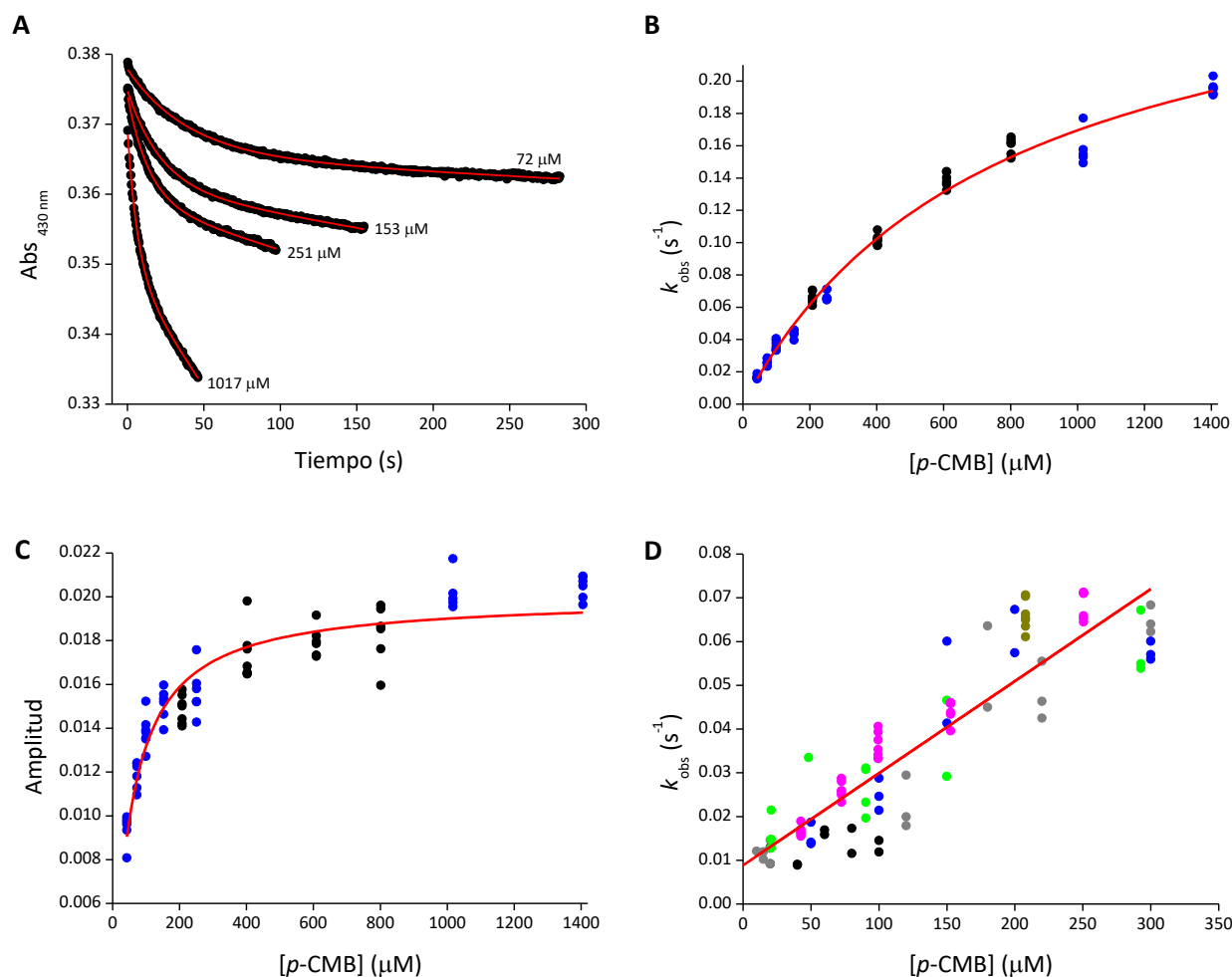


Figura 18. Cinética de la primera fase de la reacción entre CBS y $p\text{-CMB}$. La primera fase se siguió por la caída de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro acoplado a un accesorio de flujo detenido a 25 °C. (A) Algunos de los cursos temporales registrados; corresponden a la reacción entre CBS (4 μM) y $p\text{-CMB}$ (72, 153, 251 y 1017 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Cada trazo (negro) fue ajustado a exponencial más recta (rojo) durante diez vidas medias. Los trazos de dos experimentos independientes con siete registros por concentración muestran (B) la dependencia hiperbólica de las k_{obs} respecto a $[p\text{-CMB}]$, con una asíntota horizontal de $0.301 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ y la $[p\text{-CMB}]$ a la cual k_{obs} es la mitad del máximo, $(7.8 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ M}$, y (C) la dependencia hiperbólica de las amplitudes respecto a la $[p\text{-CMB}]$. (D) k_{obs} versus bajas concentraciones de $p\text{-CMB}$. La ordenada en el origen tiene un valor de $0.009 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$. Las k_{obs} se obtuvieron del ajuste de los trazos a exponencial más recta durante diez vidas medias de seis experimentos independientes con CBS (2 o 4 μM) y $p\text{-CMB}$ ($< 350 \mu\text{M}$) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 °C. Todos los ajustes se realizaron con el programa OriginPro 8.

Segunda y tercera fase

Como se observa en el espectro de la Figura 16, luego de la primera fase rápida hay al menos una fase más lenta. Con el programa OriginPro 8 se seleccionaron los datos de diferentes longitudes de onda y se graficaron los cambios de absorbancia en el tiempo para estudiar la cinética de la reacción o reacciones involucradas. Al seguir la absorbancia a 428 nm se observa un descenso que ajustó hasta los 43200 s (12 h) a una función exponencial más recta con una $k_{\text{obs}} = (116 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, esta constante observada corresponde a la segunda fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB (Figura 19-A). Al seguir la absorbancia a 410 nm se observa un descenso hasta los 2100 s (35 min) y un posterior aumento, indicando la existencia de dos fases lentas luego de la primera fase rápida. Los datos fueron ajustados a una función doble exponencial hasta los 18900 s (5.2 h) ya que después los registros se volvieron ruidosos. De este ajuste se obtuvo una k_{obs} para la segunda fase de $(130 \pm 8) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, similar a la obtenida a 428 nm, y una de $(33 \pm 4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para la tercera fase (Figura 19-B). Para realizar los ajustes de ambas curvas se quitó el primer punto que correspondía a la CBS sin *p*-CMB. No fue posible obtener la constante observada de la tercera fase a partir de la curva de 428 nm ya que el ajuste a doble exponencial no es bueno; la especie con máximo a 428 nm formada al final de la primera fase desaparece completamente en la segunda fase.

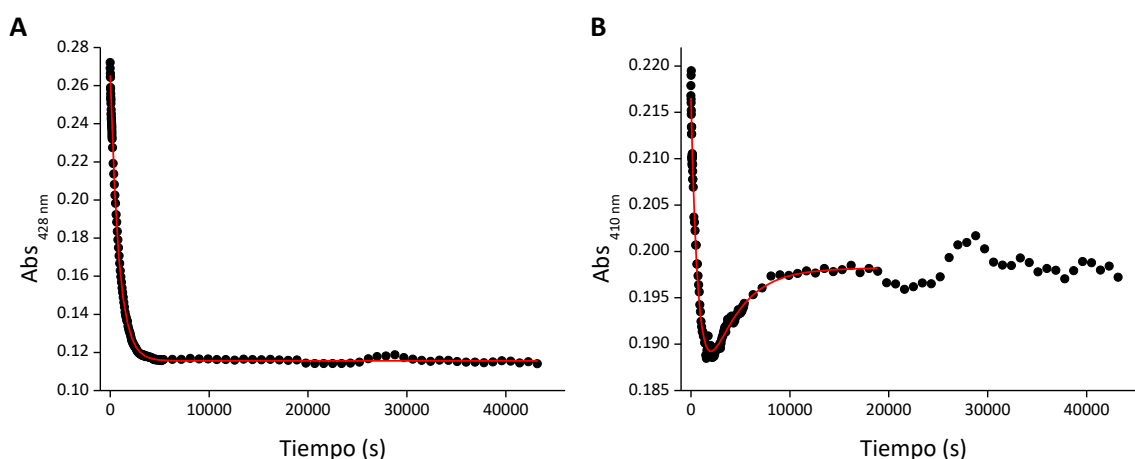


Figura 19. Cursos temporales de la segunda y tercera fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB. Reacción entre CBS (4 μM) y *p*-CMB (1 mM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 °C. Los cursos temporales a (A) 428 nm y a (B) 410 nm se ajustaron a exponencial más recta y doble exponencial (rojo) respectivamente con OriginPro 8. Del ajuste de los datos a 428 nm se obtuvo una $k_{\text{obs}2} = (116 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y del ajuste a 410 nm se obtuvieron $k_{\text{obs}2} = (130 \pm 8) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{obs}3} = (33 \pm 4) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Al analizar en profundidad los espectros de la Figura 16 separándolos por fase, se observa que en la segunda fase de la reacción (0-39 min) la especie a 428 nm, formada en la primera fase, se convierte en una especie con máximo a 391 nm. En la tercera fase (40-720 min), esta especie a 391 nm se convierte en otra con máximo a 395 nm (Figura 20).

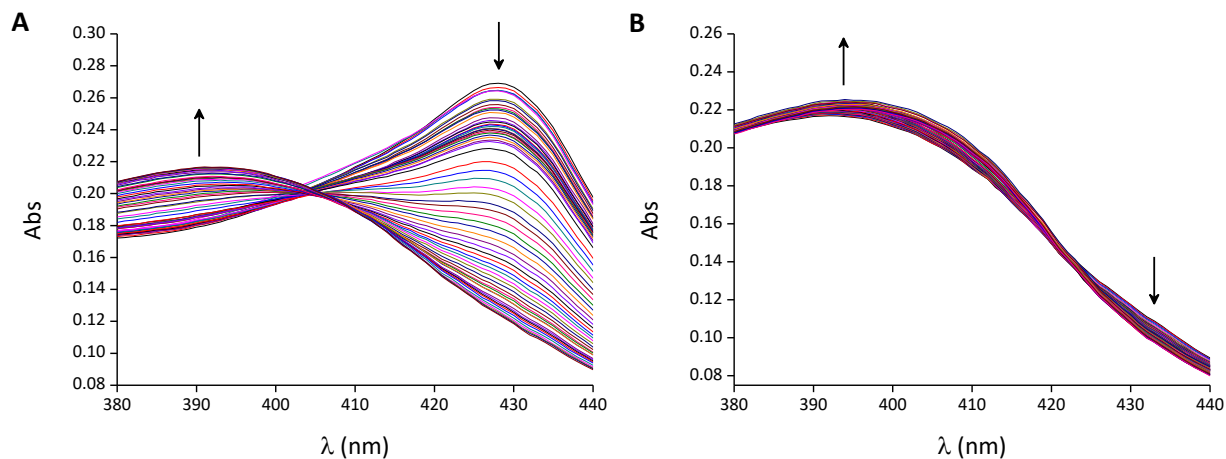


Figura 20. Espectros cinéticos de las segunda y tercera fases de la reacción. Registro de los espectros cinéticos UV-visible al mezclar CBS ($4 \mu\text{M}$) con *p*-CMB (1 mM) en amortiguador Tris (0.1 M , $\text{pH } 7.4$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. (A) Segunda fase, espectros registrados entre 0 y 39 min. Las flechas indican la disminución de absorbancia a 428 nm y el aumento a 391 nm . Se detecta un punto isobéptico a 404 nm . (B) Tercera fase, espectros registrados entre 40 y 720 min (12 h). Las flechas indican la disminución de absorbancia entre 420 y 440 nm y el aumento a 395 nm .

Con el objetivo de obtener una constante cinética para la segunda fase de la reacción entre la enzima y *p*-CMB, se siguió la reacción entre CBS ($2 \mu\text{M}$) y distintas concentraciones de *p*-CMB ($0, 50, 100, 200, 500, 800, 1000$ y $1200 \mu\text{M}$) por duplicado a 430 nm durante doce horas y media en un lector de placas. Las mezclas se llevaron a cabo en amortiguador Tris (0.1 M , $\text{pH } 7.4$) y las medidas se tomaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Cada curso temporal se ajustó a una función exponencial más recta utilizando el programa OriginPro 8. En las reacciones con *p*-CMB $\leq 200 \mu\text{M}$, las doce horas y media no fueron suficientes para poder realizar un ajuste durante diez vidas medias y por lo tanto se realizó hasta el último punto registrado. Los trazos de las reacciones restantes fueron ajustados hasta diez vidas medias (Figura 21-A). De los ajustes a los cursos temporales se obtuvieron las constantes observadas para cada concentración. Al graficar las constantes observadas versus la concentración del compuesto de mercurio, se observó una dependencia lineal que permitió determinar la constante cinética de la segunda fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB, $k_2 = 0.74 \pm 0.06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 21-B). También se graficaron las amplitudes obtenidas de los ajustes para cada concentración versus la concentración de *p*-CMB, pero no se observa una clara relación entre ambas variables (Figura 21-C).

De los cursos temporales de la Figura 21, no se pudieron determinar las constantes observadas correspondientes a la tercera fase y como consecuencia no se obtuvo un valor de la constante cinética de la tercera fase. Esta reacción no se siguió estudiando.

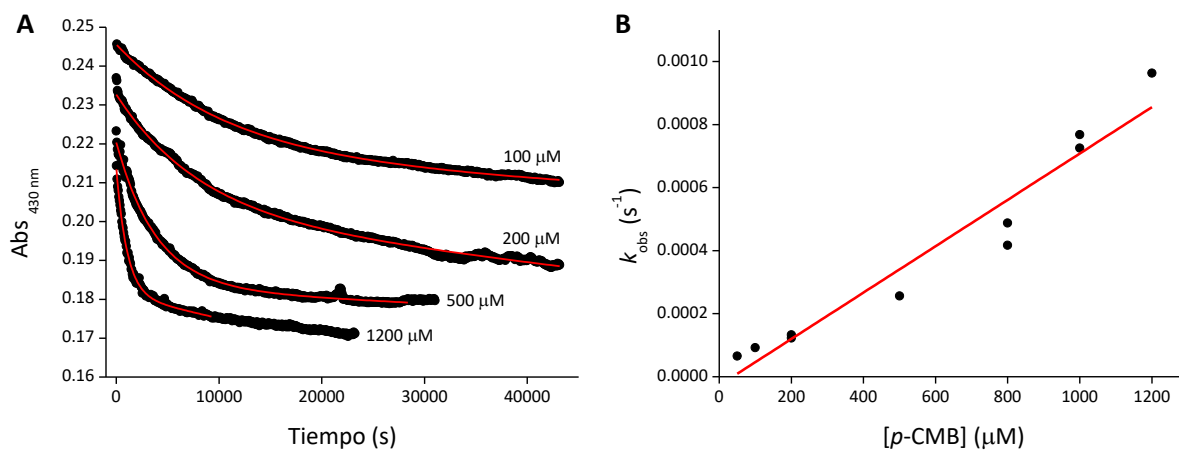


Figura 21. Cinética de la segunda fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB. La segunda fase se siguió por caída de absorbancia a 430 nm durante doce horas y media a 25 °C. (A) Algunos de los cursos temporales registrados; corresponden a la reacción entre CBS (2 μM) y *p*-CMB (100, 200, 500 y 1200 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Cada trazo (negro) fue ajustado a exponencial más recta (rojo) hasta el último punto registrado (50-200 μM) o durante diez vidas medias (500-1200 μM) con OriginPro 8. (B) Las constantes observadas obtenidas para cada concentración dependen linealmente de la concentración de *p*-CMB. La pendiente de la gráfica, que representa la constante cinética de la segunda fase, vale $0.74 \pm 0.06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y el $R^2 = 0.93536$. (C) Las amplitudes obtenidas de los cursos temporales no muestran una clara dependencia con la concentración de *p*-CMB.

En suma, la reacción entre la CBS férrica y el *p*-CMB convierte al hemo con el pico a 428 nm en una especie con máximo a 395 nm. Esta reacción se lleva a cabo en tres fases, la cinética y los cambios espectrales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Reacción entre el hemo de la CBS y *p*-CMB

Fase	k_{obs} versus [p-CMB]	Parámetros de k_{obs} versus [p-CMB]	Amplitud versus [p-CMB]	λ máxima del producto	Punto isobéptico
Primera	Hipérbola	$k_{\text{obs [p-CMB]} \rightarrow \infty} = 0.301 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{obs [p-CMB]} \rightarrow 0} = 0.009 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ $[\text{p-CMB}]_{1/2 k_{\text{obs máx.}}} = (7.8 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ M}$	Hipérbola	428 nm	410 nm
Segunda	Recta	$\Delta k_{\text{obs}} / \Delta [\text{p-CMB}] = 0.74 \pm 0.06 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{obs [p-CMB]=0}} \sim 0 \text{ s}^{-1}$	Constante	391 nm	404 nm
Tercera	ND	ND	ND	395 nm	No tiene

Todos los resultados fueron obtenidos de experimentos realizados a 25 °C en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). ND: no determinado.

Cambios espectrales en la zona de baja energía

Para estudiar si la exposición de CBS a *p*-CMB genera cambios en la región de baja energía del espectro de la enzima, se mezcló CBS 37 μM y *p*-CMB 300 μM (concentraciones finales) y se registraron espectros cada ~ 32 s durante 1 hora barriendo el rango 500-800 nm. Las soluciones se mezclaron en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) y las medidas se realizaron a 25 $^{\circ}\text{C}$. En la Figura 22 se puede observar que la absorbancia disminuye a lo largo del tiempo en todo el rango de longitudes de onda, probablemente debido a cambios en el estado de agregación de la proteína durante el experimento. Para determinar si la disminución de absorbancia en todo el rango fue pareja para cada longitud de onda o no, se realizó un espectro diferencial calculado como $\text{Abs}(\text{último registro}) - \text{Abs}(\text{CBS sin } p\text{-CMB})$. En el espectro diferencial aparece un máximo a 626 nm indicando el aumento de absorbancia a esa longitud de onda y un mínimo a ~ 550 nm indicando la disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda (inserto de la Figura 22). La incubación de CBS con peroxinitrito genera cambios en la zona de baja energía del espectro de la enzima incluyendo la disminución de absorbancia a 550 nm y el aumento a 630 nm (105). Sin embargo, el significado de estos cambios espectrales es desconocido. El *p*-CMB también genera una disminución en la absorbancia a 650-750 nm (inserto de la Figura 22). Teniendo en cuenta que el rango 645-705 nm corresponde a la banda de transferencia de carga tiolato-hemo (168), la disminución de absorbancia a 650-750 nm se asocia con la pérdida de la unión hemo-tiolato.

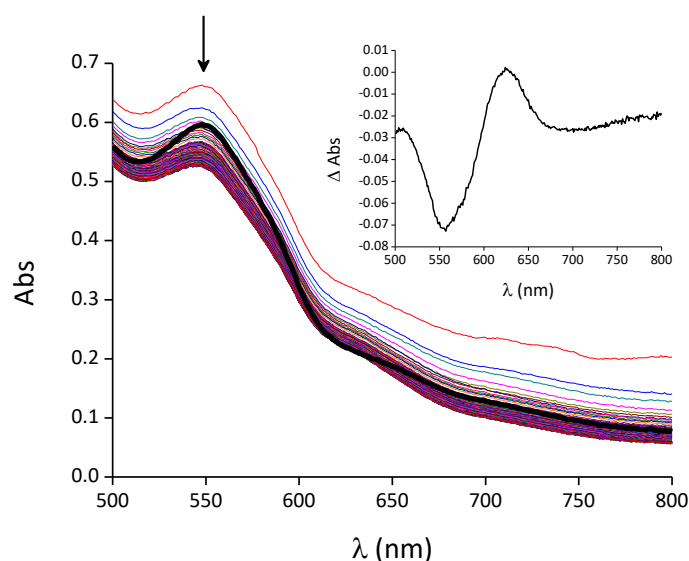


Figura 22. Cambios en la zona de baja energía del espectro de CBS al ser expuesta a *p*-CMB. Espectro cinético al mezclar CBS 37 μM y *p*-CMB 300 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 $^{\circ}\text{C}$. El espectro de CBS sin *p*-CMB se diferencia por un trazo negro más grueso. Los espectros fueron registrados cada ~ 32 s durante 1 hora. Se observa una disminución en la absorbancia en todo el rango de longitudes de onda. Inserto: espectro diferencial calculado como $\text{Abs}(\text{último registro}) - \text{Abs}(\text{CBS sin } p\text{-CMB})$ de forma que el máximo (626 nm) representa un aumento de absorbancia y los mínimos (~ 550 nm y 650-750 nm) indican la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo.

5.1.2. Reacción con HgCl₂

El HgCl₂ reacciona con el hemo de la CBS en un proceso multifásico. En este proceso, el hemo con máximo de absorbancia a 428 nm se convierte en una especie con máximo a 390 nm sin puntos isobéuticos claros (Figura 23). Para estudiar los cambios espectrales de cada fase por separado, se registraron espectros sucesivos en el tiempo de CBS expuesta a diferentes concentraciones de HgCl₂ y luego se analizaron separadamente los espectros correspondientes a cada fase. Las soluciones se mezclaron en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Cada espectro se registró a 25 °C en el rango 250-800 o 380-440 nm y la concentración de HgCl₂ fue al menos diez veces la concentración de enzima.

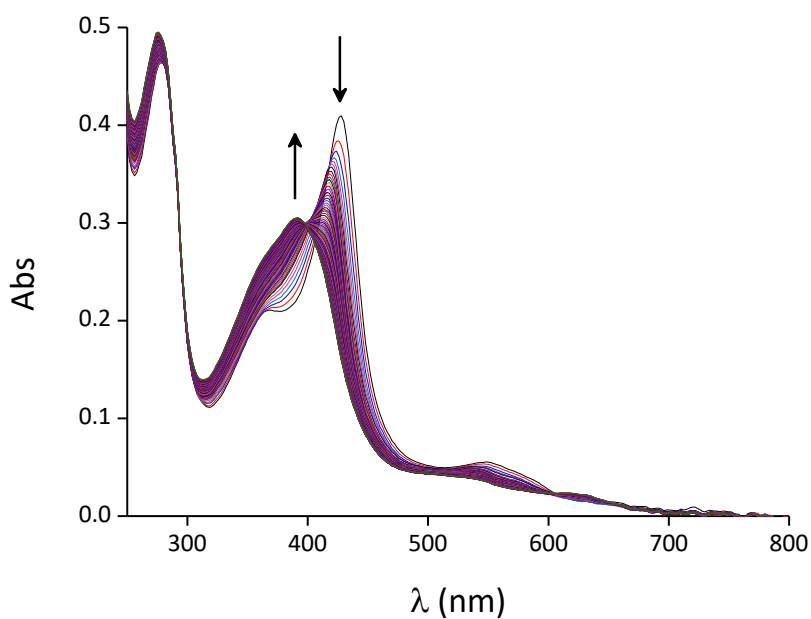


Figura 23. Espectro UV-visible de CBS en presencia de HgCl₂. Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (5 μM) con HgCl₂ (75 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 °C. Los espectros fueron registrados cada 58 s durante 90 min. Las flechas indican la disminución de absorbancia a 428 nm y el aumento a 390 nm.

Primera fase

Los cambios espectrales de la primera fase se detectan al mezclar CBS con $\text{HgCl}_2 \leq 100 \mu\text{M}$; a mayores concentraciones de HgCl_2 , la primera fase transcurre durante el mezclado de las soluciones. Al analizar la primera fase de la reacción entre CBS y diferentes concentraciones de HgCl_2 (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75 y $100 \mu\text{M}$) se observa que la absorbancia a 428 nm disminuye y a $\sim 390 \text{ nm}$ aumenta formando un punto isobéptico a 414-416 nm. La disminución del pico a 428 nm se ve acompañada de un corrimiento tal que al finalizar la primera fase de la reacción se forma una especie con máximo de absorbancia a 422-424 nm.

A modo de ejemplo, en la Figura 24 se visualiza el cambio espectral generado en la primera fase de la reacción entre CBS $2 \mu\text{M}$ y $\text{HgCl}_2 20 \mu\text{M}$. La primera fase ocurrió durante los primeros 350 s (5.8 min). A lo largo de esta fase, la absorbancia a $\sim 390 \text{ nm}$ aumenta y a 428 nm decrece formando finalmente una especie con máximo de absorbancia a 424 nm. También se detecta un punto isobéptico a 414 nm. Al graficar el curso temporal de la reacción a 414 nm, se observa que durante los primeros 350 s la absorbancia no varía, afirmando la formación de un punto isobéptico (inserto de la Figura 24).

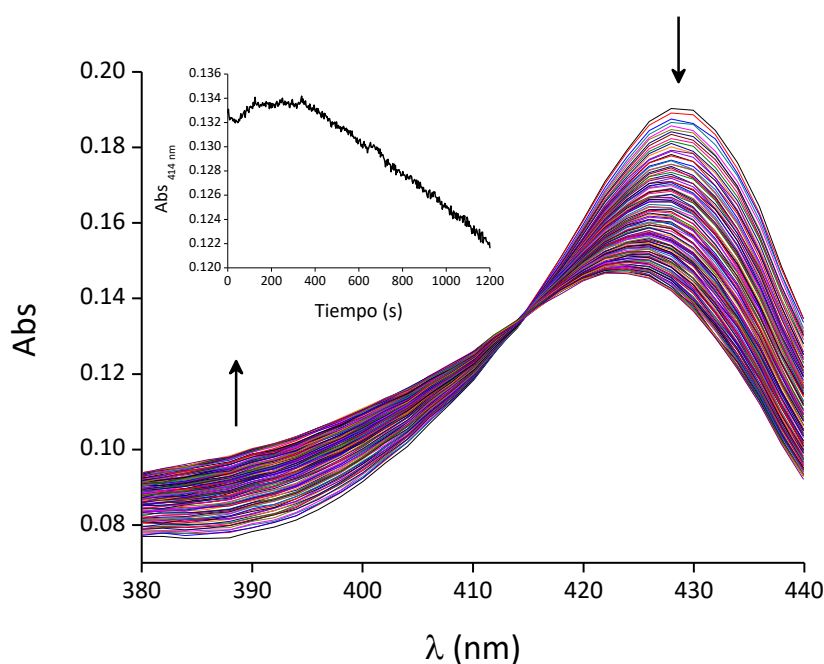


Figura 24. Espectro cinético de la primera fase de la reacción entre CBS y HgCl_2 . Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS ($2 \mu\text{M}$) con HgCl_2 ($20 \mu\text{M}$) en amortiguador Tris (0.1 M , $\text{pH } 7.4$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros fueron registrados cada $\sim 3 \text{ s}$ durante 20 min y se muestran los primeros 350 s de la reacción. Al finalizar la primera fase se forma una especie con máximo de absorbancia a 424 nm. Las flechas indican la disminución de absorbancia a 428 nm y el aumento a $\sim 390 \text{ nm}$. Se observa un punto isobéptico a 414 nm. Inserto: curso temporal a 414 nm, la absorbancia se mantiene constante durante los primeros 350 s.

Para poder estudiar la cinética del proceso de la reacción a concentraciones mayores que $100 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , se siguió la reacción por absorbancia a 430 nm con un accesorio de flujo detenido.

Los trazos de disminución de absorbancia de dos experimentos independientes fueron ajustados a doble exponencial más recta con el programa OriginPro 8 de modo que se obtuvieron dos constantes observadas para cada concentración de HgCl_2 , correspondientes a las dos primeras fases de la reacción entre la enzima y HgCl_2 (Figura 25-A). Con concentraciones de HgCl_2 menores a $90 \mu\text{M}$ aparece una fase “cero” que no permite un buen ajuste a doble exponencial más recta. Esta fase se desarrolla en los primeros 10 s y tiene una k_{obs} de $\sim 0.2 \text{ s}^{-1}$ y una amplitud muy chica de 0.008-0.012 que dificulta su caracterización. Luego de la fase cero el máximo de absorbancia continúa a 428 nm. Los parámetros mencionados de la fase cero surgieron del ajuste a una función exponencial más recta de los primeros 20 s de las reacciones con concentración de $\text{HgCl}_2 < 90 \mu\text{M}$. Para determinar los valores de k_{obs} de la primera y segunda fase, se quitaron de estos trazos los puntos correspondientes a la fase cero. A concentraciones mayores a $\text{HgCl}_2 90 \mu\text{M}$, la fase cero no se pudo visualizar.

En la Figura 25-B se observa cómo las k_{obs} de la primera fase dependen hiperbólicamente de la concentración de HgCl_2 con una asíntota horizontal de $0.4 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$. La concentración de HgCl_2 a la cual k_{obs} es la mitad del máximo es $(4 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ M}$. Aunque los experimentos se realizaron con distintas concentraciones de HgCl_2 en el rango 39-1309 μM , las k_{obs} obtenidas de los cursos temporales con $\text{HgCl}_2 > 256 \mu\text{M}$ no fueron utilizadas para calcular las constantes cinéticas porque a altas concentraciones de HgCl_2 es muy difícil separar las dos primeras fases. Al ajustar a una función lineal las k_{obs} correspondientes a $\text{HgCl}_2 39\text{-}59 \mu\text{M}$, se obtuvo una ordenada en el origen de $0.0067 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ (Figura 25-C). Las amplitudes de los cursos temporales de la primera fase también parecen depender hiperbólicamente de la concentración de HgCl_2 (Figura 25-D).

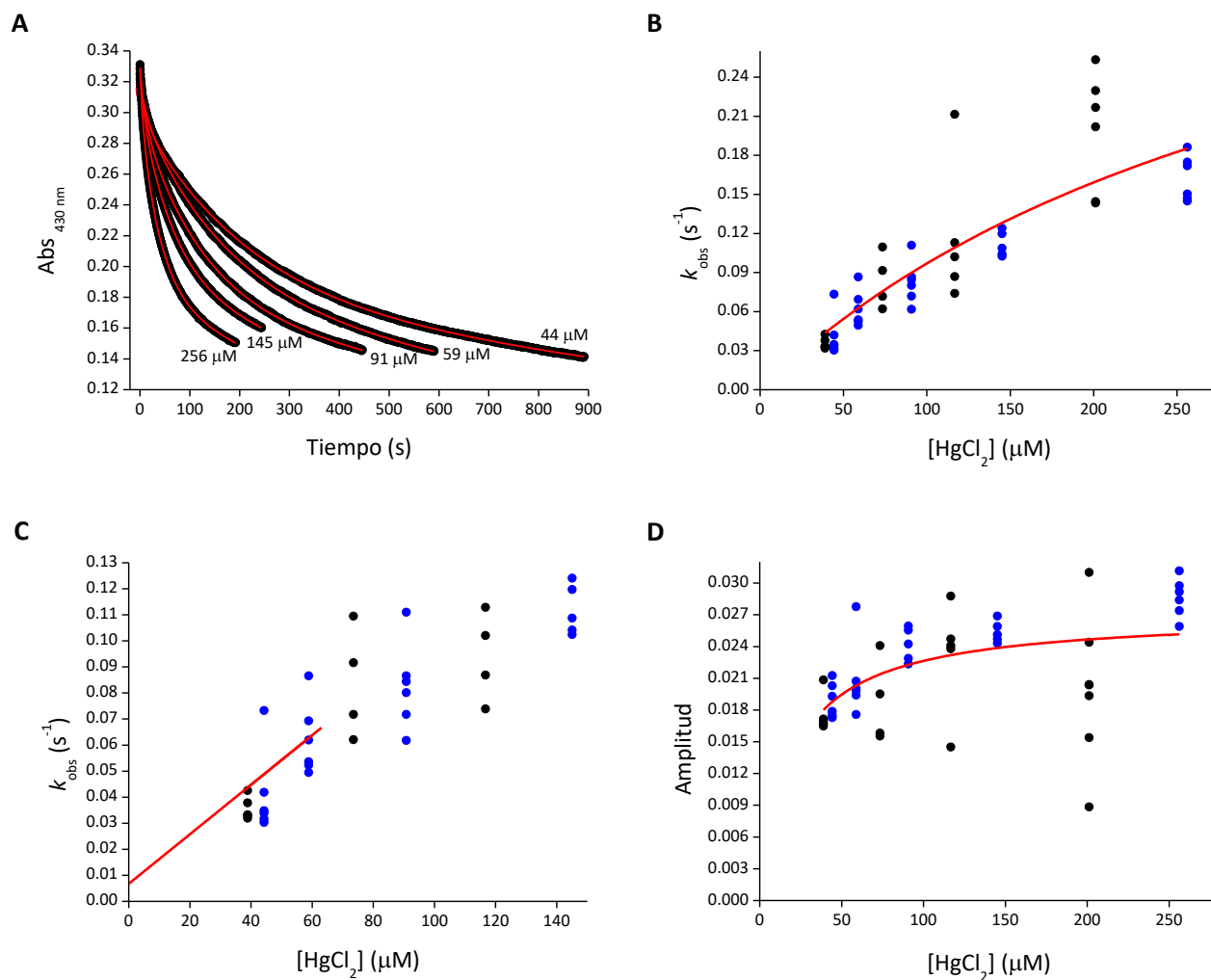


Figura 25. Cinética de la primera fase de la reacción entre CBS y HgCl₂. La primera fase se siguió por la caída de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro acoplado a un accesorio de flujo detenido a 25 °C. (A) Algunos de los cursos temporales registrados; corresponden a la reacción entre CBS (4 μM) y HgCl₂ (44, 59, 91, 145 y 256 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Cada trazo (negro) fue ajustado a doble exponencial más recta (rojo), antes de ajustar los trazos con HgCl₂ < 90 μM, se eliminaron los puntos correspondientes a los primeros 10 s (fase “cero”, ver texto). Los cursos temporales de dos experimentos independientes con siete registros por concentración muestran (B) la dependencia hiperbólica de las k_{obs} respecto a [HgCl₂] con una asíntota horizontal de $0.4 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$, la [HgCl₂] a la cual k_{obs} es la mitad del máximo con un valor de $(4 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ M}$, (C) la ordenada en el origen de $0.0067 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ y (D) la dependencia hiperbólica de las amplitudes respecto a [HgCl₂]. Todos los ajustes se realizaron con el programa OriginPro 8.

Segunda fase

Previamente se mencionó que se registraron espectros sucesivos en el tiempo con diferentes concentraciones de HgCl_2 y luego se dividieron los espectros por fases para poder analizar los cambios espectrales de las mismas. De los espectros correspondientes a la segunda fase se concluye que la absorbancia a ~ 390 nm aumenta y la absorbancia del pico a 422-424 nm, formado al finalizar la primera fase, disminuye y sufre un corrimiento para formar una especie con máximo a 418 nm. Aunque no tan claro como en la primera fase, en esta fase también se forma un punto isobéptico, en este caso a 406-408 nm.

Continuando con el ejemplo anterior, en la Figura 26-A se observa el cambio espectral generado en la segunda fase de la reacción entre CBS $2 \mu\text{M}$ y HgCl_2 $20 \mu\text{M}$. En este caso los espectros graficados son los registrados entre 355 y 721 s. En este espectro cinético se visualiza tanto la conversión de la especie de 424 nm a la especie de 418 nm como el punto isobéptico a 408 nm. Al graficar el curso temporal de la reacción a 408 nm, se observa que durante los primeros 350 s la absorbancia aumenta (primera fase), entre 355 y 721 s se mantiene constante (segunda fase) y de 721 a 1200 s disminuye (tercera fase) (Figura 26-B).

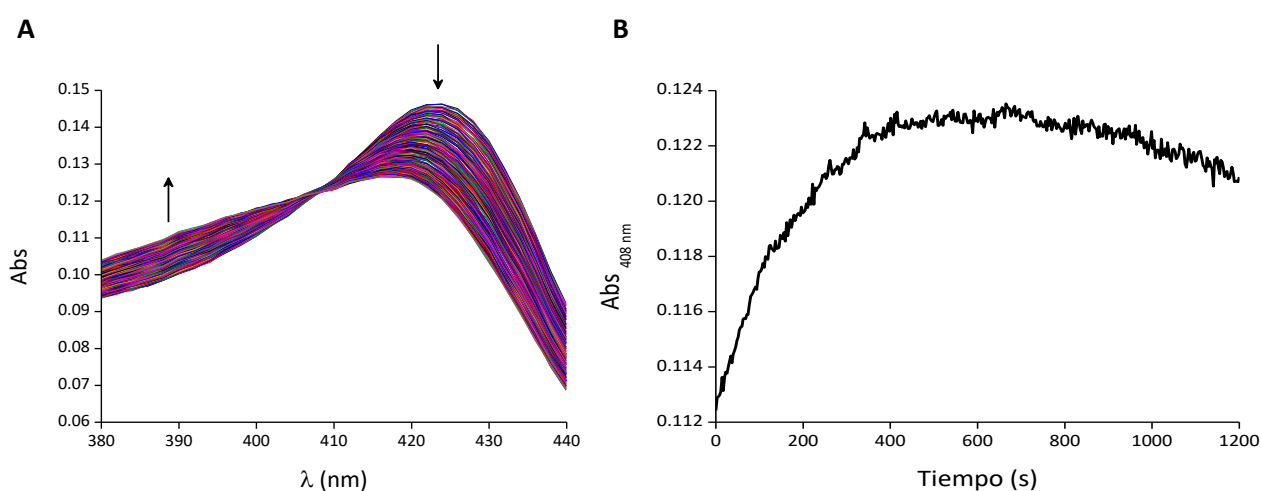


Figura 26. Espectro cinético de la segunda fase de la reacción entre CBS y HgCl_2 . Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS ($2 \mu\text{M}$) con HgCl_2 ($20 \mu\text{M}$) en amortiguador Tris (0.1 M , pH 7.4) a 25°C . Los espectros fueron registrados cada ~ 3 s durante 20 min. (A) Espectros registrados entre los 355 y 721 s de la reacción. Las flechas indican la disminución de absorbancia a 424 nm y el aumento a ~ 390 nm. Al finalizar la primera fase se forma una especie con máximo de absorbancia a 418 nm. Se observa un punto isobéptico a 408 nm. (B) Curso temporal a 408 nm, la absorbancia se mantiene constante entre 355 y 721 s.

Para determinar la constante cinética de la segunda fase de la reacción, se utilizaron las k_{obs} obtenidas de los cursos temporales a 430 nm de la Figura 25-A y de otros seis experimentos independientes en los que no se utilizó el accesorio de flujo detenido; las k_{obs} se obtuvieron ajustando la caída de absorbancia a doble exponencial. Dependiendo de la concentración de enzima y HgCl_2 , y del tiempo entre cada medida, en algunos casos la k_{obs} de la segunda fase corresponde a la constante más chica y en otros a la más grande. En la Figura 27 se ven algunos ejemplos de la disminución de absorbancia a 430 nm sin utilizar el accesorio de flujo detenido.

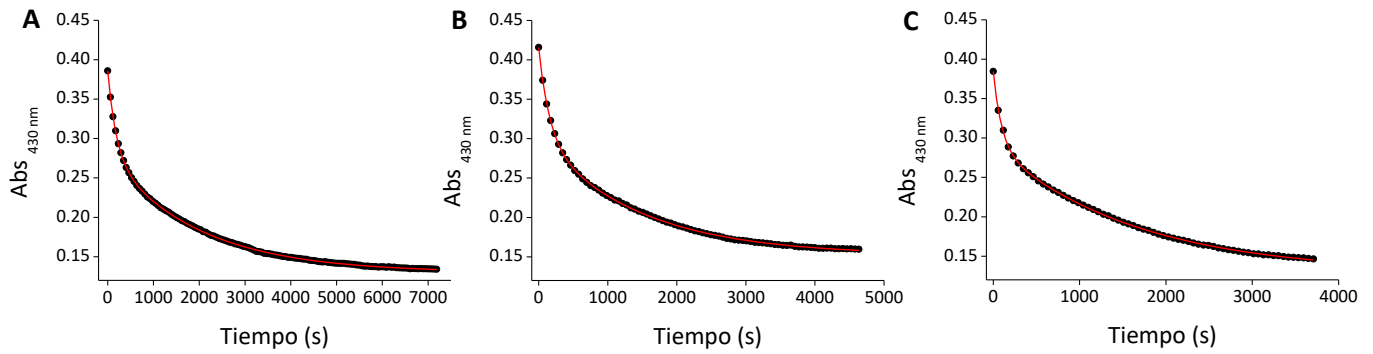


Figura 27. Cursos temporales a 430 nm de la segunda fase de la reacción entre CBS y HgCl₂. Caída de absorbancia a 430 nm a 25 °C al mezclar CBS 5 μM y HgCl₂ (A) 50, (B) 100 y (C) 120 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Estos trazos corresponden a experimentos en los cuales no se utilizó un accesorio de flujo detenido. De los ajustes a doble exponencial (rojo) con el programa OriginPro 8 se obtuvieron dos constantes observadas para cada concentración de HgCl₂, las de mayor valor corresponden a las k_{obs} para la segunda fase.

De la Figura 28-A, en la que se grafican las k_{obs} de los ocho experimentos independientes respecto a la concentración de HgCl₂, se observó una correlación lineal y se determinó el valor de la constante cinética de la segunda fase, $106 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Al igual que para la primera fase, no se graficaron las k_{obs} de las corridas con HgCl₂ > 256 μM porque a estas concentraciones las dos primeras fases se solapan. Debido a que en los diferentes experimentos se utilizaron distintas concentraciones de CBS, las amplitudes obtenidas de los diferentes cursos temporales se compararon únicamente cuando la concentración de enzima utilizada fue la misma. Es así que se tienen tres gráficas de amplitud que corresponden a CBS 2, 4 y 5 μM. De las gráficas se concluye que la amplitud en esta fase no varía (Figura 28-B,C,D).

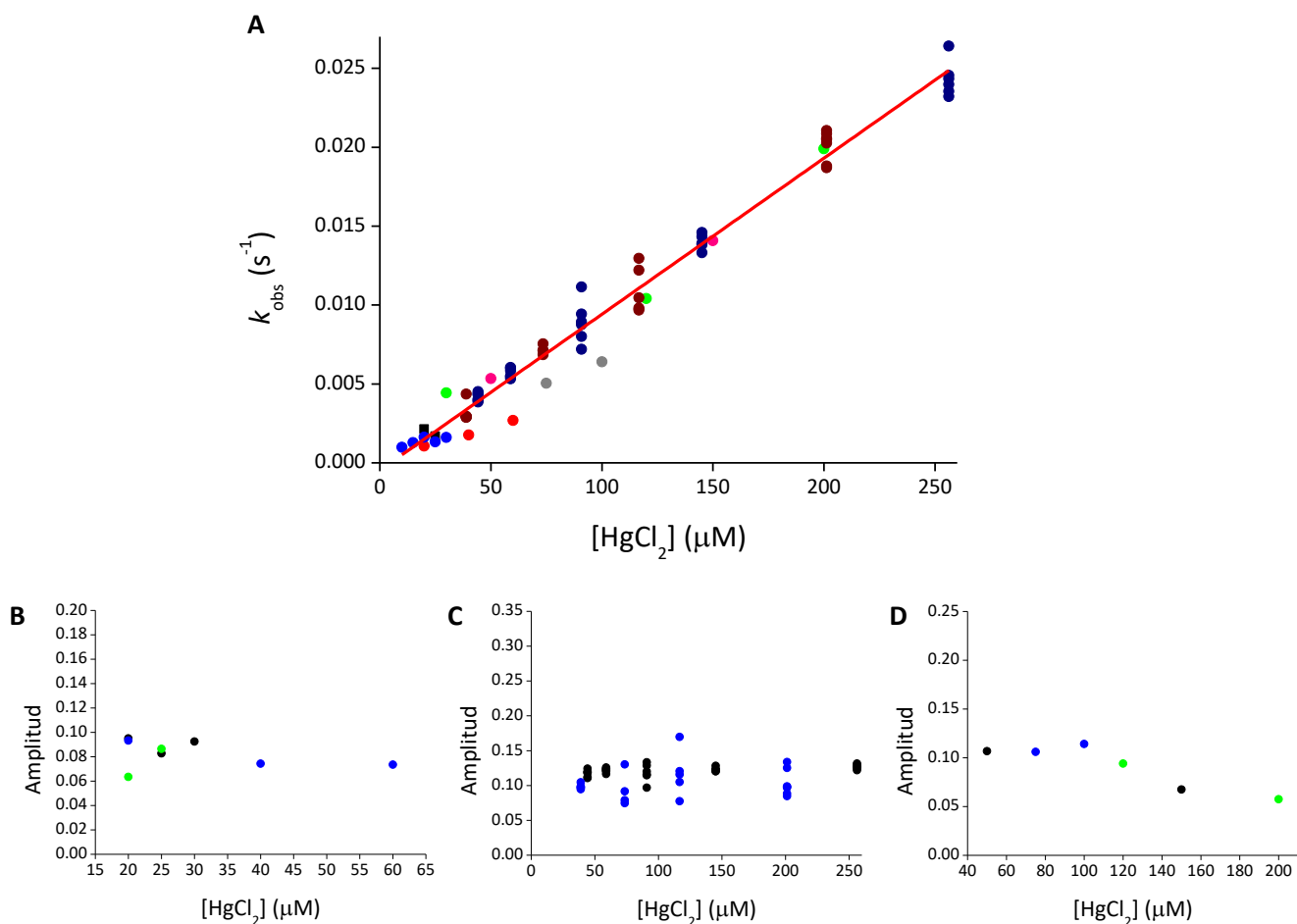


Figura 28. Constante cinética y amplitud de la segunda fase de la reacción entre CBS y HgCl_2 . La cinética de la segunda fase se estudió a partir de la caída de absorbancia a 430 nm a 25 °C en dos experimentos con un espectrofotómetro acoplado a un accesorio de flujo detenido y en seis experimentos sin el accesorio. Los trazos fueron ajustados a doble exponencial más recta o doble exponencial. (A) Las k_{obs} correspondientes a la segunda fase obtenidas de los ajustes dependen linealmente de la concentración de HgCl_2 . La pendiente de la gráfica, que representa la constante cinética de la segunda fase, vale $106 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y el $R^2 = 0.99012$. Las amplitudes obtenidas de los ajustes tienden a mantenerse constantes respecto a la concentración de HgCl_2 en los experimentos donde se utilizó CBS (B) 2 μM , (C) 4 μM y (D) 5 μM .

Tercera fase

De los espectros sucesivos en el tiempo se concluye que hay una tercera fase en la cual la especie con máximo de absorbancia a 418 nm, formada en la segunda fase, se convierte en una especie con máximo a 390-391 nm. Además, este cambio espectral está acompañado de la formación de un punto isobéptico a 398 nm. En la Figura 29-A se observan los espectros correspondientes a la tercera fase de la reacción entre CBS 5 μM y HgCl_2 120 μM . Los espectros fueron registrados cada 58 s durante 5160 s (86 min), los correspondientes a la tercera fase se registraron desde los 406 s. No obstante, al cabo de 2608 s (43 min) comienza a subir la absorbancia en todo el rango de longitudes de onda, consistente con turbiedad, y por lo tanto esos espectros no fueron considerados. Al graficar el curso temporal de la reacción a 398 nm se observa que desde 406 hasta 2608 s la absorbancia se mantiene constante, afirmando la presencia del punto isobéptico (Figura 29-B).

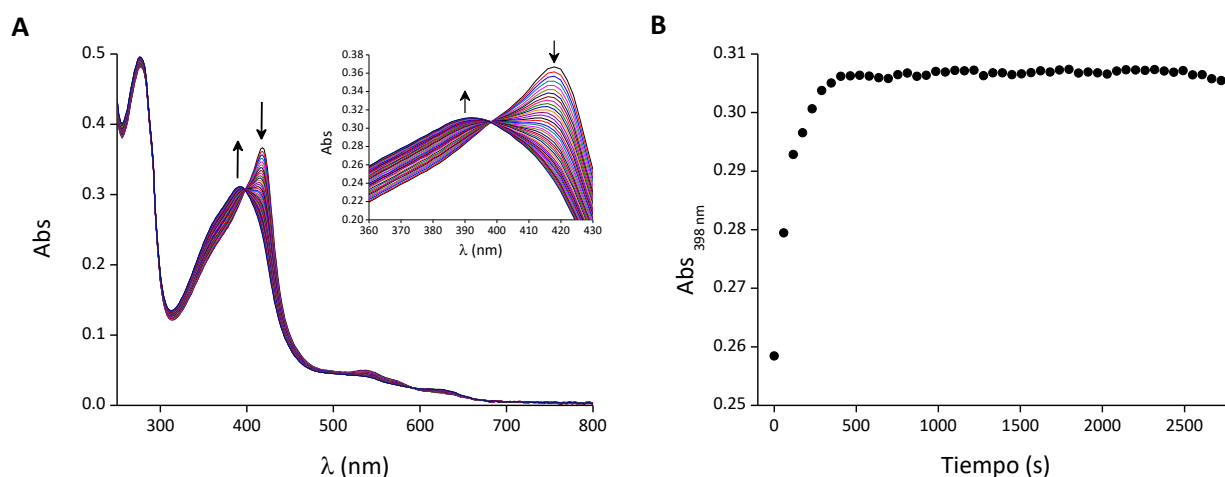


Figura 29. Espectro cinético de la tercera fase de la reacción entre CBS y HgCl_2 . (A) Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (5 μM) con HgCl_2 (120 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 °C. Los espectros fueron registrados cada 58 s durante 5160 s (86 min) pero se representan los comprendidos en el rango 406-2608 s (7-43 min). Las flechas indican la disminución de absorbancia a 418 nm y el aumento a 391 nm. Se observa un punto isobéptico a 398 nm. Inserto: visualización del punto isobéptico a 398 nm, los espectros corresponden a los mismos que en (A) graficados en otra escala. (B) Curso temporal a 398 nm, la absorbancia se mantiene constante a partir de 406 s.

De los experimentos realizados con CBS 3 o 5 μM y HgCl_2 30, 50, 75, 100, 120 y 150 μM se obtuvieron valores de k_{obs} de $\sim 0.0005 \text{ s}^{-1}$ para la tercera fase, indicando que esta fase es independiente de la concentración de HgCl_2 (Figura 30-A). Debido a la turbiedad después de cierto período de tiempo, las k_{obs} fueron ajustadas durante 4-7 vidas medias. Asimismo, las amplitudes obtenidas de los ajustes de los experimentos con CBS 5 μM tampoco dependen de la concentración de HgCl_2 (Figura 30-B).

Con el fin de caracterizar mejor la cinética de la tercera fase, se siguió la reacción entre CBS (2 μM) y HgCl_2 (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 μM) a 430 nm durante doce horas en un lector de placas. Sin embargo el hecho de que los registros fueran cada 1 min y debido a que a los ~ 30

min las muestras presentaron turbiedad, se obtuvieron muy pocos puntos por curso temporal y no se pudieron extraer conclusiones.

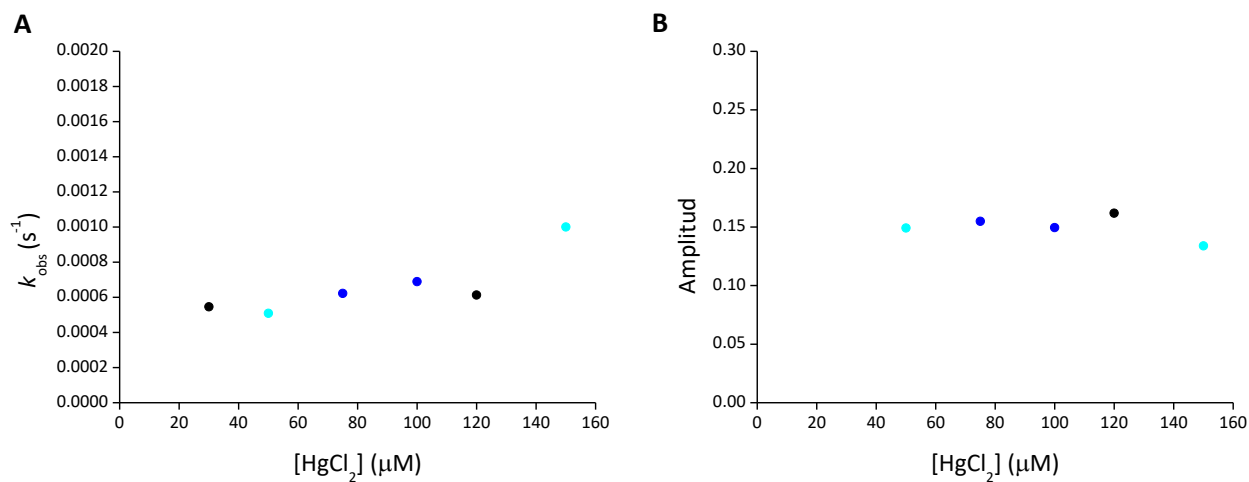


Figura 30. Constante cinética y amplitud de la tercera fase de la reacción entre CBS y HgCl₂. La cinética de la tercera fase se estudió a partir de la caída de absorbancia a 430 nm a 25 °C. Se siguió la reacción entre CBS (3 o 5 μM) y HgCl₂ (30, 50, 75, 100, 120, 150 y 200 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) en tres experimentos independientes. Los trazos fueron ajustados a doble exponencial siendo la k_{obs} de menor valor la correspondiente a la tercera fase. (A) Las k_{obs} para cada concentración de HgCl₂ y (B) las amplitudes de los experimentos con CBS 5 μM correspondientes a la tercera fase son independientes de la concentración de HgCl₂.

Resumiendo, el HgCl₂ reacciona con el hemo de la CBS férrica en tres fases principales. En algunos experimentos con HgCl₂ < 90 μM se observó un primer proceso rápido al que se denominó fase cero. Se decidió no caracterizarla debido a su pequeña amplitud y a que solo se manifestaba a concentraciones muy bajas de HgCl₂. Al cabo de las tres fases principales, el pico del hemo hexacoordinado a 428 nm, se convierte en una especie con máximo a 390 nm. En la Tabla 4 se resumen las características de cada fase.

Tabla 4. Reacción entre el hemo de la CBS y HgCl₂

Fase	k_{obs} versus [HgCl ₂]	Parámetros de k_{obs} versus [HgCl ₂]	Amplitud versus [HgCl ₂]	λ máxima del producto	Punto isosbético
Cero	ND	$k_{\text{obs}} \sim 0.2 \text{ s}^{-1}$	ND	428 nm	ND
Primera	Hipérbola	$k_{\text{obs [HgCl}_2 \rightarrow \infty} = 0.4 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{obs [HgCl}_2 \rightarrow 0} = 0.0067 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$ $[\text{HgCl}_2]_{\frac{1}{2} k_{\text{obs máx.}}} = (4 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ M}$	Hipérbola	422-424 nm	414-416 nm
Segunda	Recta	$\Delta k_{\text{obs}}/\Delta[\text{HgCl}_2] = 106 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{\text{obs [HgCl}_2=0} \sim 0 \text{ s}^{-1}$	Constante	418 nm	406-408 nm
Tercera	Constante	$k_{\text{obs}} \sim 0.0005 \text{ s}^{-1}$	Constante	390 nm	398 nm

Todos los resultados fueron obtenidos de experimentos realizados a 25 °C en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). La fase cero solo se observó en los experimentos con HgCl₂ < 90 μM, tiene una amplitud muy chica y se desarrolla en los primeros 10 s de la reacción. ND: no determinado.

Cambios espectrales en la zona de baja energía

En la Figura 31 se observan los cambios espectrales de la CBS 5 μM al reaccionar con HgCl_2 100 μM . Además de la disminución a 428 nm y el aumento a 390 nm, se visualizan variaciones en la región de baja energía. Al igual que con *p*-CMB, al realizar el espectro diferencial calculado como $\text{Abs}(\text{último registro}) - \text{Abs}(\text{primer registro})$, se ve un máximo a 624 nm, indicando el aumento de absorbancia a dicha longitud de onda, y mínimos a ~ 550 nm y entre 650 y 750 nm indicando la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo. La disminución a 645-705 nm indica la pérdida de la unión hemo-tiolato (168). Los cambios de absorbancia a 406 y 398 nm (isobésticos de la segunda y tercera fase) permiten determinar el tiempo en el que transcurre cada fase (Figura 31-B,C). La primera transcurre en 0-232 s, la segunda en 290-522 s y la tercera en 580-4637 s.

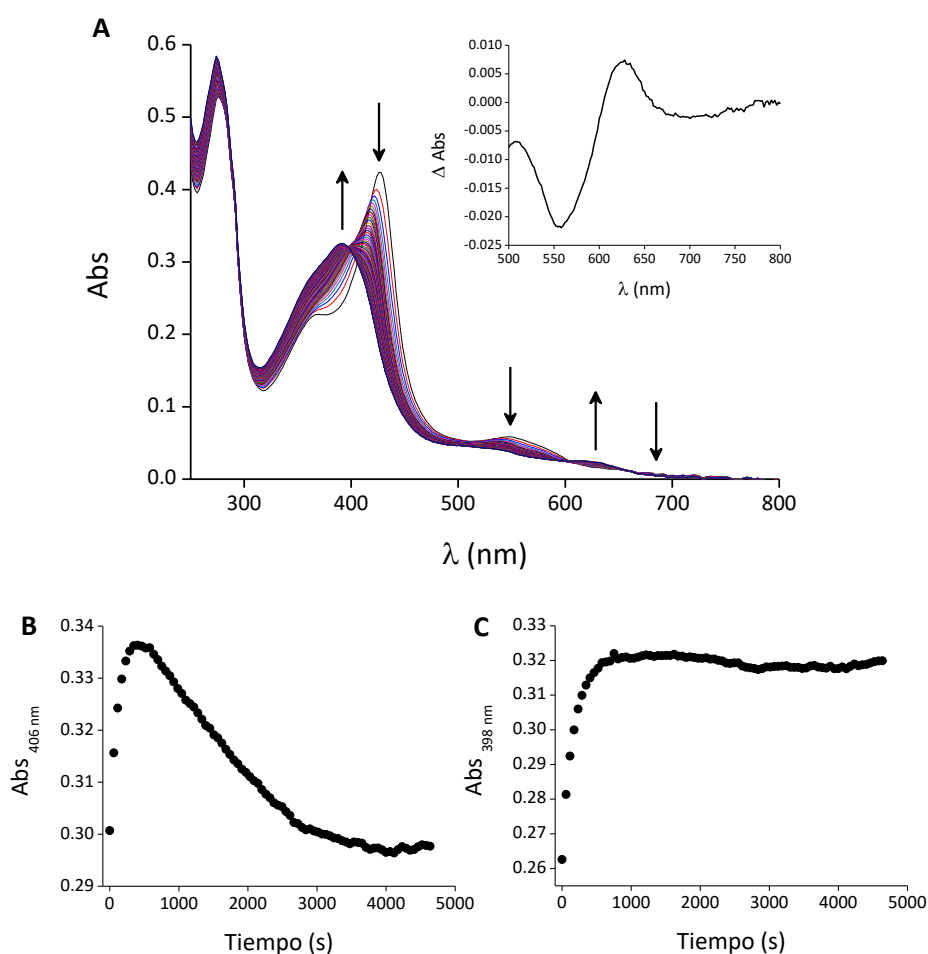


Figura 31. Alteración del espectro de CBS al agregar HgCl_2 100 μM . (A) Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (5 μM) con HgCl_2 (100 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 $^\circ\text{C}$. Los espectros fueron registrados cada 58 s durante 77 min. Las flechas indican disminución y aumento de absorbancia a lo largo del tiempo. Inserto: espectro diferencial calculado como $\text{Abs}(\text{último registro}) - \text{Abs}(\text{primer registro})$. El primer registro corresponde al espectro a tiempo cero y el último al espectro a los 77 min de reacción. Se observa un máximo a 624 nm que representa un aumento de absorbancia y mínimos a ~ 550 nm y 650-750 nm que indican la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo. Cursos temporales a (B) 406 nm y (C) 398 nm, correspondientes a los puntos isobésticos de la segunda y tercera fase respectivamente.

En la Figura 32-A se observa en detalle cómo la absorbancia de la CBS decrece en las zonas de 550 nm y 650-750 nm y cómo aumenta a 616 nm al reaccionar con HgCl_2 100 μM . En este proceso no se detectan isobásticos claros. Este cambio espectral se va desarrollando a lo largo de las tres fases, el mayor cambio se lleva a cabo en la tercera fase. En la primera fase la absorbancia a 550 nm disminuye y se forma una especie con máximo a 536 nm. A 600-650 nm la absorbancia aumenta y a 650-750 nm disminuye (Figura 32-B). En la segunda fase el máximo de absorbancia a 536 nm sigue disminuyendo hasta formar un máximo a 534 nm. A 600-650 nm la absorbancia aumenta y a mayores longitudes de onda parecería permanecer constante. En este proceso parecería formarse un punto isobástico a 602 nm, sin embargo, debido a la poca cantidad de espectros, no se puede afirmar (Figura 32-C). En la tercera fase la especie a 534 nm se convierte en una especie con máximo a 616 nm, la absorbancia a 650-750 nm disminuye y se forma un punto isobástico a 598 nm (Figura 32-D).

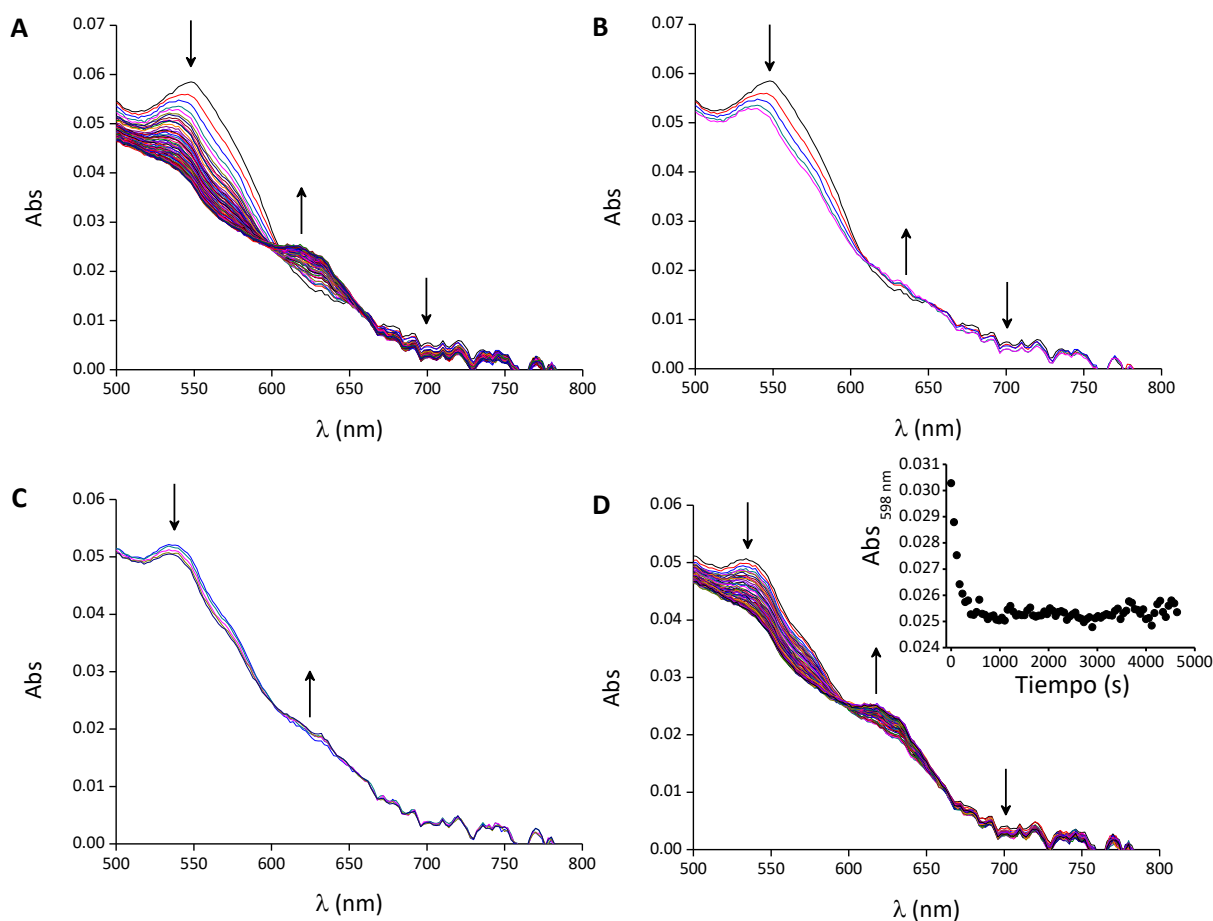


Figura 32. Cambios en la zona de baja energía del espectro de CBS al ser expuesta a HgCl_2 . Espectro cinético al mezclar CBS 5 μM y HgCl_2 100 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Los espectros fueron registrados cada 58 s durante 77 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. (A) La reacción entre la enzima y HgCl_2 genera la conversión del máximo a 550 nm en una especie con máximo a 616 nm y la disminución de absorbancia entre 650 y 750 nm. (B) Primera fase de la reacción (0-232 s). El pico a 550 nm desaparece y se forma una especie con máximo a 536 nm. Entre 600 y 650 nm la absorbancia aumenta y entre 650 y 750 nm disminuye. (C) Segunda fase de la reacción (290-522 s). La especie con máximo a 536 nm se convierte en una con máximo a 534 nm. Entre 600 y 650 nm la absorbancia aumenta. A 602 nm parecería formarse un punto isobástico. (D) Tercera fase de la reacción (580-4637 s). La absorbancia a 534 nm disminuye para formar una especie con máximo a 616 nm. La absorbancia a 650-750 nm disminuye y se forma un punto isobástico a 598 nm. Inserto: curso temporal a 598 nm, se observa que en la tercera fase la absorbancia se mantiene constante, afirmando la formación del punto isobástico.

5.1.3. Reacción con mercurocromo

El proceso de la reacción entre el hemo de la CBS y el mercurocromo es multifásico y los cambios espectrales asociados a la reacción son pequeños. En la Figura 33-A se pueden observar espectros sucesivos registrados cada 30 s durante 2 horas de la mezcla CBS 2 μM y mercurocromo 50 μM . Estos espectros difieren ampliamente de los presentados anteriormente ya que a diferencia de los compuestos de mercurio anteriores, el mercurocromo tiene absorbancia e interfiere con el espectro de la enzima. El máximo de absorbancia del mercurocromo a 505 nm impide ver el máximo de la CBS a 428 nm (inserto de la Figura 33-A). Sin embargo, aunque sean pequeñas, hay variaciones en la absorbancia correspondiente al hemo. De 300 a 309 nm y de 408 a 510 nm, la absorbancia disminuye a lo largo del tiempo, mientras que en el rango 309-408 nm, la absorbancia aumenta. En la Figura 33-B se representa el mismo espectro cinético en una escala que permite visualizar mejor qué sucede a 390 y 428 nm. Es particularmente interesante observar mejor los cambios a estas longitudes de onda porque la especie de CBS a 428 nm tanto al reaccionar con *p*-CMB como con HgCl_2 , se convierte en una a 390 nm.

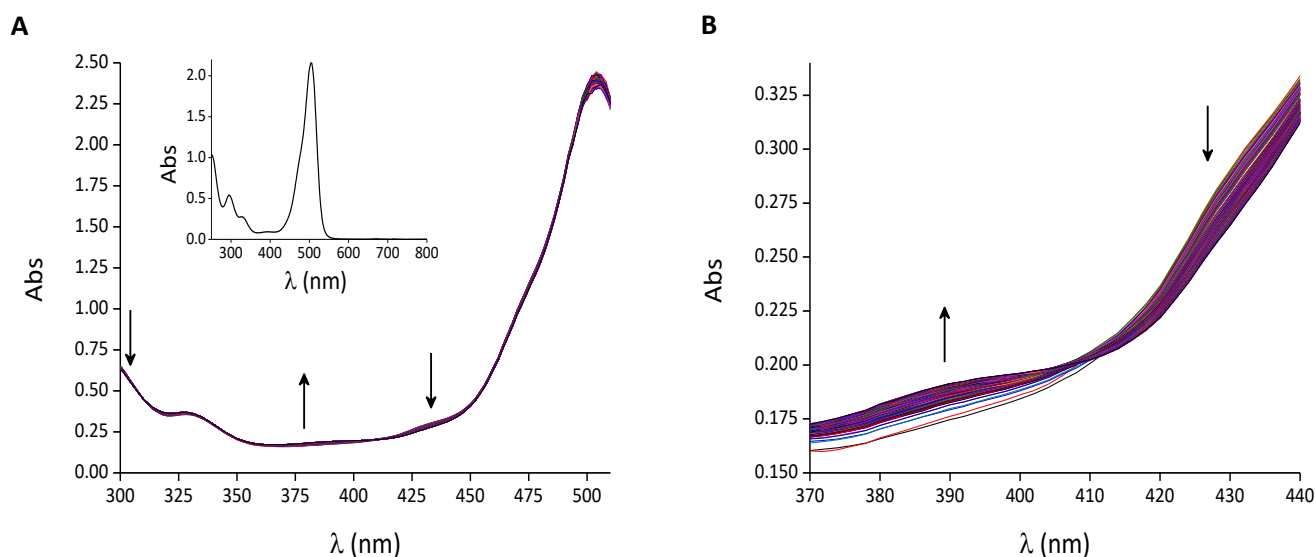


Figura 33. Alteración del espectro de CBS al agregar mercurocromo 50 μM . Espectro cinético UV-visible al mezclar CBS (2 μM) con mercurocromo (50 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Los espectros fueron registrados cada 30 s durante 2 horas a 25 $^{\circ}\text{C}$. (A) Las flechas indican los cambios de absorbancia, disminuye de 300 a 309 nm y de 408 a 510 nm y aumenta de 309 a 408 nm. Inserto: espectro de mercurocromo 50 μM con máximo de absorbancia a 505 nm. (B) Espectro cinético de (A) en otra escala, las flechas indican el aumento de absorbancia a 390 nm y la disminución a 428 nm.

Primera fase

La cinética de la primera fase de la reacción se siguió por la disminución de absorbancia a 430 nm a 25 °C con un espectrofotómetro acoplado a un accesorio de flujo detenido. Se puso a reaccionar CBS 2 μM y distintas concentraciones de mercurocromo comprendidas entre 20 y 140 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). De los cursos temporales, ajustados a exponencial más recta o a doble exponencial con el programa OriginPro 8, se obtuvo un valor de constante observada y de amplitud para cada concentración de mercurocromo. Las k_{obs} permanecen constantes al aumentar la concentración de mercurocromo con un valor de $\sim 0.015 \text{ s}^{-1}$. De igual manera, las amplitudes no varían (Figura 34).

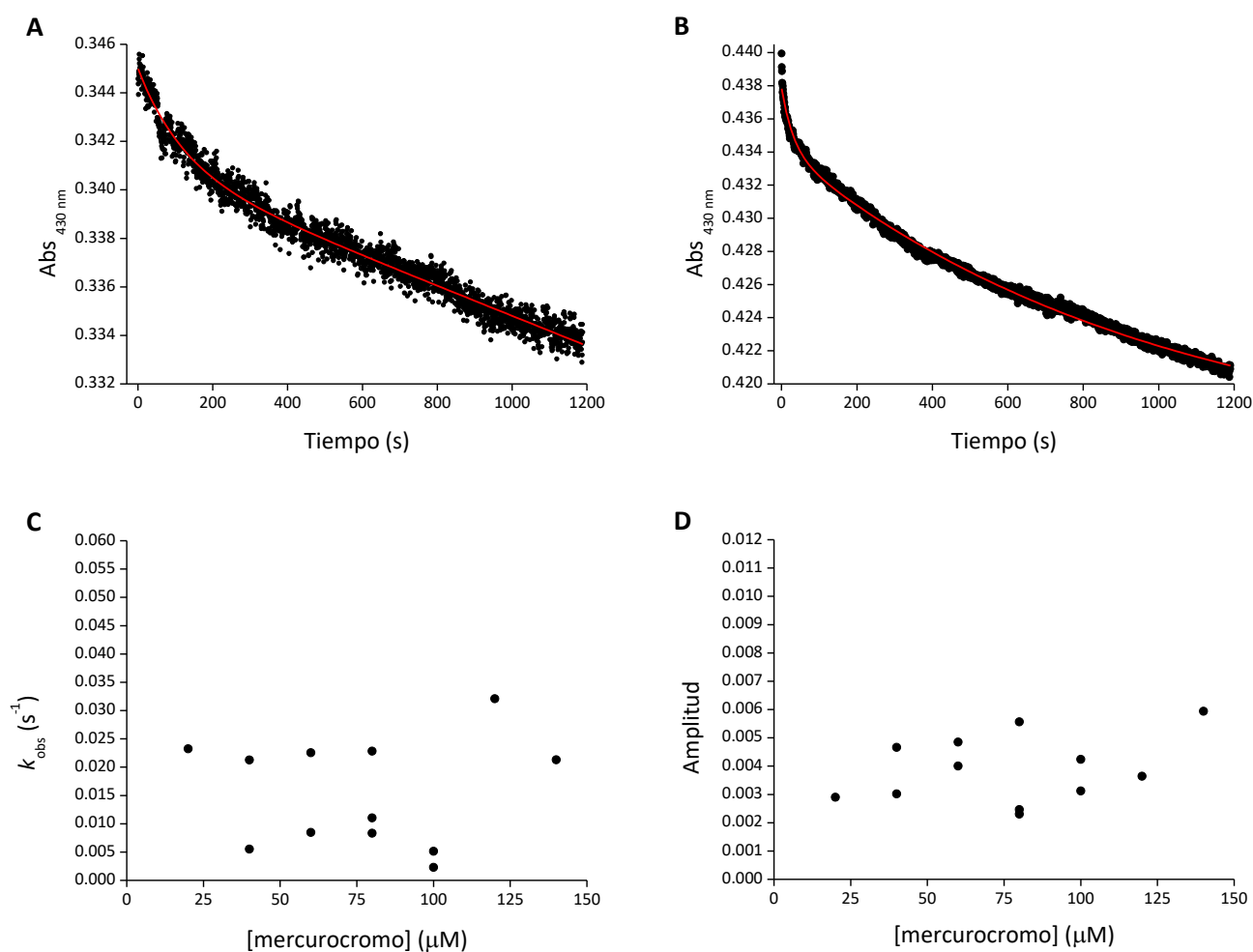


Figura 34. Cinética de la primera fase de la reacción entre CBS y mercurocromo. La primera fase se siguió por la caída de absorbancia a 430 nm en un espectrofotómetro acoplado a un accesorio de flujo detenido a 25 °C. (A) Curso temporal de la reacción entre CBS 2 μM y mercurocromo 60 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Los datos fueron ajustados a exponencial más recta. (B) Curso temporal de la reacción entre CBS 2 μM y mercurocromo 120 μM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Los datos fueron ajustados a doble exponencial. (C) Las k_{obs} de la primera fase de la reacción tienen un valor de $\sim 0.015 \text{ s}^{-1}$ y son independientes de la concentración de mercurocromo. (D) Las amplitudes tampoco dependen de la concentración de mercurocromo. Todos los ajustes se realizaron con OriginPro 8.

Segunda y tercera fase

Con el fin de determinar las constantes cinéticas de las fases más lentas, se siguió la reacción entre CBS ($2 \mu\text{M}$) y distintas concentraciones de mercurocromo ($0, 50, 100, 200, 500, 800, 1000$ y $1200 \mu\text{M}$) a 430 nm durante doce horas y media en un lector de placas. Las mezclas se realizaron en amortiguador Tris (0.1 M , $\text{pH } 7.4$) y los datos se tomaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Los cursos temporales resultantes de dos experimentos independientes se ajustaron a simple exponencial, exponencial más recta, doble exponencial y doble exponencial más recta en OriginPro 8. La variedad de ajustes se debe a la gran cantidad de ruido de algunos trazos que impidió que todos fueran ajustados de igual manera. En la Figura 35 se observa la caída de absorbancia a 430 nm al mezclar CBS con mercurocromo 500 y $800 \mu\text{M}$. La primera fue ajustada a doble exponencial más recta mientras que la segunda a doble exponencial.

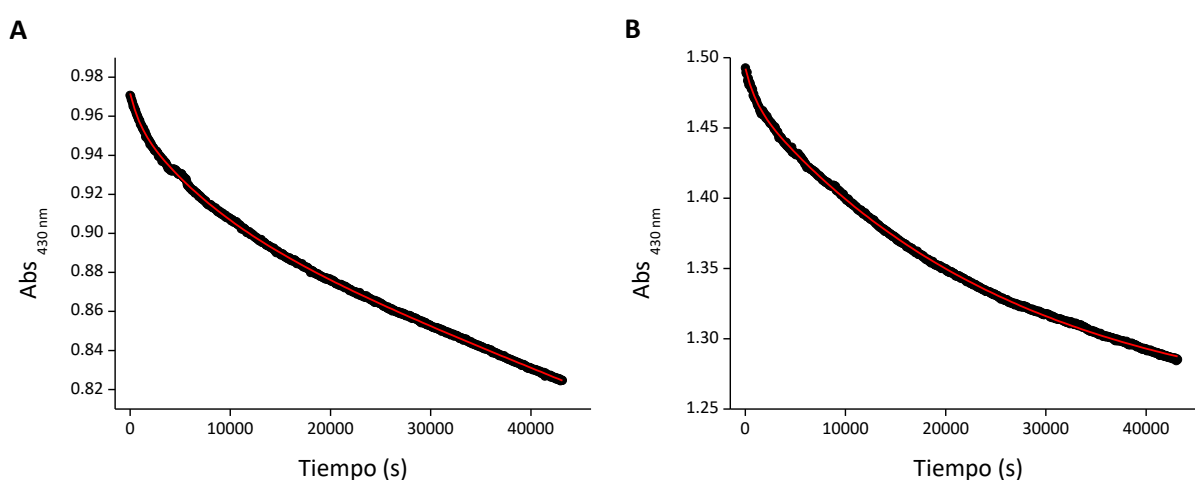


Figura 35. Cursos temporales a 430 nm de la segunda y tercera fase de la reacción entre CBS y mercurocromo. Caída de absorbancia a 430 nm a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ al mezclar CBS $2 \mu\text{M}$ y mercurocromo (A) 500 y (B) $800 \mu\text{M}$ en amortiguador Tris (0.1 M , $\text{pH } 7.4$). Los cursos temporales (negro) se ajustaron a doble exponencial más recta y doble exponencial respectivamente (rojo) con el programa OriginPro 8. Se obtuvieron dos constantes observadas para cada concentración de mercurocromo, las de mayor valor corresponden a la segunda fase y las de menos valor a la tercera fase.

Dependiendo del ajuste realizado a cada curso temporal, para las distintas concentraciones de mercurocromo se obtuvieron una o dos constantes observadas y amplitudes, correspondientes a la segunda y tercera fase de la reacción. La constante cinética de la segunda fase tiene un valor de $1.7 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 36-A). Las amplitudes correspondientes a esta fase se mantienen constantes al aumentar la concentración de mercurocromo (Figura 36-B). Contrariamente, se observó que en la tercera fase de la reacción las constantes observadas son indiferentes a la concentración de mercurocromo con k_{obs} de $\sim 0.00005 \text{ s}^{-1}$ y las amplitudes aumentan con la concentración de mercurocromo (Figura 36-C,D). Es importante destacar que las k_{obs} de esta fase fueron ajustadas hasta los últimos puntos registrados sin ruido, sin embargo, estos tiempos corresponden a ~ 2 vidas medias de las constantes observadas.

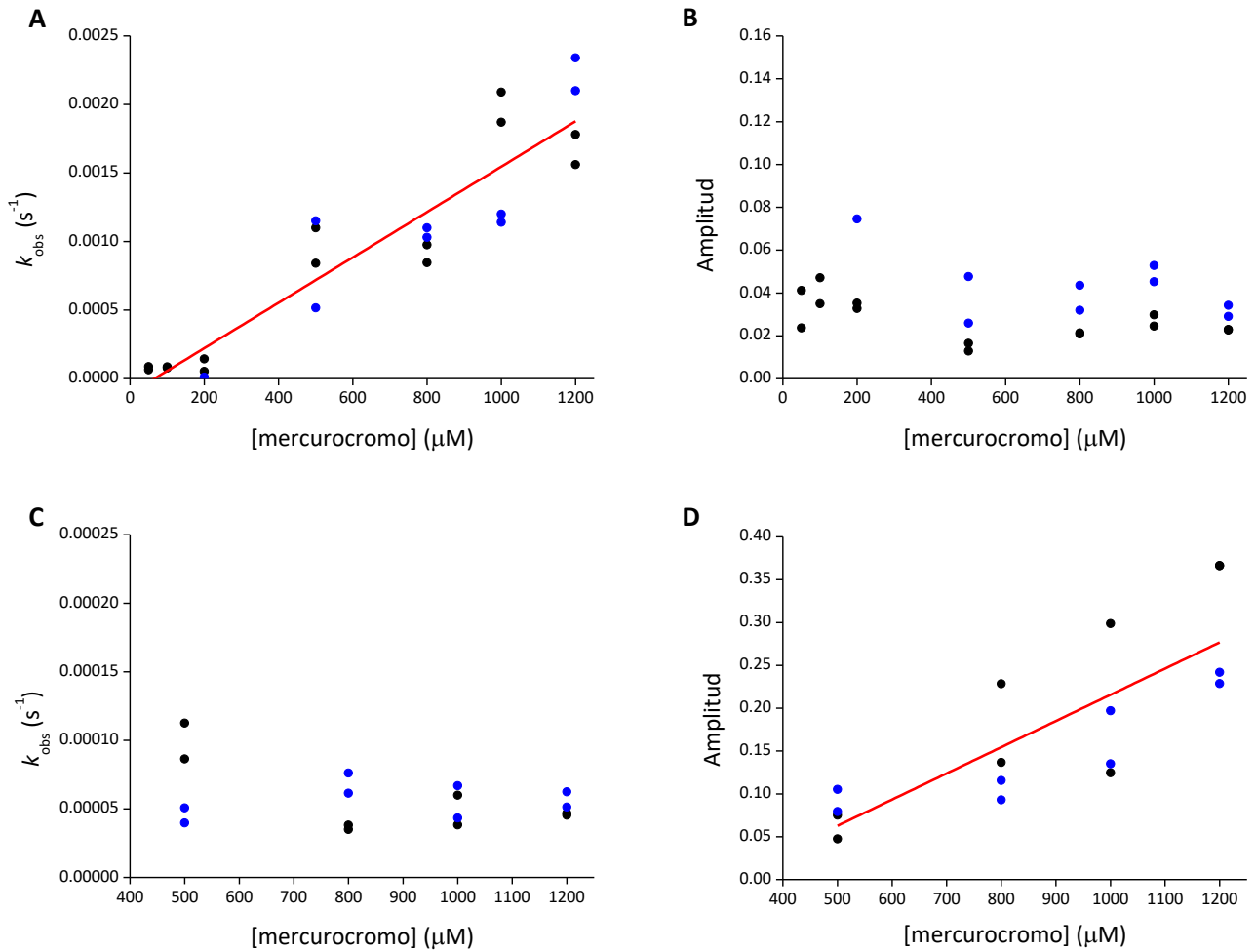


Figura 36. Constantes cinéticas y amplitudes de la segunda y tercera fase de la reacción entre CBS y mercurocromo. La cinética de la segunda y tercera fase se estudió a partir de la caída de absorbancia a 430 nm a 25 °C. Se siguió la reacción entre CBS (2 μM) y mercurocromo (0, 50, 100, 200, 500, 800, 1000 y 1200 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) en dos experimentos independientes. Los trazos fueron ajustados a simple exponencial, exponencial más recta, doble exponencial y doble exponencial más recta en OriginPro 8. De los ajustes se obtuvieron dos k_{obs} y amplitudes correspondientes a la segunda y tercera fase. (A) Las k_{obs} de la segunda fase dependen linealmente de la concentración de mercurocromo. La pendiente de la recta tiene un valor de $1.7 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $R^2 = 0.84683$. (B) Las amplitudes de la segunda fase no dependen de la concentración de mercurocromo. (C) Las k_{obs} de la tercera fase son independientes de la concentración de mercurocromo y tienen un valor de $\sim 0.00005 \text{ s}^{-1}$. (D) Las amplitudes de la tercera fase aumentan linealmente con la concentración de mercurocromo.

Resumiendo, la reacción entre el hemo de la CBS férrica y el mercurocromo ocurre en tres fases pero no se detectan cambios espectrales significativos, en parte debido a la interferencia de la absorbancia del mercurocromo. Debido a que en la primera fase de la reacción se desconoce el comportamiento de las k_{obs} a concentraciones altas de mercurocromo, estos resultados no se tendrán en cuenta en el análisis global de la cinética de la reacción entre CBS y compuestos de mercurio. En la Tabla 5 se resume la cinética de la reacción entre mercurocromo y CBS.

Tabla 5. Reacción entre el hemo de la CBS y mercurocromo

Fase	k_{obs} versus [mercurocromo]	Parámetros de k_{obs} versus [mercurocromo]	Amplitud versus [mercurocromo]
Primera	Constante	$k_{obs} \sim 0.015 \text{ s}^{-1}$	Constante
Segunda	Recta	$\Delta k_{obs} / \Delta [\text{mercurocromo}] = 1.7 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ $k_{obs [\text{mercurocromo}] = 0} \sim 0 \text{ s}^{-1}$	Constante
Tercera	Constante	$k_{obs} \sim 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	Recta positiva

Todos los resultados fueron obtenidos de experimentos realizados a 25 °C en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). La primera fase se estudió hasta 140 μM de mercurocromo. Los cursos temporales de los cuales se obtuvo la k_{obs} de la tercera fase fueron ajustados hasta ~ 2 vidas medias.

5.1.4. Análisis de la cinética

A continuación se analizará en profundidad la primera fase de la reacción entre la CBS férrica y los compuestos de mercurio *p*-CMB y HgCl₂.

En la primera fase las k_{obs} aumentan hiperbólicamente con la concentración de *p*-CMB y HgCl₂. Esto implica que la enzima no reacciona directamente con el compuesto de mercurio, sino que hay al menos dos etapas involucradas. Teniendo lo anterior en cuenta, existen dos escenarios posibles que pueden analizarse a la luz de los modelos generales desarrollados para la unión de una enzima a un ligando (169, 170). En el primer caso, la enzima podría existir en más de una conformación y el compuesto de mercurio reacciona con una de ellas; este mecanismo se conoce como selección conformacional. En el segundo caso, la conformación de la enzima cambia después de la unión con el compuesto de mercurio para quedar unida óptimamente; este es el mecanismo de encaje inducido (Figura 37). Bajo la aproximación de equilibrio rápido, cuando la unión al ligando es rápida con respecto al cambio conformacional, la k_{obs} disminuye hiperbólicamente con la concentración de ligando en el mecanismo de selección conformacional y aumenta hiperbólicamente en el modelo de encaje inducido. Cuando $k_{off} < k_r$ en el modelo de selección conformacional, la k_{obs} aumenta hiperbólicamente con la concentración de ligando (170). Es así que la primera fase de la reacción entre el hemo de la CBS y los compuestos de mercurio podría tener un mecanismo de encaje inducido o de selección conformacional. De acuerdo con los resultados obtenidos, las especies formadas con *p*-CMB y HgCl₂ tienen un máximo de absorbancia a distinta longitud de onda (428 y 422-424 nm respectivamente) pero en ambos casos se trataría de especies donde el hemo está hexacoordinado.

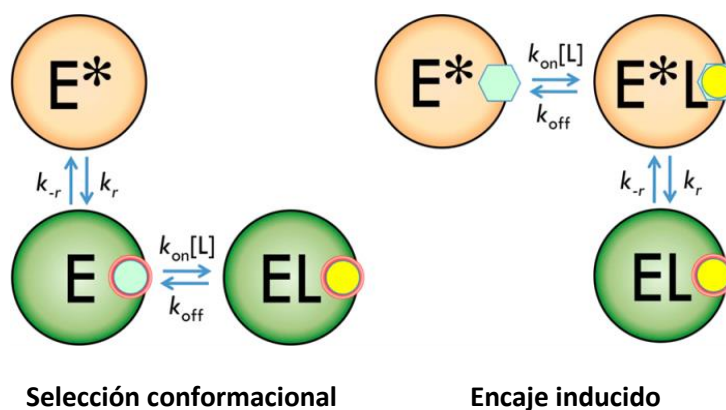
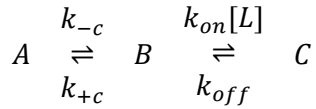


Figura 37. Selección conformacional y encaje inducido. Existen dos mecanismos alternativos de reconocimiento de ligando. La selección conformacional postula un equilibrio preexistente entre las especies E y E* de las cuales solo E se une al ligando. El modelo de encaje inducido postula una transición conformacional entre E*L y EL que optimiza la unión. Los valores de k_r y k_{-r} representan la conversión entre E*-E y E*L-EL respectivamente. *Figura adaptada de (170).*

Modelo de selección conformacional

En primer lugar se plantea un modelo de selección conformacional donde la CBS férrica hexacoordinada se encuentra en equilibrio con una especie pentacoordinada que perdió la coordinación de la cisteína. Al agregar un compuesto de mercurio, tanto *p*-CMB como HgCl₂, éste reacciona con la especie pentacoordinada formando una especie hexacoordinada que tiene como ligandos histidina y cisteína unida a una molécula del compuesto de mercurio. Este mecanismo se plantea en el siguiente esquema,



donde A es la CBS hexacoordinada, B es la CBS pentacoordinada, C es la CBS hexacoordinada unida al compuesto de mercurio, k_{-c} y k_{+c} son las constantes de disociación y asociación de cisteína respectivamente y [L] es la concentración del compuesto de mercurio. Asumiendo estado estacionario para B:

$$\frac{d[B]}{dt} = 0 \Rightarrow k_{-c}[A] + k_{off}[C] = k_{on}[L][B] + k_{+c}[B]$$

Planteando la ley de velocidad y el balance de masa,

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_{-c}[A] - k_{+c}[B]$$

$$[E] = [A] + [C] + [B]$$

donde [E] es la concentración de enzima total. Sustituyendo el balance de masa y la ecuación de estado estacionario en la ley de velocidad:

$$-\frac{d[A]}{dt} = [A] \left(\frac{k_{-c}k_{on}[L] + k_{-c}k_{off} + k_{+c}k_{off}}{k_{on}[L] + k_{+c} + k_{off}} \right) - \frac{k_{+c}k_{off}[E]}{k_{on}[L] + k_{+c} + k_{off}}$$

Resolviendo la ecuación diferencial se tiene una solución de la forma

$$[A](t) = (Amplitud)e^{(-k_{obs}t)} + offset$$

en la cual,

$$k_{obs} = \frac{k_{-c}k_{on}[L] + k_{-c}k_{off} + k_{+c}k_{off}}{k_{on}[L] + k_{+c} + k_{off}}$$

Asumiendo $k_{off} \ll k_{+c}$ y $k_{-c} \ll k_{+c}$ (el compuesto de mercurio se separa lento de la cisteína y la cisteína se une al ion férrico mucho más rápido de lo que se separa),

$$si [L] \rightarrow 0 \Rightarrow k_{obs} = k_{off}$$

$$si [L] \rightarrow \infty \Rightarrow k_{obs} = k_{-c}$$

Asumiendo $k_{off} \ll k_{-c}$ (la cisteína se separa más fácil del hierro que del átomo de mercurio),

$$\text{si } k_{obs} = \frac{k_{-c}}{2} \Rightarrow [L] = \frac{k_{+c}}{k_{on}}$$

Según este modelo, a partir de las gráficas de k_{obs} versus concentración del compuesto de mercurio se obtiene un valor para la constante de disociación de la cisteína (k_{-c}), la constante de disociación del compuesto de mercurio (k_{off}) y la relación entre la constante de asociación de la cisteína y la constante de asociación del compuesto de mercurio (k_{+c}/k_{on}). Cabe destacar que todas las constantes son de orden uno menos la de asociación del compuesto de mercurio que es de orden dos.

A partir de los experimentos con *p*-CMB y HgCl_2 se obtienen valores similares de k_{-c} , consistente con que la salida de la cisteína es independiente del compuesto de mercurio. También se determinaron valores similares de k_{off} y éstos son menores que k_{-c} , como se había asumido. Los valores de la relación k_{+c}/k_{on} para *p*-CMB y HgCl_2 son distintos, sin embargo esta relación depende del compuesto de mercurio y el átomo de mercurio del *p*-CMB y del HgCl_2 no poseen las mismas propiedades (Tabla 6). En la Figura 38 se puede observar el modelo de selección conformacional con las constantes involucradas.

Tabla 6. Constantes cinéticas según el modelo de selección conformacional

Compuesto de mercurio	k_{-c} (s^{-1})	k_{off} (s^{-1})	k_{+c}/k_{on} (M)
<i>p</i> -CMB	0.301 ± 0.008	0.009 ± 0.002	$(7.8 \pm 0.4) \times 10^{-4}$
HgCl_2	0.4 ± 0.1	0.0067 ± 0.0003	$(4 \pm 1) \times 10^{-4}$

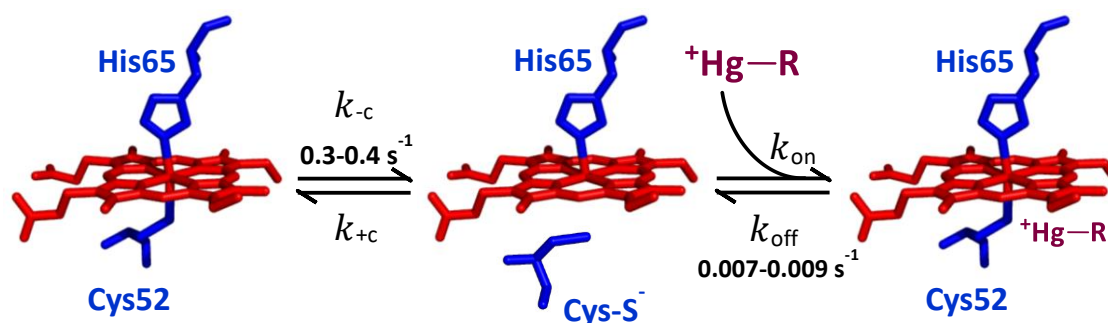
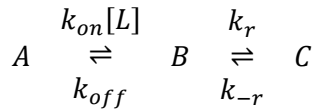


Figura 38. Modelo de selección conformacional para la primera fase de la reacción entre CBS y compuestos de mercurio. Se plantea un modelo de selección conformacional donde la CBS férrica hexacoordinada está en equilibrio con una especie pentacoordinada capaz de formar otra especie hexacoordinada en presencia de un compuesto de mercurio ($^+\text{Hg-R}$).

Modelo de encaje inducido

Otra hipótesis que se plantea para la primera fase de la reacción es la del modelo de encaje inducido. En este caso, toda la enzima está hexacoordinada y la adición del compuesto de mercurio genera un complejo débil entre el hemo hexacoordinado y el compuesto de mercurio. En el segundo paso de la reacción el complejo débil sufre un cambio conformacional para formar un complejo más fuerte, formándose una especie hexacoordinada con histidina y cisteína unida a una molécula del compuesto de mercurio como ligandos. Este mecanismo se plantea en el siguiente esquema,



donde A es la CBS hexacoordinada, B es el complejo débil, C es el complejo fuerte, k_r y k_{-r} son las constantes de formación del complejo fuerte y débil respectivamente y [L] es la concentración del compuesto de mercurio. Asumiendo equilibrio rápido de unión de ligando seguido de paso lento:

$$K_d = \frac{[A][L]}{[B]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Planteando la ley de velocidad y el balance de masa,

$$\frac{d[C]}{dt} = k_r[B] - k_{-r}[C]$$

$$[E] = [A] + [C] + [B]$$

donde [E] es la concentración de enzima total. Sustituyendo el balance de masa y la constante de equilibrio en la ley de velocidad:

$$-\frac{d[C]}{dt} = [C] \left(\frac{k_r[L]}{K_d + [L]} + k_{-r} \right) - \frac{k_r[E][L]}{K_d + [L]}$$

Resolviendo la ecuación diferencial se tiene una solución de la forma

$$[A](t) = (Amplitud)e^{(-k_{obs}t)} + offset$$

en la cual,

$$k_{obs} = \frac{k_r[L]}{K_d + [L]} + k_{-r}$$

Asumiendo $k_{-r} \ll k_r$ (la unión entre el compuesto de mercurio y la cisteína es más rápida que la separación),

$$si [L] \rightarrow 0 \Rightarrow k_{obs} = k_{-r}$$

$$si [L] \rightarrow \infty \Rightarrow k_{obs} = k_r$$

En este modelo k_r y k_{-r} no tienen un significado explícito relevante. Se podría pensar que la formación del complejo fuerte hexacoordinado implica la separación y posterior unión de la cisteína al átomo de hierro, en tal caso, k_r representaría la constante de disociación de la cisteína. Los valores obtenidos para k_r y k_{-r} con *p*-CMB y HgCl₂ son similares. En la Figura 39 se puede observar el modelo de encaje inducido con las constantes involucradas.

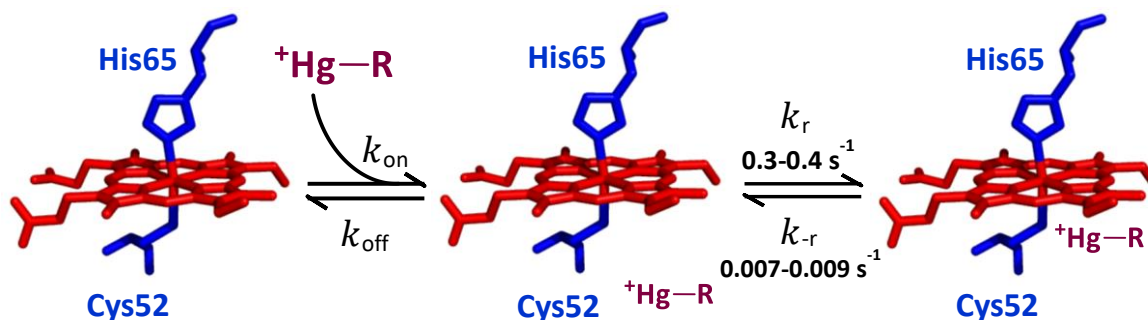


Figura 39. Modelo de encaje inducido para la primera fase de la reacción entre CBS y compuestos de mercurio. Se plantea un modelo de encaje inducido donde la CBS hexacoordinada reacciona con el compuesto de mercurio ($+Hg-R$) formando un complejo débil. Tras un cambio conformacional se forma un complejo más fuerte.

En suma, se plantean dos hipótesis alternativas para la primera fase de la reacción entre CBS férrica y *p*-CMB o HgCl₂. Estas hipótesis son modelos mínimos. Aunque no se sepa el mecanismo, se puede pensar que las primeras fases de ambas reacciones ocurren por el mismo mecanismo ya que las k_{obs} aumentan hiperbólicamente con parámetros similares con la concentración de ambos compuestos de mercurio. Además las amplitudes tienen el mismo comportamiento ante ambos compuestos de mercurio. El hecho de que las amplitudes aumenten hiperbólicamente es consistente con la existencia de la k_{off} en el modelo de selección conformacional y k_{-r} en el modelo de encaje inducido. Si bien las especies formadas al término de las primeras fases tienen distinta longitud de onda máxima, las diferencias pueden deberse a que el *p*-CMB y el HgCl₂ tienen distinto tamaño, carga neta y densidad de carga en el átomo de mercurio.

Para determinar si los resultados responden al modelo de selección conformacional o al de encaje inducido, se podría medir la k_{obs} de la reacción entre los compuestos de mercurio y CBS con la enzima en exceso. Mientras que en el encaje inducido las k_{obs} siempre tienen una dependencia hiperbólica, en el mecanismo de selección conformacional se ve una cinética distinta cuando se varía la concentración del ligando y de la proteína en distintos experimentos (171).

Los resultados obtenidos para la primera fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB son compatibles con un proceso en dos pasos que llevan a la formación de una especie hexacoordinada que presenta también un máximo a 428 nm. Una hipótesis alternativa para explicar el muy pequeño cambio espectral registrado en esta fase es la presencia de dos poblaciones inicialmente, una especie hexacoordinada resistente al *p*-CMB y otra especie lábil. Sin embargo, una relación directa entre la especie lábil y el *p*-CMB debería llevar al aumento lineal de la k_{obs} . Además, no se ha reportado evidencia de dos poblaciones en la literatura.

En cuanto a la segunda fase de la reacción entre la CBS férrica y los tres compuestos de mercurio estudiados se plantea una sola hipótesis. Para los tres compuestos de mercurio la segunda fase tiene una constante cinética de segundo orden, indicando que la reacción transcurre en un único paso. Como las k_{obs} aumentan linealmente con la concentración de compuesto de mercurio se postula que en esta fase una segunda molécula de compuesto de mercurio se une al tiolato de la cisteína. En lo que respecta al *p*-CMB, en esta fase se forma una especie con máximo a 391 nm consistente con un hemo pentacoordinado, sugiriendo que el *p*-CMB reacciona con el tiolato de la cisteína impidiendo que ésta coordine el hemo. En la reacción con $HgCl_2$ se forma una especie con máximo a 418 nm sugiriendo que la cisteína sigue coordinando el hemo. En la especie de 418 nm la cisteína podría estar unida al hemo y a dos moléculas de Hg^{2+} . Vale destacar que el *p*-CMB es voluminoso por lo que podría no haber suficiente espacio para que la cisteína permanezca unida al hemo y a dos moléculas de *p*-CMB, pero en el caso de $HgCl_2$ el impedimento estérico no sería un inconveniente. Asimismo se determinó una segunda fase con constante cinética de segundo orden para el mercurocromo pero al no haber observado cambios espectrales significativos en dos horas es difícil sacar conclusiones acerca del mecanismo de la reacción. Sumado a esto, el mercurocromo absorbe a 500 nm interfiriendo con los cambios espectrales asociados al hemo.

La tercera fase de la reacción entre CBS y *p*-CMB no se estudió con profundidad pero se observó que el cambio espectral era pequeño y que el máximo tuvo un corrimiento de 391 a 395 nm, consistente con un hemo pentacoordinado. Estos cambios no se creen significativos. Para el $HgCl_2$ y mercurocromo se observó que las k_{obs} eran independientes de la concentración del compuesto de mercurio. Para el primero las amplitudes son constantes mientras que para el segundo aumentan linealmente. Al no detectar cambios espectrales con el mercurocromo no se pueden sacar conclusiones sobre el mecanismo. En cuanto al $HgCl_2$, al finalizar la reacción se forma una especie a 390 nm consistente con un hemo pentacoordinado, sugiriendo que la cisteína en esta fase se separa del hemo. Esto concuerda con que la pérdida de la banda de transferencia de carga tiolato-hemo se lleve a cabo mayoritariamente en la tercera fase (ver la sección sobre cambios espectrales en la zona de baja energía).

Taoka et al. (104) reportaron que el pico de Soret a 428 nm de la CBS férrica se convertía en una especie con máximo a 395 nm al agregar $HgCl_2$. Sin embargo, al agregar tioles a la mezcla, homocisteína, detectaron una especie con máximo a 424 nm consistente con un hemo coordinado por imidazol y cisteinato. Estos datos son consistentes con el modelo planteado. Los tioles exógenos reaccionarían con algunas moléculas de $HgCl_2$ de manera que la cisteína de la enzima quedaría unida a menos moléculas de $HgCl_2$ revirtiendo lo que ocurre en la segunda y tercera fase de la reacción. Se puede afirmar que los tioles exógenos no reaccionaron con todo el $HgCl_2$ presente y que la enzima permanece unida al compuesto de mercurio porque en tal caso se debería ver un espectro con máximo a 428 nm.

5.2. Exposición del hemo de la CBS a compuestos que no contienen mercurio

Hasta la fecha, se conocen dos compuestos que no contienen mercurio capaces de reaccionar con el hemo de la CBS férrica, peroxinitrito (105) y NO[•] (103). Sin embargo, en ambas reacciones y particularmente en la última, la cinética es muy lenta. El hemo no reacciona con los típicos ligandos de hemo férrico como cianuro, fluoruro, azida, piridina, aminas, nitrilos e imidazoles (110, 172). En este trabajo se estudió si los compuestos que no contienen mercurio acetato de zinc y NEM son capaces de reaccionar con el hemo de la CBS.

5.2.1. Acetato de zinc

El efecto del acetato de zinc se estudió mediante cambios en la absorbancia a 430 nm de la CBS (2 μM) en presencia de distintas concentraciones de acetato de zinc (0-2000 μM) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) a 25 °C. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes y presentaron mucho ruido. En algunos cursos temporales la absorbancia no varió a lo largo del tiempo mientras que en otros sí, pero al no tener resultados reproducibles no se pudieron extraer conclusiones claras. Sin embargo, los resultados van en la dirección de que la interacción de la cisteína con Zn²⁺ no es significativa, lo cual es consistente con la menor afinidad de Zn²⁺ que Hg²⁺ por los tioles. En los complejos con cisteína y Hg²⁺ el log K = 45.4 mientras que en los complejos con Zn²⁺ el log K = 9.86 (173). Para determinar si el Zn²⁺ y el hemo-tiolato son capaces de reaccionar se podría repetir este experimento con acetato de zinc y otro compuesto con Zn²⁺. Además, se podrían realizar espectros sucesivos en el tiempo de la enzima en presencia de acetato de zinc con el fin de determinar si el pico de Soret desaparece y si se forman nuevas especies.

5.2.2. NEM

El NEM reacciona con cisteína libre con una constante de $7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 (174). Para estudiar si la exposición de CBS a NEM genera cambios en el espectro de la enzima, se mezcló CBS 3 μM y NEM 1 mM (concentraciones finales) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) y se registraron espectros sucesivos en el tiempo durante 108 min a 25 °C barriendo el rango 250-800 nm.

En la Figura 40 se puede observar el espectro de la CBS antes de añadir NEM y los cambios espectrales generados al agregar NEM. Se observa una disminución de absorbancia a lo largo del tiempo en todo el rango de longitudes de onda, probablemente debido a cambios en el estado de agregación de la proteína. Para determinar si la disminución de absorbancia en todo el rango de longitudes de onda había sido la misma, se recurrió al espectro diferencial calculado como Abs (108 min) – Abs (0 min), esta última hace referencia al primer espectro registrado después de agregar NEM. En el espectro diferencial aparecen dos mínimos a ~300 nm (máximo de absorbancia de NEM) y a 429 nm, indicando la disminución de absorbancia a dichas longitudes de onda (inserto de la Figura 40). Aunque la disminución a 429 nm en general signifique cambios en el hemo de la CBS, esta es una excepción, ya que la absorbancia a 280 nm también disminuyó indicando una disminución en la concentración de proteína. Es decir que la enzima pudo haber precipitado generando una disminución en los picos de su espectro, a causa

de la alta concentración de NEM (1 mM). Además, en el espectro diferencial no se observa ningún máximo que indique la formación de una nueva especie.

Por lo tanto, se concluye que los mínimos en el espectro diferencial se deben a la disminución en la concentración de proteína y no a una reacción entre NEM y el hemo. Sin embargo, para tener mejores resultados, se debería repetir el experimento disminuyendo la concentración de NEM. Asimismo, se podría seguir la absorbancia de la enzima a 430 nm en presencia de distintas concentraciones de NEM para obtener más información.

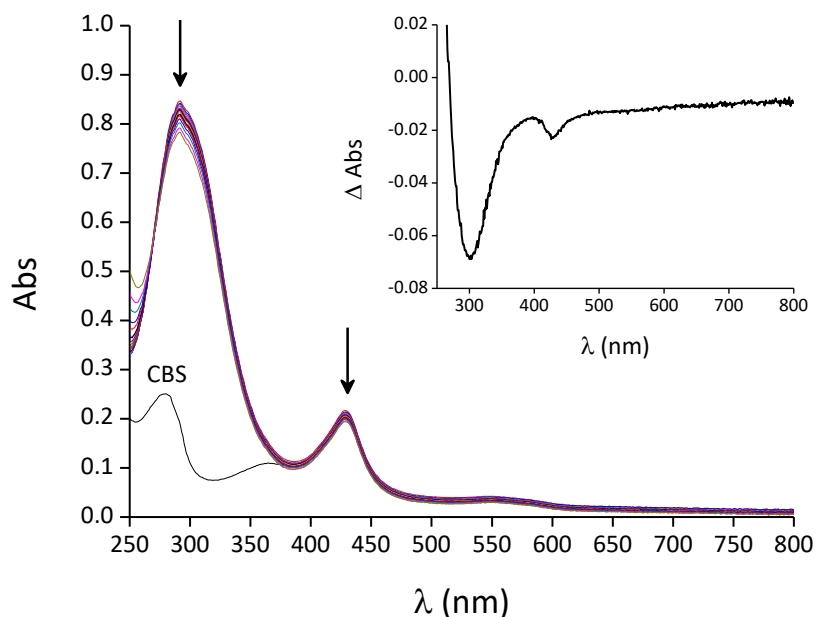


Figura 40. Cambios en el espectro de CBS al ser expuesta a NEM. Espectros sucesivos al mezclar CBS 3 μM y NEM 1 mM en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). Los espectros fueron registrados durante 108 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. El espectro en negro (CBS) corresponde al espectro de la enzima antes de añadir NEM. Se observa una disminución en la absorbancia en todo el rango de longitudes de onda. Inserto: espectro diferencial calculado como $\text{Abs}(108 \text{ min}) - \text{Abs}(0 \text{ min})$ de forma que los mínimos ($\sim 300 \text{ nm}$ y 429 nm) indican la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo.

5.3. Separación del hemo de la proteína

5.3.1. CBS con HgCl₂ por 24 horas

Para determinar si la exposición de CBS a HgCl₂ por largos períodos de tiempo genera la separación del hemo de la enzima, se dejó una muestra con CBS 7.5 μM y HgCl₂ 100 μM y su correspondiente control 24 horas en heladera. Al comparar los espectros de absorción de diluciones de ambas muestras se observan diferencias (Figura 41). En el espectro de la muestra control, se distinguen los máximos a 280, 428 y 550 nm característicos de la enzima. Por su parte, en el espectro de la enzima tratada con compuesto de mercurio se ven los cambios asociados a la reacción con HgCl₂ previamente descritos, la desaparición de los picos a 428 y 550 nm y la formación de una especie a 390 nm. El máximo a 280 nm, característico de las proteínas, continúa presente pero con menor absorbancia que en el espectro del control, la enzima pudo haber precipitado generando una disminución en la concentración de proteína.

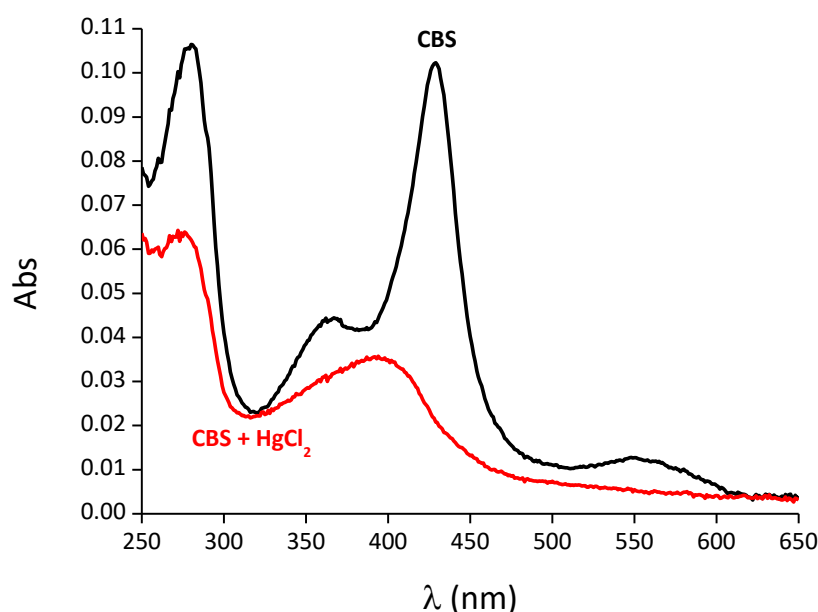


Figura 41. Espectro de absorción de CBS y de CBS con HgCl₂. Espectro de una solución de CBS 7.5 μM (negro) y de una mezcla de CBS 7.5 μM y HgCl₂ 100 μM (rojo) en amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) 24 horas después de preparar las muestras. El espectro de la enzima sin compuesto de mercurio presenta máximos de absorbancia a 280, 428 y 550 nm, mientras que el espectro de la enzima expuesta a HgCl₂ conserva el máximo a 280 nm pero con menor absorbancia y presenta un pico a 390 nm.

Ambas muestras se ultrafiltraron en concentradores de manera que se separaron las moléculas con peso molecular menor a 10 kDa de las que superan dicho peso. La CBS trunca tiene un peso molecular de 45 kDa, por lo que queda en la fracción retenida. Al comparar el espectro de la fracción retenida de la muestra con HgCl₂ con el espectro de la misma antes de ultrafiltrar, se ve que la proporción de hemo (Abs 390 nm) por concentración de proteína (Abs 280 nm) es menor en la fracción retenida, indicando que parte del hemo se separó de la enzima y pasó a la fracción filtrada (Figura 42-A); se separó ~7 % del hemo inicial. Es decir que el hemo se separó de algunas moléculas de enzima pero no de todas, si se hubiese separado de todas no se vería el máximo a

390 nm. Al realizar espectros UV-visible de las fracciones filtradas de ambas muestras se observa un pico a 422 nm en la muestra expuesta a HgCl_2 que no está presente en el control (Figura 42-B). En suma, la presencia de HgCl_2 genera que el hemo se separe de algunas moléculas de CBS, mientras que en su ausencia esto no sucede.

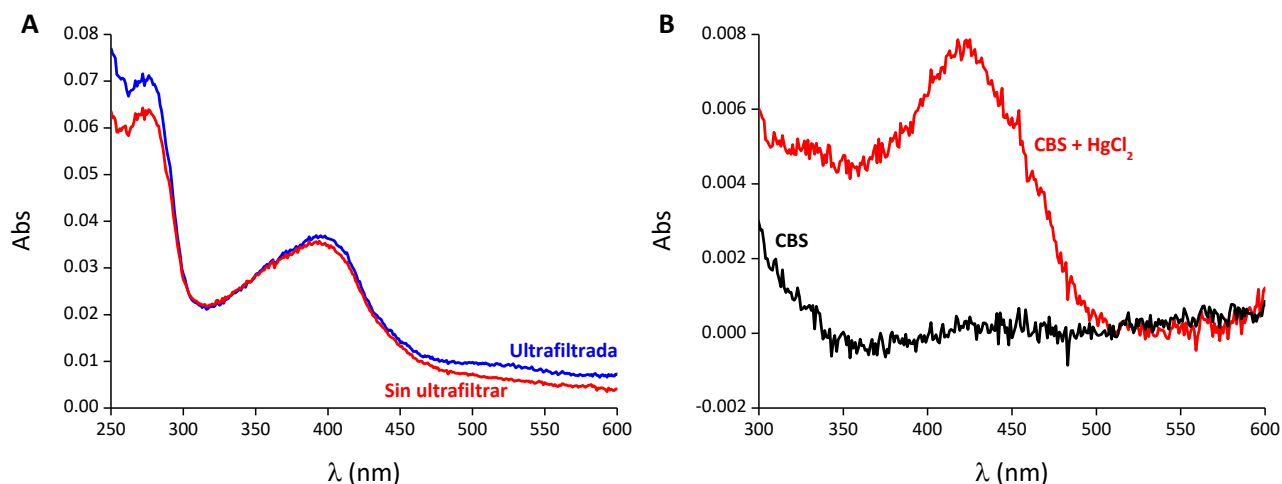


Figura 42. Espectros de absorción de CBS y CBS con HgCl_2 después de ultrafiltrar. (A) Espectro de la mezcla CBS 7.5 μM y HgCl_2 100 μM (rojo) y de la fracción retenida de la misma muestra después de ultrafiltrar (azul). Al ultrafiltrar, la cantidad de hemo (Abs 390 nm) respecto a la concentración de enzima (Abs 280 nm) disminuye. (B) Espectros de las fracciones filtradas, conteniendo moléculas con peso molecular < 10 kDa, de la solución de CBS 7.5 μM y de la mezcla de CBS 7.5 μM y HgCl_2 100 μM después de ser ultrafiltradas. El espectro de la enzima con compuesto de mercurio (rojo) presenta un máximo a 422 nm correspondiente al hemo desprendido de la CBS. En el espectro de la muestra sin compuesto de mercurio (negro) no se visualizan máximos de absorbancia.

5.3.2. CBS con HgCl_2 , *p*-CMB y mercurocromo por 48 horas

El experimento anterior se repitió con muestras con CBS 11 μM y 100 μM de HgCl_2 , *p*-CMB o mercurocromo y el control correspondiente, dejando las muestras 48 horas en heladera antes de ultrafiltrar. En la Figura 43 se pueden ver los espectros de las fracciones retenidas que contienen las moléculas con peso molecular mayor a 10 kDa. Las diferencias en la concentración de proteína en todas las muestras se deben principalmente a que los volúmenes de las fracciones retenidas fueron distintos para cada muestra.

El espectro del control fue el esperado, con máximos a 280, 428 y 550 nm. Sin embargo, el pico de Soret es menor que el pico a 280 nm. La CBS tiene una molécula de hemo por cada subunidad de enzima y el control tuvo una proporción proteína:hemo de 1:0.54 según los coeficientes de extinción molar estimados a 280 y 428 nm. En el espectro de CBS con HgCl_2 se ve el pico de la proteína a 280 nm pero no se detecta ninguna especie con hemo, ni la especie de 428 nm ni la de 390 nm, dando indicios de que el hemo de la enzima se separó completamente de la enzima.

El espectro de la CBS incubada con *p*-CMB fue similar al espectro del control, pero la absorbancia a 428 nm respecto a 280 nm fue incluso menor que en el control, con una proporción 1:0.32. A priori este hecho podría significar una menor concentración de hemo generada por la separación

del hemo de la proteína. Sin embargo, al estudiar la cinética entre CBS y *p*-CMB se concluyó que la absorbancia a 428 nm disminuye para formar una especie a 395 nm, por lo que se esperaba ver un máximo a 395 nm. La disminución del pico a 428 nm podría deberse a la interrupción del curso normal de la reacción en un punto en donde la absorbancia a 428 nm ya había comenzado a disminuir pero aún no se habían formado la especies a 391 y 395 nm. Aunque después de 48 horas la reacción debería haber finalizado, el almacenamiento de la muestra en la heladera enlentece el proceso. Por otro lado, existe la posibilidad de que el *p*-CMB se haya eliminado con los lavados, esto podría ocurrir en el caso que la unión entre *p*-CMB y la enzima sea reversible.

En el espectro de la enzima con mercurocromo se visualizan los máximos de la enzima a 280 y 428 nm y la relación proteína:hemo fue de 1:0.24. Al igual que para la muestra con *p*-CMB, la disminución de absorbancia a 428 nm para la mezcla de CBS con mercurocromo puede ser consecuencia de la separación del hemo de la enzima, del enlentecimiento de la reacción o de los lavados. Es más difícil adjudicarle una razón a la disminución del pico de Soret porque no se conocen los cambios espectrales de la CBS expuesta a mercurocromo por largos períodos de tiempo. Asimismo, se detecta un máximo a la longitud de onda que absorbe el mercurocromo, 500 nm, sugiriendo que parte del mercurocromo permaneció unido a cisteínas.

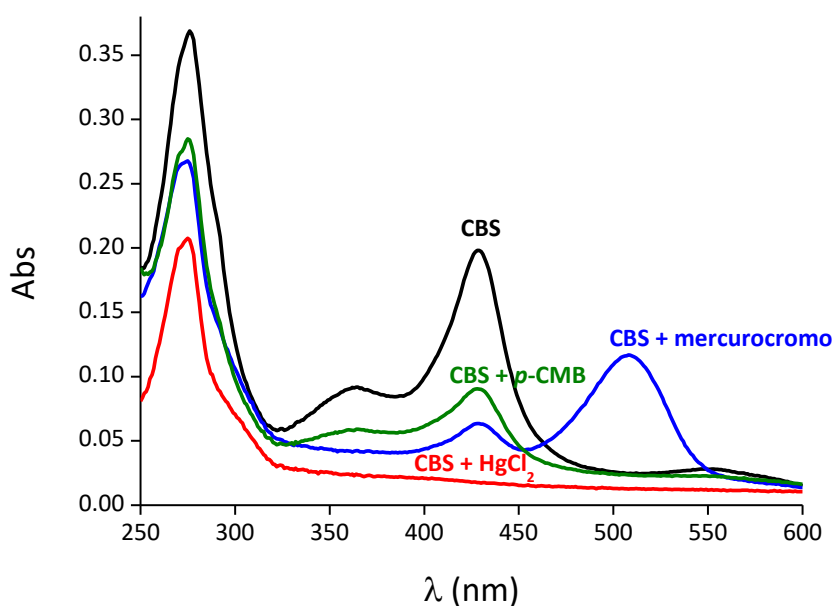


Figura 43. Espectros de absorción de las fracciones retenidas de muestras con CBS y CBS con HgCl₂, *p*-CMB y mercurocromo. Espectros de las fracciones retenidas, conteniendo moléculas con peso molecular > 10 kDa, de la solución de CBS 11 μM (negro) y de las mezclas de CBS 11 μM y HgCl₂ (rojo), *p*-CMB (verde) y mercurocromo (azul) 100 μM después de ser ultrafiltradas. En todos los espectros se detecta proteína, máximo a 280 nm, pero no en todos se detecta hemo, en el espectro de la enzima incubada con HgCl₂ no se observa el pico de Soret a 428 nm. La proporción proteína:hemo fue 1:0.54, 1:0.32 y 1:0.24 para el control, CBS con *p*-CMB y CBS con mercurocromo respectivamente.

Para verificar que el hemo se separó de la muestra con HgCl_2 y determinar si se separó en las muestras restantes, se realizaron espectros de las fracciones filtradas que poseen las moléculas con peso molecular menor a 10 kDa (Figura 44).

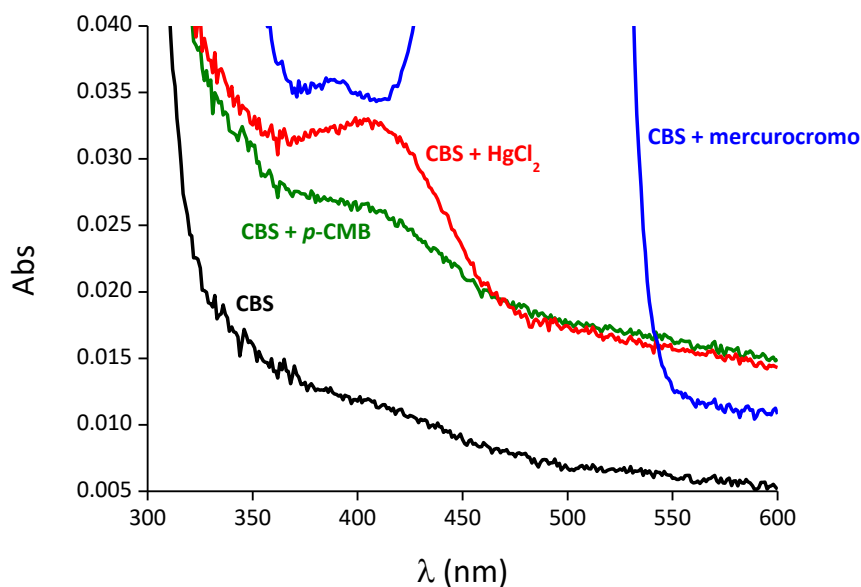


Figura 44. Espectros de absorción de las fracciones filtradas de muestras con CBS y CBS con HgCl_2 , *p*-CMB y mercurocromo. Espectros de las fracciones filtradas, conteniendo moléculas con peso molecular < 10 kDa, de la solución de CBS 11 μM (rojo) y de las mezclas de CBS 11 μM y HgCl_2 (rojo), *p*-CMB (verde) y mercurocromo (azul) 100 μM después de ser ultrafiltradas. En el espectro de CBS con HgCl_2 se distingue un máximo a 406 nm. A la misma longitud de onda, los espectros del control y de la enzima con *p*-CMB tienen la absorbancia aumentada pero no se forman máximos definidos. En la muestra con mercurocromo se observa el máximo a 500 nm del mercurocromo y un pequeño pico a 388 nm.

En el espectro de CBS con HgCl_2 se ve un pico definido a 406 nm que puede adjudicarse al hemo. En el experimento anterior el hemo en solución tenía un máximo a 422 nm; se desconoce la razón de esta diferencia. De todas maneras, se puede concluir que el HgCl_2 genera la separación del hemo de la CBS. Considerando el experimento anterior se puede concluir que a las 24 horas parte de la enzima contenía hemo mientras que otra no y a las 48 horas toda la CBS carecía de hemo. Este proceso es lento e implica la ruptura del enlace entre el hemo y el ligando His65. Para afirmar que a las 48 horas se formó la especie a 390 nm pero que el hemo se separó completamente y por eso no se detectó en el espectro de la fracción retenida, se podría repetir el experimento y realizar un espectro a la mezcla antes de ultrafiltrar.

En los espectros del control y de la enzima incubada con *p*-CMB la absorbancia a 406 nm está aumentada pero no se ven picos definidos y no se puede determinar si corresponde a hemo en solución que se separó. En el espectro de *p*-CMB este aumento es más pronunciado que en el del control. Para obtener mejores conclusiones se debería repetir el experimento a tiempos más largos de manera que la reacción entre CBS y *p*-CMB se complete permitiendo determinar en qué fracción aparece la especie de 395 nm. En el espectro de la enzima con mercurocromo hay un pico pequeño a 388 nm pero la absorbancia del mercurocromo en exceso a 500 nm interfiere y no permite sacar conclusiones. Lo que se puede afirmar es que al menos parte de la enzima permaneció unida a mercurocromo.

5.4. Medidas de actividad

5.4.1. Actividad de CBS

Para medir la actividad de la CBS, se determinó la cantidad de cistationina producida en 30 min a 37 °C por distintas concentraciones de enzima en presencia de los sustratos (serina y homocisteína), PLP y BSA. Para determinar la concentración de cistationina formada, se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de cistationina (Figura 45-A). La detección de cistationina se basó en la formación de un producto que absorbe a 453 nm. Las absorbancias a 453 nm de las mezclas de ninhidrina con los productos de CBS, se interpolaron en la curva de calibración de manera que se obtuvo la concentración de cistationina formada para cada concentración de CBS. Antes de interpolar, la absorbancia a 453 nm de cada mezcla se corrigió por el promedio de las absorbancias de los blancos que no poseían enzima. La relación entre la formación de producto y la concentración de enzima fue lineal en el rango de CBS 0-0.325 μM (Figura 45-B). A partir de la concentración de cistationina formada por CBS 0.065 y 0.325 μM , se obtuvo un valor de $(6.8 \pm 0.5) \times 10$ U/mL de actividad y $(5.8 \pm 0.4) \times 10^2$ U/mg de actividad específica, similar a los valores reportados en la literatura (81, 92, 168).

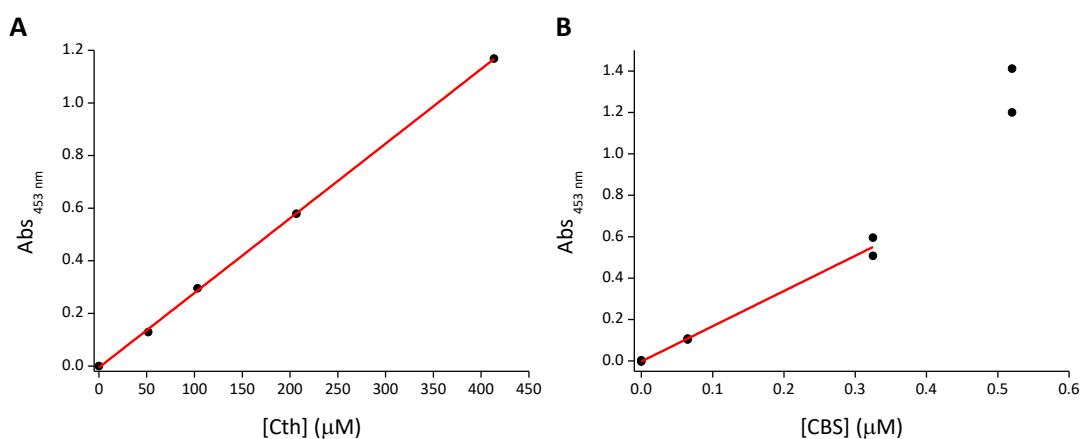


Figura 45. Determinación de la actividad de CBS. (A) Curva de calibración de cistationina. Se midió la absorbancia a 453 nm de mezclas de ninhidrina y concentraciones conocidas de cistationina. La curva tiene una pendiente de 0.00284 y un R^2 de 0.99961. (B) Absorbancia a 453 nm de mezclas de ninhidrina y los productos producidos por CBS 0.065, 0.325 y 0.52 μM . Todos los valores fueron corregidos por el promedio de las absorbancias de las mezclas sin enzima. Se observa una relación lineal en el rango 0-0.325 μM .

5.4.2. Actividad de CBS tratada con compuestos de mercurio

Para ver efectos en la actividad de la CBS, se comparó la actividad de la enzima después de ser expuesta a HgCl_2 o *p*-CMB con respecto a la actividad de la enzima control en las mismas condiciones. Antes de medir la actividad, las muestras se lavaron repetidamente con amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4) con el fin de remover el HgCl_2 y el *p*-CMB que no hubieran reaccionado. Se obtuvieron resultados de dos experimentos independientes. En uno la actividad se midió después de 0.5 y 72 horas de incubación, y en el otro después de 1.5 y 48 horas. En este

último, las muestras se prepararon por duplicado. Para cada experimento se realizó una curva de calibración de cistationina el día que se midió la actividad. Se obtuvieron curvas con pendientes de 0.00253 y 0.00308, y R^2 de 0.99948 y 0.99908, respectivamente.

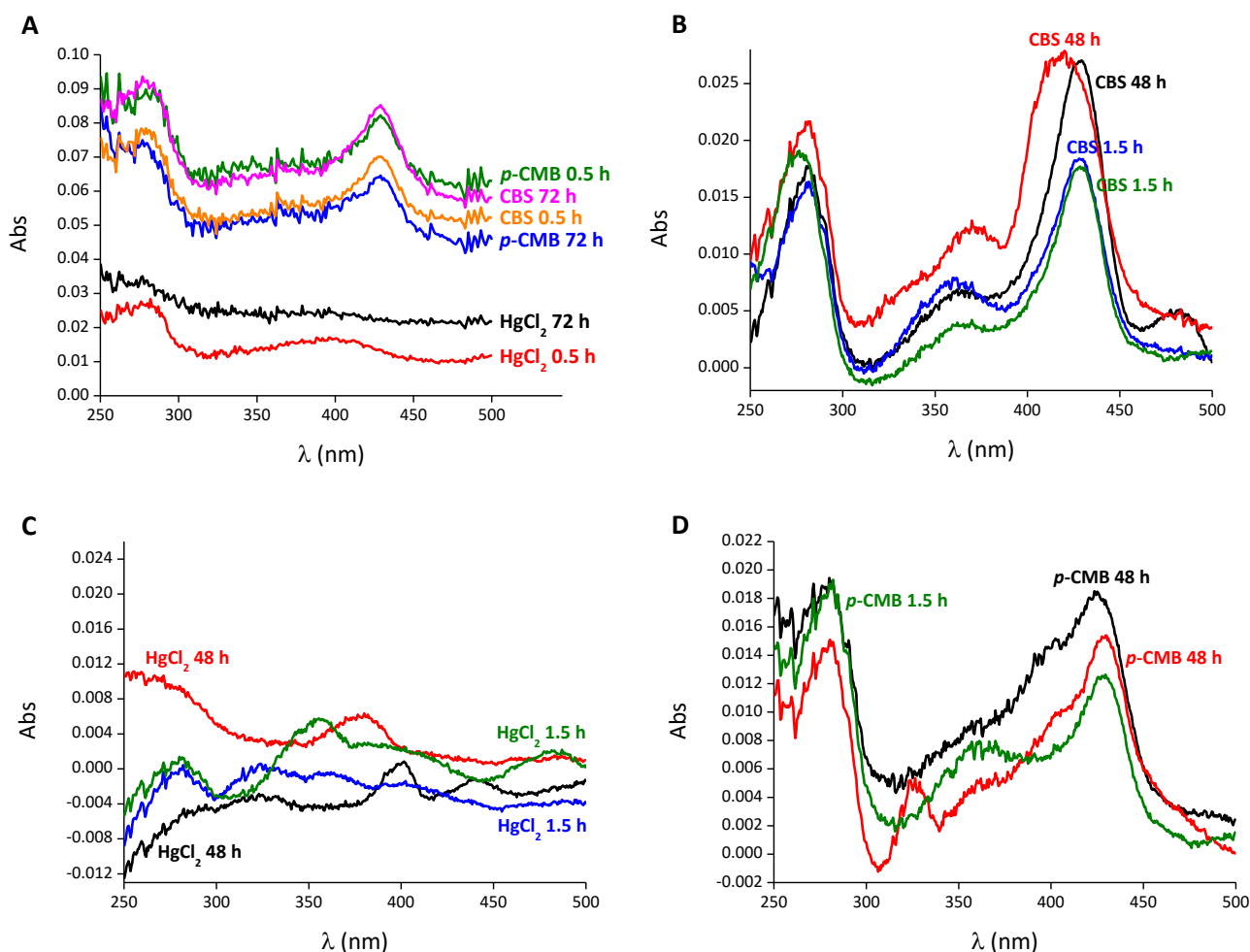


Figura 46. Espectros de CBS previamente incubada con $HgCl_2$ y p -CMB. En dos experimentos independientes, se incubó CBS ($5.7 \mu M$) con exceso de $HgCl_2$ y p -CMB ($100 \mu M$). Después de (A) 0.5 y 72 horas o (B, C, D) 1.5 y 48 horas en heladera, estas muestras y controles se ultrafiltraron y lavaron con amortiguador Tris (0.1 M, pH 7.4). (A) Espectros de CBS y CBS expuesta a $HgCl_2$ y p -CMB durante 0.5 y 72 h. (B) Espectros controles de CBS almacenados en heladera durante 1.5 y 48 h. (C) Espectros de CBS expuesta a $HgCl_2$ durante 1.5 y 48 h. (D) Espectros de CBS expuesta a p -CMB durante 1.5 y 48 h.

En la Figura 46 se observan los espectros de todas las muestras de ambos experimentos después de los lavados y antes de las medidas de actividad. La concentración de enzima de cada muestra se obtuvo de realizar $Abs_{280} - Abs_{500}$. Esta resta se hizo para tener en cuenta contribuciones a la absorbancia de, por ejemplo, turbiedad de las muestras. La mayoría de las muestras tuvieron entre 2 y 4 μM de CBS, de manera que en la mezcla con los sustratos, PLP y BSA, la concentración final fue entre 0 y 0.325 μM , en donde la formación de producto aumenta linealmente con la concentración de enzima. En todos los espectros de CBS y de CBS con p -CMB se observa el máximo a 428 nm del hemo. En algunos de los espectros de CBS con $HgCl_2$ se observa el máximo a 390 nm. No obstante, en otros espectros ni siquiera aparece el pico a 280 nm que indica la

presencia de proteína, sugiriendo que el HgCl_2 pudo haber generado agregación de proteína que se pierde luego de las centrifugaciones.

A partir de la concentración de enzima de cada muestra y de las curvas de calibración de cistationina, se determinó la concentración de producto formado por cada muestra, y a partir de ésta se calcularon las actividades específicas (Figura 47). Tomando las actividades específicas de las muestras de CBS 0.5 y 1.5 h como el 100 %, se observa que la actividad de la enzima en ausencia de compuesto de mercurio no disminuye con el tiempo. Aunque a 48 h se detecte el 92 % de la actividad específica, a las 72 h se obtuvo un valor de 103 %. A su vez, la presencia de *p*-CMB alteró la actividad específica aunque en grado muy bajo. Después de incubar la enzima con *p*-CMB por 48 h la actividad específica fue del 91 %. A las 72 h se ve un mayor descenso pero la enzima continúa teniendo el 63 % de la actividad específica. Por el contrario, la enzima es inhibida por HgCl_2 . A las 0.5 h la CBS conservaba un 38 % de actividad específica mientras que a las 72 h un 5 %. Los dos espectros de la enzima con HgCl_2 durante 1.5 h y uno de los espectros durante 48 h (Figura 46-C) sugieren que la enzima sufrió agregación o que se desnaturalizó y por lo tanto no se pudo calcular la actividad específica para estas muestras. No obstante, en el espectro de la otra muestra después de 48 h se observan picos alrededor de 280 y 390 nm. La actividad específica de esta muestra fue inhibida en un 100 % ya que la absorbancia a 453 nm fue menor que la de los blancos, es decir que no se sintetizó cistationina.

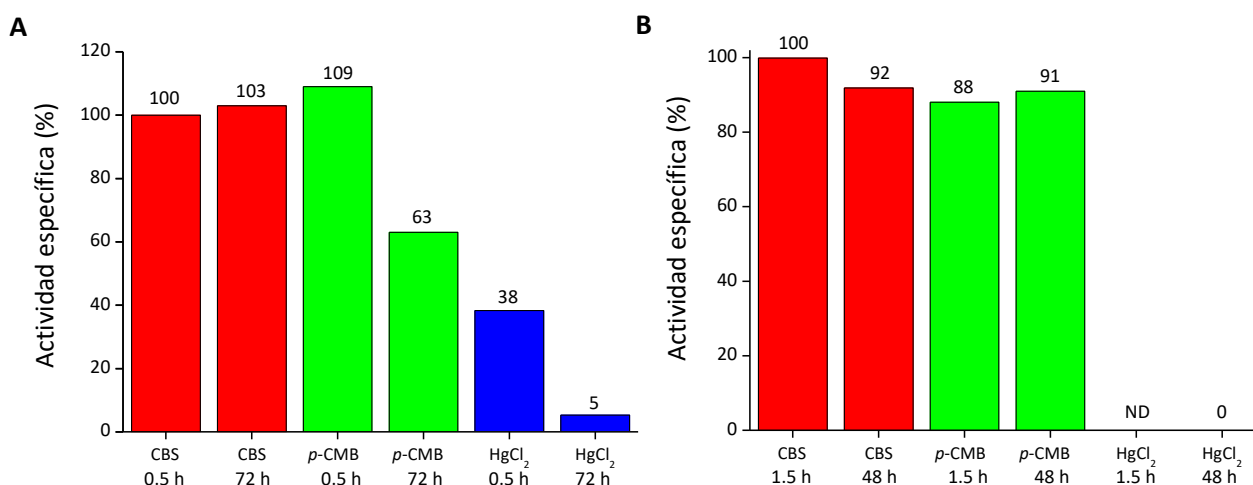


Figura 47. Actividad específica de CBS previamente incubada con HgCl_2 y *p*-CMB. Se comparan las actividades específicas de CBS sin compuesto de mercurio (rojo) y CBS expuesta a *p*-CMB (verde) y HgCl_2 (azul) por (A) 0.5 y 72 h, y (B) 1.5 y 48 h. ND: no determinado.

Contrariamente a lo esperado y a lo reportado, en estos experimentos el *p*-CMB no inhibió la actividad enzimática totalmente. Kashiwamata y Greenberg (166) habían observado que la enzima era totalmente inhibida por *p*-CMB. Esta conclusión se obtuvo de experimentos en donde se preincubó 50 μg de CBS con *p*-CMB 1 mM durante 10 min a 37 °C y luego se midió la actividad. El ensayo de actividad se realizó con el *p*-CMB presente; esto puede causar interferencia por la interacción con el sustrato homocisteína, sin embargo, se utilizaron concentraciones de sustrato en exceso (serina 99 mM y homocisteína 154 mM), por lo que la reacción entre el *p*-CMB y el tiol de la homocisteína no debería interferir con la actividad

enzimática. A su vez, en estos experimentos se observó que la adición de GSH o DTT 5 mM llevaba a la recuperación total o parcial de la actividad.

En lo que respecta al HgCl_2 , los resultados de este trabajo indican que éste inhibe completamente la actividad de la CBS. Esto es consistente con datos de la literatura; Taoka et al. (104) habían observado que el HgCl_2 inhibía la actividad enzimática. En estos experimentos las medidas de actividad fueron realizadas en presencia de HgCl_2 . Antes de medir la actividad preincubaron la CBS con distintas concentraciones de HgCl_2 durante 40 horas a 30 °C.

6. CONCLUSIONES

La caracterización de la cinética entre la CBS férrica y los compuestos de mercurio, *p*-CMB y HgCl₂, demostró que ambos reaccionan con la enzima en procesos multifásicos que llevan a la conversión del hemo hexacoordinado en una especie pentacoordinada. En este trabajo se puso especial énfasis en la primera fase, para la cual se plantearon dos hipótesis alternativas. Una de ellas postula un modelo de selección conformacional, donde la CBS hexacoordinada se encuentra en equilibrio con una especie pentacoordinada sin el ligando de cisteína. Al agregar el compuesto de mercurio, tanto *p*-CMB como HgCl₂, éste reacciona con la especie pentacoordinada formando una especie hexacoordinada que tiene como ligandos histidina y cisteína unida a una molécula del compuesto de mercurio. De acuerdo a esta hipótesis, $k = 0.3-0.4 \text{ s}^{-1}$ representa el valor de la constante de disociación de la cisteína. Un modelo de encaje inducido plantea que toda la enzima está hexacoordinada y que la adición del compuesto de mercurio genera un complejo débil que se fortalece tras un cambio conformacional, formándose una especie hexacoordinada con histidina y cisteína unida a una molécula del compuesto de mercurio como ligandos. La reacción entre la CBS y el mercurocromo también resultó multifásica, sin embargo, se decidió no estudiarla en profundidad ya que la absorbancia intrínseca del mercurocromo interfería con la caracterización cinética.

De la exposición de la enzima a compuestos que no contienen mercurio, se concluye que NEM no reacciona con el hemo-tiolato de la CBS y probablemente el Zn²⁺ tampoco.

A partir de los experimentos de ultrafiltración se concluye que el HgCl₂ genera la separación del hemo de la enzima. El *p*-CMB y mercurocromo parecerían no generar esta separación.

Las medidas de actividad sugieren que el HgCl₂ inhibe completamente la actividad enzimática, no así el *p*-CMB que la afecta solo marginalmente.

En suma, los compuestos de mercurio reaccionaron con el ligando de cisteína del hemo de la CBS férrica, llevando a una especie pentacoordinada, resultando así compuestos prometedores para la caracterización de hemoproteínas con ligandos azufrados. No obstante, la generación de especies intermedias donde el azufre está unido a ambos iones de hierro y mercurio complica la interpretación de los datos cinéticos y la obtención inequívoca del valor de la constante de disociación de la cisteína del hemo.

7. AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Ernesto y Beatriz, por abrirme las puertas del laboratorio, por brindarme todo su apoyo en cada paso, por todas sus enseñanzas y por hacerme crecer como persona.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Enzimología y del Laboratorio de Físicoquímica Biológica por la buena onda y por siempre estar dispuestos a ayudar.

A mis amigas de toda la vida por apoyarme durante toda la carrera. A mis amigos de facultad con quienes compartí todos estos años por estar para mí en cada momento y hacerme crecer; sin ellos esta experiencia no hubiese sido lo mismo.

A mi familia, mis padres y mis hermanas, que me han acompañado durante toda la carrera apoyándome en cada desafío y confiando en mí.

8. REFERENCIAS

1. Stipanuk, M. H., and Caudill, M. A. (2013) *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*, 3rd ed., Elsevier Health Sciences
2. Stipanuk, M. H. (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 539–577
3. Brosnan, J. T., Brosnan, M. E., Bertolo, R. F. P., and Brunton, J. A. (2007) Methionine: A metabolically unique amino acid. *Livestock Science.* **112**, 2–7
4. Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (2006) The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr.* **136**, 1636S–1640S
5. Griffith, O. W. (1987) Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Meth. Enzymol.* **143**, 366–376
6. Giridharan, S. S. P., Rohn, J. L., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2012) Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. *J. Cell. Sci.* **125**, 614–624
7. Lee, B. C., Peterfi, Z., Hoffmann, F. W., Moore, R. E., Kaya, A., Avanesov, A., Tarrago, L., Zhou, Y., Weerapana, E., Fomenko, D. E., Hoffmann, P. R., and Gladyshev, V. N. (2013) MsrB1 and MICALs regulate actin assembly and macrophage function via reversible stereoselective methionine oxidation. *Mol Cell.* **51**, 397–404
8. Obeid, R. (2013) The Metabolic Burden of Methyl Donor Deficiency with Focus on the Betaine Homocysteine Methyltransferase Pathway. *Nutrients.* **5**, 3481–3495
9. Kabil, O., Vitvitsky, V., Xie, P., and Banerjee, R. (2011) The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 363–372
10. Finkelstein, J. D., and Martin, J. J. (1984) Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J. Biol. Chem.* **259**, 9508–9513
11. Mudd, S. H., and Poole, J. R. (1975) Labile methyl balances for normal humans on various dietary regimens. *Metabolism.* **24**, 721–735
12. Mosharov, E., Cranford, M. R., and Banerjee, R. (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry.* **39**, 13005–13011
13. Kang, S. S., Wong, P. W., and Malinow, M. R. (1992) Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Annu. Rev. Nutr.* **12**, 279–298
14. Refsum, H., Ueland, P. M., Nygård, O., and Vollset, S. E. (1998) Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu. Rev. Med.* **49**, 31–62
15. Kraus, J. P., Janosík, M., Kozich, V., Mandell, R., Shih, V., Sperandeo, M. P., Sebastio, G., de Franchis, R., Andria, G., Kluijtmans, L. A., Blom, H., Boers, G. H., Gordon, R. B., Kamoun, P., Tsai, M. Y., Kruger, W. D., Koch, H. G., Ohura, T., and Gaustadnes, M. (1999) Cystathionine beta-synthase mutations in homocystinuria. *Hum. Mutat.* **13**, 362–375
16. Cuskelly, G. J., Stacpoole, P. W., Williamson, J., Baumgartner, T. G., and Gregory, J. F. (2001) Deficiencies of folate and vitamin B(6) exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, E1182-1190

17. Guttormsen, A. B., Ueland, P. M., Nesthus, I., Nygård, O., Schneede, J., Vollset, S. E., and Refsum, H. (1996) Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest.* **98**, 2174–2183
18. Refsum, H., Helland, S., and Ueland, P. M. (1985) Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin. Chem.* **31**, 624–628
19. Sharma, M., Tiwari, M., and Tiwari, R. K. (2015) Hyperhomocysteinemia: Impact on Neurodegenerative Diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **117**, 287–296
20. Blom, H. J., and Smulders, Y. (2011) Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 75–81
21. Bazzano, L. A., Reynolds, K., Holder, K. N., and He, J. (2006) Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* **296**, 2720–2726
22. Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group, Armitage, J. M., Bowman, L., Clarke, R. J., Wallendszus, K., Bulbulia, R., Rahimi, K., Haynes, R., Parish, S., Sleight, P., Peto, R., and Collins, R. (2010) Effects of homocysteine-lowering with folic acid plus vitamin B12 vs placebo on mortality and major morbidity in myocardial infarction survivors: a randomized trial. *JAMA.* **303**, 2486–2494
23. Xiao, Y., Su, X., Huang, W., Zhang, J., Peng, C., Huang, H., Wu, X., Huang, H., Xia, M., and Ling, W. (2015) Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **67**, 158–166
24. Van Dam, F., and Van Gool, W. A. (2009) Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: A systematic review. *Arch Gerontol Geriatr.* **48**, 425–430
25. Cacciapuoti, F. (2013) Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* **36**, 258–262
26. Liew, S.-C. (2016) Folic acid and diseases - supplement it or not? *Rev Assoc Med Bras.* **62**, 90–100
27. Stipanuk, M. H., and Ueki, I. (2011) Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 17–32
28. Stipanuk, M. H., and Beck, P. W. (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* **206**, 267–277
29. Chen, X., Jhee, K.-H., and Kruger, W. D. (2004) Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* **279**, 52082–52086
30. Singh, S., Padovani, D., Leslie, R. A., Chiku, T., and Banerjee, R. (2009) Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 22457–22466
31. Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M., and Akaike, T. (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 7606–7611

32. Yadav, P. K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M. R., and Banerjee, R. (2016) Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 289–299
33. Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., and Banerjee, R. (2009) H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* **284**, 11601–11612
34. Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., and Wang, R. (2008) H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine γ -Lyase. *Science*. **322**, 587–590
35. Kabil, O., and Banerjee, R. (2014) Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 770–782
36. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., and Banerjee, R. (2013) Structure and Kinetic Analysis of H₂S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *J Biol Chem.* **288**, 20002–20013
37. Sörbo, B. (1987) 3-Mercaptopyruvate, 3-mercaptolactate and mercaptoacetate. *Meth. Enzymol.* **143**, 178–182
38. Hannestad, U., Mårtensson, J., Sjö Dahl, R., and Sörbo, B. (1981) 3-mercaptolactate cysteine disulfiduria: biochemical studies on affected and unaffected members of a family. *Biochem Med.* **26**, 106–114
39. Niederwiesler, A., Giliberti, P., and Baerlocher, K. (1973) beta-Mercaptolactate cysteine disulfiduria in two normal sisters. Isolation and characterization of beta-mercaptolactate cysteine disulfide. *Clin. Chim. Acta.* **43**, 405–416
40. Nagahara, N., and Sawada, N. (2006) The mercaptopyruvate pathway in cysteine catabolism: a physiologic role and related disease of the multifunctional 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1219–1230
41. Nagahara, N., Nagano, M., Ito, T., Shimamura, K., Akimoto, T., and Suzuki, H. (2013) Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci Rep.* **3**, 1986
42. Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., and Kimura, H. (2009) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 703–714
43. Miyamoto, R., Otsuguro, K.-I., Yamaguchi, S., and Ito, S. (2014) Contribution of cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase to hydrogen sulfide production in peripheral neurons. *J. Neurochem.* **130**, 29–40
44. Li, L., and Moore, P. K. (2008) Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 84–90
45. Calvert, J. W., Coetzee, W. A., and Lefer, D. J. (2010) Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1203–1217
46. Gadalla, M. M., and Snyder, S. H. (2010) Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.* **113**, 14–26
47. Kimura, H. (2010) Hydrogen sulfide: from brain to gut. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1111–1123

48. Kabil, O., Motl, N., and Banerjee, R. (2014) H₂S and its role in redox signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1844**, 1355–1366
49. Toohey, J. I. (1989) Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochemical Journal.* **264**, 625–632
50. Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitiño, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.* **290**, 26866–26880
51. Cuevasanta, E., Zeida, A., Carballal, S., Wedmann, R., Morzan, U. N., Trujillo, M., Radi, R., Estrin, D. A., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Insights into the mechanism of the reaction between hydrogen sulfide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **80**, 93–100
52. Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartsaghi, S., Möller, M. N., Folkes, L. K., García-Bereguiaín, M. A., Gutiérrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R., and Alvarez, B. (2011) Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 196–205
53. Furne, J., Saeed, A., and Levitt, M. D. (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1479–1485
54. Filipovic, M. R., Miljkovic, J., Allgäuer, A., Chaurio, R., Shubina, T., Herrmann, M., and Ivanovic-Burmazovic, I. (2012) Biochemical insight into physiological effects of H₂S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochem. J.* **441**, 609–621
55. Whiteman, M., Armstrong, J. S., Chu, S. H., Jia-Ling, S., Wong, B.-S., Cheung, N. S., Halliwell, B., and Moore, P. K. (2004) The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite “scavenger”? *J. Neurochem.* **90**, 765–768
56. Gubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F., and Bouillaud, F. (2007) Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J.* **21**, 1699–1706
57. Hildebrandt, T. M., and Grieshaber, M. K. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* **275**, 3352–3361
58. Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M., and Banerjee, R. (2014) Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 30901–30910
59. Melideo, S. L., Jackson, M. R., and Jorns, M. S. (2014) Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. *Biochemistry.* **53**, 4739–4753
60. Mishanina, T. V., Libiad, M., and Banerjee, R. (2015) Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 457–464
61. Dominy, J. E., Hirschberger, L. L., Coloso, R. M., and Stipanuk, M. H. (2006) In vivo regulation of cysteine dioxygenase via the ubiquitin-26S proteasome system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **583**, 37–47
62. Stipanuk, M. H., Hirschberger, L. L., Londono, M. P., Cresenzi, C. L., and Yu, A. F. (2004) The ubiquitin-proteasome system is responsible for cysteine-responsive regulation of cysteine dioxygenase concentration in liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **286**, E439–448

63. Cresenzi, C. L., Lee, J.-I., and Stipanuk, M. H. (2003) Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J. Nutr.* **133**, 2697–2702
64. Stipanuk, M. H., Ueki, I., Dominy, J. E., Simmons, C. R., and Hirschberger, L. L. (2009) Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids.* **37**, 55–63
65. Huang, C. W., and Moore, P. K. (2015) H₂S Synthesizing Enzymes: Biochemistry and Molecular Aspects. *Handb Exp Pharmacol.* **230**, 3–25
66. Kabil, O., Zhou, Y., and Banerjee, R. (2006) Human cystathionine beta-synthase is a target for sumoylation. *Biochemistry.* **45**, 13528–13536
67. Kraus, J. P., Le, K., Swaroop, M., Ohura, T., Tahara, T., Rosenberg, L. E., Roper, M. D., and Kozich, V. (1993) Human cystathionine beta-synthase cDNA: sequence, alternative splicing and expression in cultured cells. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1633–1638
68. Frank, N., Kery, V., Maclean, K. N., and Kraus, J. P. (2006) Solvent-accessible cysteines in human cystathionine beta-synthase: crucial role of cysteine 431 in S-adenosyl-L-methionine binding. *Biochemistry.* **45**, 11021–11029
69. Ereño-Orbea, J., Majtan, T., Oyenarte, I., Kraus, J. P., and Martínez-Cruz, L. A. (2013) Structural basis of regulation and oligomerization of human cystathionine β-synthase, the central enzyme of transsulfuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E3790-3799
70. Majtan, T., Pey, A. L., Fernández, R., Fernández, J. A., Martínez-Cruz, L. A., and Kraus, J. P. (2014) Domain Organization, Catalysis and Regulation of Eukaryotic Cystathionine Beta-Synthases. *PLoS One.* 10.1371/journal.pone.0105290
71. Sen, S., and Banerjee, R. (2007) A pathogenic linked mutation in the catalytic core of human cystathionine beta-synthase disrupts allosteric regulation and allows kinetic characterization of a full-length dimer. *Biochemistry.* **46**, 4110–4116
72. Kraus, J., Packman, S., Fowler, B., and Rosenberg, L. E. (1978) Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits. *J. Biol. Chem.* **253**, 6523–6528
73. Kery, V., Bukovska, G., and Kraus, J. P. (1994) Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 25283–25288
74. Taoka, S., Widjaja, L., and Banerjee, R. (1999) Assignment of enzymatic functions to specific regions of the PLP-dependent heme protein cystathionine beta-synthase. *Biochemistry.* **38**, 13155–13161
75. Cuevasanta, E., Carballal, S., Graña, M., and Alvarez, B. (2014) The redox properties of the unique heme in cystathionine β-synthase. *BiolInorganic Reaction Mechanisms.* **9**, 27–34
76. Jhee, K. H., McPhie, P., and Miles, E. W. (2000) Yeast cystathionine beta-synthase is a pyridoxal phosphate enzyme but, unlike the human enzyme, is not a heme protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 11541–11544
77. Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., and Kruger, W. D. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *J. Biol. Chem.* **276**, 6516–6523

78. Omura, T., Sadano, H., Hasegawa, T., Yoshida, Y., and Kominami, S. (1984) Hemoprotein H-450 identified as a form of cytochrome P-450 having an endogenous ligand at the 6th coordination position of the heme. *J. Biochem.* **96**, 1491–1500
79. Meier, M., Janosik, M., Kery, V., Kraus, J. P., and Burkhard, P. (2001) Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J.* **20**, 3910–3916
80. Alexander, F. W., Sandmeier, E., Mehta, P. K., and Christen, P. (1994) Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. *Eur. J. Biochem.* **219**, 953–960
81. Banerjee, R., and Zou, C.-G. (2005) Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 144–156
82. Taoka, S., Lepore, B. W., Kabil, O., Ojha, S., Ringe, D., and Banerjee, R. (2002) Human cystathionine beta-synthase is a heme sensor protein. Evidence that the redox sensor is heme and not the vicinal cysteines in the CXXC motif seen in the crystal structure of the truncated enzyme. *Biochemistry.* **41**, 10454–10461
83. Kery, V., Poneleit, L., Meyer, J. D., Manning, M. C., and Kraus, J. P. (1999) Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry.* **38**, 2716–2724
84. Miles, E. W., and Kraus, J. P. (2004) Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J. Biol. Chem.* **279**, 29871–29874
85. Bateman, A. (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 12–13
86. Shan, X., Dunbrack, R. L., Christopher, S. A., and Kruger, W. D. (2001) Mutations in the regulatory domain of cystathionine beta synthase can functionally suppress patient-derived mutations in cis. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 635–643
87. Baykov, A. A., Tuominen, H. K., and Lahti, R. (2011) The CBS Domain: A Protein Module with an Emerging Prominent Role in Regulation. *ACS Chem. Biol.* **6**, 1156–1163
88. Ereño-Orbea, J., Majtan, T., Oyenarte, I., Kraus, J. P., and Martínez-Cruz, L. A. (2014) Structural insight into the molecular mechanism of allosteric activation of human cystathionine β -synthase by S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, E3845-3852
89. McCorvie, T. J., Kopec, J., Hyung, S.-J., Fitzpatrick, F., Feng, X., Termine, D., Strain-Damerell, C., Vollmar, M., Fleming, J., Janz, J. M., Bulawa, C., and Yue, W. W. (2014) Inter-domain communication of human cystathionine β -synthase: structural basis of S-adenosyl-L-methionine activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 36018–36030
90. Pey, A. L., Majtan, T., Sanchez-Ruiz, J. M., and Kraus, J. P. (2013) Human cystathionine β -synthase (CBS) contains two classes of binding sites for S-adenosylmethionine (SAM): complex regulation of CBS activity and stability by SAM. *Biochem. J.* **449**, 109–121
91. Vicente, J. B., Colaço, H. G., Sarti, P., Leandro, P., and Giuffrè, A. (2016) S-Adenosyl-L-methionine Modulates CO and NO• Binding to the Human H₂S-generating Enzyme Cystathionine β -Synthase. *J. Biol. Chem.* **291**, 572–581

92. Kery, V., Poneleit, L., and Kraus, J. P. (1998) Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 222–232
93. Janosik, M., Meier, M., Kery, V., Oliveriusova, J., Burkhard, P., and Kraus, J. P. (2001) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the active core of human recombinant cystathionine beta-synthase: an enzyme involved in vascular disease. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 289–291
94. DeLano, W. L. (2002) *Pymol: An open-source molecular graphics tool.*, DeLano Scientific, San Carlos, California, USA
95. Niu, W.-N., Yadav, P. K., Adamec, J., and Banerjee, R. (2015) S-glutathionylation enhances human cystathionine β -synthase activity under oxidative stress conditions. *Antioxid. Redox Signal.* **22**, 350–361
96. Evande, R., Ojha, S., and Banerjee, R. (2004) Visualization of PLP-bound intermediates in hemeless variants of human cystathionine beta-synthase: evidence that lysine 119 is a general base. *Arch. Biochem. Biophys.* **427**, 188–196
97. Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W. D., and Banerjee, R. (1998) Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 25179–25184
98. Puranik, M., Weeks, C. L., Lahaye, D., Kabil, O., Taoka, S., Nielsen, S. B., Groves, J. T., Banerjee, R., and Spiro, T. G. (2006) Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase. *J. Biol. Chem.* **281**, 13433–13438
99. Singh, S., Madzellan, P., Stasser, J., Weeks, C. L., Becker, D., Spiro, T. G., Penner-Hahn, J., and Banerjee, R. (2009) Modulation of the heme electronic structure and cystathionine beta-synthase activity by second coordination sphere ligands: The role of heme ligand switching in redox regulation. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 689–697
100. Ojha, S., Hwang, J., Kabil, O., Penner-Hahn, J. E., and Banerjee, R. (2000) Characterization of the heme in human cystathionine beta-synthase by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochemistry.* **39**, 10542–10547
101. Kim, I. C., and Deal, W. C. (1976) Isolation and properties of a new, soluble, hemoprotein (H-450) from pig liver. *Biochemistry.* **15**, 4925–4930
102. Carballal, S., Madzellan, P., Zinola, C. F., Graña, M., Radi, R., Banerjee, R., and Alvarez, B. (2008) Dioxygen reactivity and heme redox potential of truncated human cystathionine beta-synthase. *Biochemistry.* **47**, 3194–3201
103. Vicente, J. B., Colaço, H. G., Mendes, M. I. S., Sarti, P., Leandro, P., and Giuffrè, A. (2014) NO• Binds Human Cystathionine β -Synthase Quickly and Tightly. *J. Biol. Chem.* **289**, 8579–8587
104. Taoka, S., Green, E. L., Loehr, T. M., and Banerjee, R. (2001) Mercuric chloride-induced spin or ligation state changes in ferric or ferrous human cystathionine beta-synthase inhibit enzyme activity. *J. Inorg. Biochem.* **87**, 253–259
105. Celano, L., Gil, M., Carballal, S., Durán, R., Denicola, A., Banerjee, R., and Alvarez, B. (2009) Inactivation of cystathionine beta-synthase with peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **491**, 96–105
106. Carballal, S., Cuevasanta, E., Marmisolle, I., Kabil, O., Gherasim, C., Ballou, D. P., Banerjee, R., and Alvarez, B. (2013) Kinetics of reversible reductive carbonylation of heme in human cystathionine β -synthase. *Biochemistry.* **52**, 4553–4562

107. Carballal, S., Cuevasanta, E., Marmisolle, I., Kabil, O., Gherasim, C., Ballou, D. P., Banerjee, R., and Alvarez, B. (2016) Correction to Kinetics of Reversible Reductive Carbonylation of Heme in Human Cystathionine β -Synthase. *Biochemistry*. **55**, 238
108. Mayhew, S. G. (1978) The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **85**, 535–547
109. Kabil, O., Weeks, C. L., Carballal, S., Gherasim, C., Alvarez, B., Spiro, T. G., and Banerjee, R. (2011) Reversible heme-dependent regulation of human cystathionine β -synthase by a flavoprotein oxidoreductase. *Biochemistry*. **50**, 8261–8263
110. Taoka, S., West, M., and Banerjee, R. (1999) Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites. *Biochemistry*. **38**, 2738–2744
111. Ingi, T., Chiang, G., and Ronnett, G. V. (1996) The regulation of heme turnover and carbon monoxide biosynthesis in cultured primary rat olfactory receptor neurons. *J. Neurosci.* **16**, 5621–5628
112. Wu, L., and Wang, R. (2005) Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* **57**, 585–630
113. Taoka, S., and Banerjee, R. (2001) Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J. Inorg. Biochem.* **87**, 245–251
114. Carballal, S., Cuevasanta, E., Yadav, P. K., Gherasim, C., Ballou, D. P., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2016) Kinetics of nitrite reduction and peroxynitrite formation by ferrous heme in human cystathionine β -synthase. *J. Biol. Chem.*
115. Gherasim, C., Yadav, P. K., Kabil, O., Niu, W.-N., and Banerjee, R. (2014) Nitrite reductase activity and inhibition of H₂S biogenesis by human cystathionine β -synthase. *PLoS ONE*. **9**, e85544
116. Pazicni, S., Cherney, M. M., Lukat-Rodgers, G. S., Oliveriusová, J., Rodgers, K. R., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2005) The heme of cystathionine beta-synthase likely undergoes a thermally induced redox-mediated ligand switch. *Biochemistry*. **44**, 16785–16795
117. Cherney, M. M., Pazicni, S., Frank, N., Marvin, K. A., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2007) Ferrous human cystathionine beta-synthase loses activity during enzyme assay due to a ligand switch process. *Biochemistry*. **46**, 13199–13210
118. Hasegawa, T., Sadano, H., and Omura, T. (1984) Spectral similarities between “H-450” and cytochrome P-450. *J. Biochem.* **96**, 265–268
119. Kabil, O., Toaka, S., LoBrutto, R., Shoemaker, R., and Banerjee, R. (2001) Pyridoxal phosphate binding sites are similar in human heme-dependent and yeast heme-independent cystathionine beta-synthases. Evidence from ³¹P NMR and pulsed EPR spectroscopy that heme and PLP cofactors are not proximal in the human enzyme. *J. Biol. Chem.* **276**, 19350–19355
120. Koutmos, M., Kabil, O., Smith, J. L., and Banerjee, R. (2010) Structural basis for substrate activation and regulation by cystathionine beta-synthase (CBS) domains in cystathionine {beta}-synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 20958–20963
121. Shintani, T., Iwabuchi, T., Soga, T., Kato, Y., Yamamoto, T., Takano, N., Hishiki, T., Ueno, Y., Ikeda, S., Sakuragawa, T., Ishikawa, K., Goda, N., Kitagawa, Y., Kajimura, M.,

- Matsumoto, K., and Suematsu, M. (2009) Cystathionine beta-synthase as a carbon monoxide-sensitive regulator of bile excretion. *Hepatology*. **49**, 141–150
122. Singh, S., Madzelan, P., and Banerjee, R. (2007) Properties of an unusual heme cofactor in PLP-dependent cystathionine beta-synthase. *Nat Prod Rep*. **24**, 631–639
123. Weeks, C. L., Singh, S., Madzelan, P., Banerjee, R., and Spiro, T. G. (2009) Heme regulation of human cystathionine beta-synthase activity: insights from fluorescence and Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12809–12816
124. Smith, A. T., Su, Y., Stevens, D. J., Majtan, T., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2012) Effect of the disease-causing R266K mutation on the heme and PLP environments of human cystathionine β -synthase. *Biochemistry*. **51**, 6360–6370
125. Yadav, P. K., Xie, P., and Banerjee, R. (2012) Allosteric communication between the pyridoxal 5'-phosphate (PLP) and heme sites in the H₂S generator human cystathionine β -synthase. *J. Biol. Chem.* **287**, 37611–37620
126. Majtan, T., Singh, L. R., Wang, L., Kruger, W. D., and Kraus, J. P. (2008) Active cystathionine beta-synthase can be expressed in heme-free systems in the presence of metal-substituted porphyrins or a chemical chaperone. *J. Biol. Chem.* **283**, 34588–34595
127. Smith, A. T., Majtan, T., Freeman, K. M., Su, Y., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2011) Cobalt cystathionine β -synthase: a cobalt-substituted heme protein with a unique thiolate ligation motif. *Inorg Chem.* **50**, 4417–4427
128. Rice, K. M., Walker, E. M., Wu, M., Gillette, C., and Blough, E. R. (2014) Environmental mercury and its toxic effects. *J Prev Med Public Health*. **47**, 74–83
129. Utschig, L. M., Wright, J. G., and O'Halloran, T. V. (1993) Biochemical and spectroscopic probes of mercury(II) coordination environments in proteins. *Meth. Enzymol.* **226**, 71–97
130. Tamilarasan, R., and McMillin, D. R. (1986) Absorption spectra of d10 metal ion derivatives of plastocyanin. *Inorg. Chem.* **25**, 2037–2040
131. Vallee, B. L., and Ulmer, D. D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 91–128
132. Brown, P. R., and Edwards, J. O. (1969) Reaction of disulfides with mercuric ions. *Biochemistry*. **8**, 1200–1202
133. Vallee, B. L., Coombs, T. L., and Hoch, F. L. (1960) The "active site" of bovine pancreatic carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* **235**, PC45-47
134. Lipscomb, W. N., Hartsuck, J. A., Reeke, G. N., Quioco, F. A., Bethge, P. H., Ludwig, M. L., Steitz, T. A., Muirhead, H., and Coppola, J. C. (1968) The structure of carboxypeptidase A. VII. The 2.0-angstrom resolution studies of the enzyme and of its complex with glycylytyrosine, and mechanistic deductions. *Brookhaven Symp. Biol.* **21**, 24–90
135. Donkin, P., and King, H. K. (1968) Reaction between reduced pyridine nucleotides and mercuric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 973–974
136. Ramachandran, L. K., and Witkop, B. (1964) The Interaction of Mercuric Acetate with Indoles, Tryptophan, and Proteins. *Biochemistry*. **3**, 1603–1611
137. Chen, R. F. (1971) Fluorescence quenching due to mercuric ion interaction with aromatic amino acids and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **142**, 552–564
138. Kan, L. S., and Li, N. C. (1970) Nuclear magnetic resonance studies of mercury. II. Interaction with nucleosides in dimethyl sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4823–4827

139. Hartman, K. A. (1967) The infrared spectra of some complexes of metal ions with nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta.* **138**, 192–195
140. Cheng, P. Y. (1968) Characteristic optical rotatory dispersion spectra of thirteen dinucleoside phosphates with mercurials. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 746–751
141. Filimonova, M. N., Gubskaya, V. P., Nuretdinov, I. A., Benedik, M. J., Cherepanova, N. A., and Leshchinskaya, I. B. (2001) Study of the mechanism of action of p-chloromercuribenzoate on endonuclease from the bacterium *Serratia marcescens*. *Biochemistry Mosc.* **66**, 323–327
142. Pfeiffer, P., and Dorne, B. (1971) The reversible reaction of brome grass mosaic virus and its RNA with mercuric ions. *Biochim. Biophys. Acta.* **228**, 456–470
143. Wood, J. M., Kennedy, F. S., and Rosen, C. G. (1968) Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium. *Nature.* **220**, 173–174
144. Yoshida, E., Toyama, T., Shinkai, Y., Sawa, T., Akaike, T., and Kumagai, Y. (2011) Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1633–1635
145. Abiko, Y., Yoshida, E., Ishii, I., Fukuto, J. M., Akaike, T., and Kumagai, Y. (2015) Involvement of reactive persulfides in biological dimethylmercury sulfide formation. *Chem. Res. Toxicol.* **28**, 1301–1306
146. Boyer, P. D. (1954) Spectrophotometric Study of the Reaction of Protein Sulfhydryl Groups with Organic Mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 4331–4337
147. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Durán, R., Freeman, B. A., Radi, R., and Alvarez, B. (2008) Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry.* **47**, 358–367
148. Romero, N., Radi, R., Linares, E., Augusto, O., Detweiler, C. D., Mason, R. P., and Denicola, A. (2003) Reaction of human hemoglobin with peroxynitrite. Isomerization to nitrate and secondary formation of protein radicals. *J. Biol. Chem.* **278**, 44049–44057
149. Russo, A., and Bump, E. A. (1988) Detection and Quantitation of Biological Sulfhydryls. in *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D. ed), pp. 165–242, John Wiley & Sons, Inc.
150. Saville, B. (1958) A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst.* **83**, 670–672
151. Gronow, M., and Todd, P. (1969) Extension to proteins of Saville's method for thiol estimation. *Anal. Biochem.* **29**, 540–541
152. Wink, D. A., Kim, S., Coffin, D., Cook, J. C., Vodovotz, Y., Chistodoulou, D., Jourdeuil, D., and Grisham, M. B. (1999) Detection of S-nitrosothiols by fluorometric and colorimetric methods. *Meth. Enzymol.* **301**, 201–211
153. Yeh, W. K., and Ornston, L. N. (1984) p-Chloromercuribenzoate specifically modifies thiols associated with the active sites of beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase and succinyl CoA: beta-ketoadipate CoA transferase. *Arch. Microbiol.* **138**, 102–105
154. Nöhammer, G., Desoye, G., and Khoschsorur, G. (1981) Quantitative cytospectrophotometrical determination of the total protein thiols with "mercurochrom": optimization and calibration of the histochemical reaction. *Histochemistry.* **71**, 291–300

155. Nöhammer, G., and Desoye, G. (1997) Mercurochrom can be used for the histochemical demonstration and microphotometric quantitation of both protein thiols and protein (mixed) disulfides. *Histochem. Cell Biol.* **107**, 383–390
156. Wilken, A., Janzen, R., Holtkamp, M., Nowak, S., Sperling, M., Vogel, M., and Karst, U. (2010) Investigation of the interaction of Mercurochrome constituents with proteins using liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **397**, 3525–3532
157. Turell, L., Botti, H., Bonilla, L., Torres, M. J., Schopfer, F., Freeman, B. A., Armas, L., Ricciardi, A., Alvarez, B., and Radi, R. (2014) HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **944**, 144–151
158. Barr, I., Smith, A. T., Senturia, R., Chen, Y., Scheidemantle, B. D., Burstyn, J. N., and Guo, F. (2011) DiGeorge critical region 8 (DGCR8) is a double-cysteine-ligated heme protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 16716–16725
159. Kitanishi, K., Igarashi, J., Hayasaka, K., Hikage, N., Saiful, I., Yamauchi, S., Uchida, T., Ishimori, K., and Shimizu, T. (2008) Heme-binding characteristics of the isolated PAS-A domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochemistry.* **47**, 6157–6168
160. Hayasaka, K., Kitanishi, K., Igarashi, J., and Shimizu, T. (2011) Heme-binding characteristics of the isolated PAS-B domain of mouse Per2, a transcriptional regulatory factor associated with circadian rhythms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1814**, 326–333
161. Sundaramoorthy, M., Turner, J., and Poulos, T. L. (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase–cytochrome P450 functional hybrid. *Structure.* **3**, 1367–1378
162. Blanke, S. R., Martinis, S. A., Sligar, S. G., Hager, L. P., Rux, J. J., and Dawson, J. H. (1996) Probing the heme iron coordination structure of alkaline chloroperoxidase. *Biochemistry.* **35**, 14537–14543
163. Chen, J. J., and London, I. M. (1995) Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 105–108
164. Martinkova, M., Igarashi, J., and Shimizu, T. (2007) Eukaryotic initiation factor 2alpha kinase is a nitric oxide-responsive mercury sensor enzyme: potent inhibition of catalysis by the mercury cation and reversal by nitric oxide. *FEBS Lett.* **581**, 4109–4114
165. Cuevasanta Dans, E. M. (2008) Cistationina β -sintasa y sulfuro de hidrógeno, p. 72, Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo
166. Kashiwamata, S., and Greenberg, D. M. (1970) Studies on cystathionine synthase of rat liver. Properties of the highly purified enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* **212**, 488–500
167. Kraus, J. P. (1987) Cystathionine beta-synthase (human). *Meth. Enzymol.* **143**, 388–394
168. Pazicni, S., Lukat-Rodgers, G. S., Oliveriusová, J., Rees, K. A., Parks, R. B., Clark, R. W., Rodgers, K. R., Kraus, J. P., and Burstyn, J. N. (2004) The redox behavior of the heme in cystathionine beta-synthase is sensitive to pH. *Biochemistry.* **43**, 14684–14695
169. Hammes, G. G., Chang, Y.-C., and Oas, T. G. (2009) Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 13737–13741

170. Vogt, A. D., and Di Cera, E. (2012) Conformational selection or induced fit? A critical appraisal of the kinetic mechanism. *Biochemistry*. **51**, 5894–5902
171. Gianni, S., Dogan, J., and Jemth, P. (2014) Distinguishing induced fit from conformational selection. *Biophys. Chem.* **189**, 33–39
172. Vadon-Le Goff, S., Delaforge, M., Boucher, J. L., Janosik, M., Kraus, J. P., and Mansuy, D. (2001) Coordination chemistry of the heme in cystathionine beta-synthase: formation of iron(II)-isonitrile complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 487–492
173. Sillén, L. G., and Martell, A. E. (1971) *Stability constants of metal-ion complexes.*, Chemical Society, London
174. Bednar, R. A. (1990) Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to N-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry*. **29**, 3684–3690