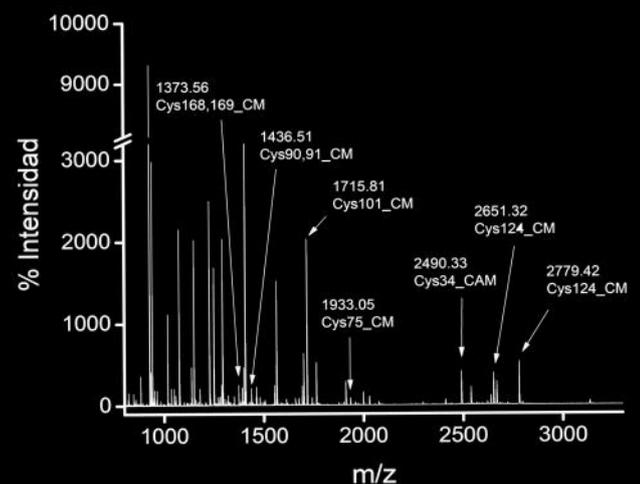
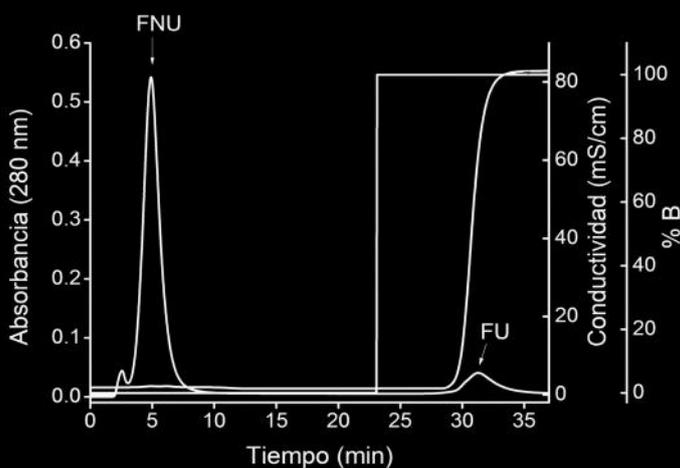
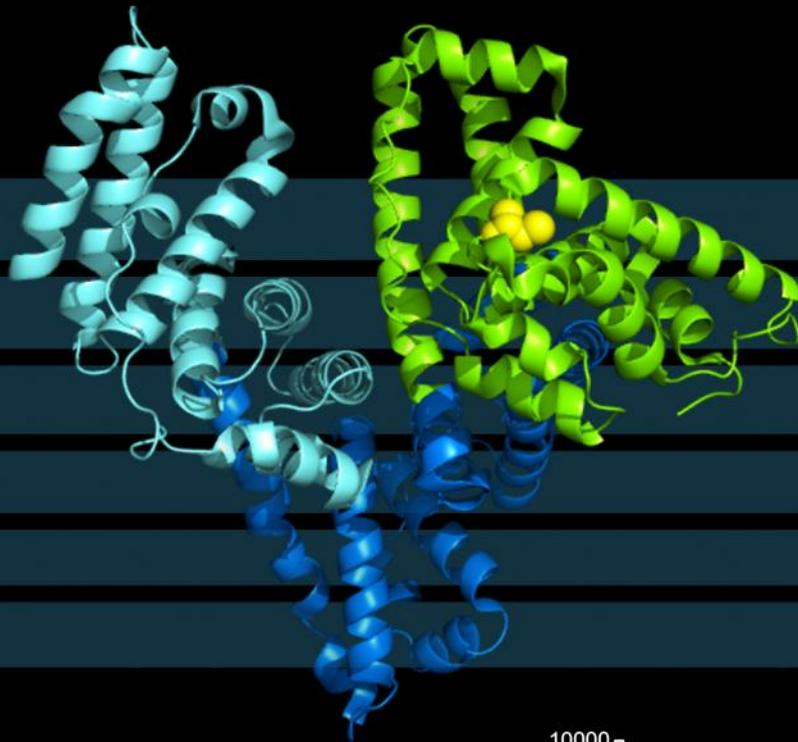


DERIVADOS OXIDADOS DEL TIOL DE LA ALBUMINA HUMANA



Martina Steglich Guarino

Directora: Lucía Turell

Codirectora: Beatriz Alvarez

Laboratorio de Enzimología

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Diciembre 2018

DERIVADOS OXIDADOS DEL TIOL DE LA ALBÚMINA HUMANA

Martina Steglich Guarino

Directora: Lucía Turell

Codirectora: Beatriz Alvarez

Tesis de Maestría en Química

PEDECIBA Química - Facultad de Química

Laboratorio de Enzimología - Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Diciembre 2018

ÍNDICE

1	RESUMEN	5
2	INTRODUCCIÓN.....	7
2.1	Tioles y oxidaciones biológicas	7
2.1.1	Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	7
2.1.2	Generalidades y funciones.....	8
2.1.3	Oxidación de tioles biológicos.....	10
2.1.4	Ácido sulfénico en proteínas.....	11
2.2	Albúmina sérica humana	12
2.2.1	Generalidades y estructura.....	12
2.2.2	Metabolismo y distribución	13
2.2.3	Funciones	14
2.2.4	Aplicaciones clínicas.....	17
2.3	Tiol de la albúmina y sus derivados oxidados	17
2.3.1	Reactividad del tiol.....	17
2.3.2	Ácido sulfénico, un intermediario clave.....	19
2.3.3	Contexto intravascular	21
2.3.4	Heterogeneidad del tiol	23
2.3.5	Estado redox del tiol en patologías.....	24
2.3.6	Análisis del estado redox del tiol por cromatografía	26
2.4	Expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	29
2.4.1	Vía de utilización del metanol y promotores AOX	30
2.4.2	Promotores alternativos	31
2.4.3	Vectores de expresión	31
2.4.4	Cepas.....	33
2.4.5	Integración, transformación y selección.....	33
2.5	Albúmina recombinante	35
2.5.1	Sistemas de expresión de albúmina recombinante.....	35
2.5.2	Propiedades, usos y aplicaciones de la albúmina producida en <i>P. pastoris</i>	36
2.5.3	Experiencia previa de nuestro grupo con albúmina recombinante.....	37
3	OBJETIVOS.....	38
4	MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1	Equipamiento.....	39

4.2	Análisis de muestras de plasma por cromatoenfoque	39
4.2.1	Materiales y soluciones.....	39
4.2.2	Métodos.....	40
4.3	Expresión, purificación y caracterización del DomI	41
4.3.1	Materiales y soluciones.....	41
4.3.2	Medios de cultivo.....	42
4.3.3	Métodos.....	42
4.3.4	Servicios y plataformas	48
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1	Análisis de muestras de plasma por cromatoenfoque	49
5.1.1	Puesta a punto de la cantidad de HSA de inyección y análisis de las isoformas por cromatoenfoque	50
5.2	Expresión, purificación y caracterización del DomI	54
5.2.1	Dominio I con mutaciones sinónimas (DomI _{MS}).....	54
5.2.2	Dominio I de la secuencia de referencia (DomI _{SR})	73
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	81
7	REFERENCIAS.....	83
8	ANEXO	96
9	AGRADECIMIENTOS	97

ABREVIATURAS

RSH	Tiol o sulfhidrilo
RSOH	Ácido sulfénico
RSSR'	Disulfuro
RSO ₂ H	Ácido sulfínico
HSA	Albúmina sérica humana
HSA-SH	Albúmina con el tiol en la forma reducida
HSA-SOH	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfénico
HSA-SO ₂ H	Albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfínico
HMA	Fracción mercaptalbúmina, albúmina con el tiol reducido
HNA	Fracción no mercaptalbúmina, albúmina con el tiol modificado
<i>AOX1</i> y <i>AOX2</i>	Genes para la expresión de la alcohol oxidasa
HSA _r	Albúmina recombinante
DomI	Dominio I de la albúmina
DomI _{MS}	Dominio I con dos mutaciones sinónimas en el ADN codificante
DomI _{SR}	Dominio I generado a partir de la secuencia de referencia para la albúmina
DTNB	5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoato)
MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con detección por tiempo de vuelo

1 RESUMEN

La albúmina sérica humana (HSA), es una proteína monomérica compuesta por tres dominios, conocidos como dominios I, II y III. Presenta en su estructura 17 puentes disulfuro y una única cisteína libre (Cys34) que se localiza en el dominio I (DomI). La HSA es la proteína mayoritaria del plasma y su tiol se encuentra principalmente reducido (HSA-SH), constituyendo el 80% de los tioles reducidos en el compartimiento intravascular. Una fracción menor se encuentra formando disulfuros con tioles de bajo peso molecular (HSA-SSR) u oxidado a ácidos sulfínico (HSA-SO₂H) y sulfónico (HSA-SO₃H). En esta tesis se profundizó en el análisis de las isoformas de la HSA en plasma mediante cromatoenfoco y se trabajó en la expresión, purificación y caracterización del dominio I (DomI) de la HSA producido en *Pichia pastoris*.

En cuanto al cromatoenfoco, se realizó una puesta a punto del análisis de muestras de plasma de donantes sanos mediante controles de precipitación de HSA en el amortiguador de trabajo y estableciendo la cantidad de HSA a inyectar para obtener una buena resolución. El cromatoenfoco es reproducible y puede utilizarse tal como se puso a punto, para estudiar el aumento de las fracciones oxidadas de la HSA de personas con sepsis.

Por otra parte, se expresó el DomI en *P. pastoris* a partir de dos construcciones. Una conteniendo dos mutaciones sinónimas en su secuencia (DomI_{MS}) y otra generada a partir de la secuencia de referencia de la HSA (DomI_{SR}). Ambos DomI se expresaron y secretaron correctamente hacia el medio de cultivo, y mostraron la presencia de un pigmento marrón.

Respecto al DomI_{MS}, la eliminación de la mayor parte del pigmento se logró con una cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0 y elución con NaCl 1 M. La reducción selectiva de dicha cisteína se logró por incubación con 2-mercaptoetanol, como se vio por reacción con 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB) y espectrometría de masa. Además se determinó la constante de reacción de la Cys34 de DomI con DTNB. El valor de 229 M⁻¹ s⁻¹ resultó ~ 16 veces mayor que el de la HSA deslipidada, en iguales condiciones experimentales.

En relación al DomI_{SR}, se transformaron células de la cepa GS115 His⁻ Mut⁺, se seleccionaron primero transformantes, y luego transformantes multicopia. Se prepararon crioinóculos que expresaron el DomI_{SR} correctamente. En un ensayo preliminar se vio que la Cys34 del DomI_{SR} se reduce en iguales condiciones que la del DomI_{MS} y reacciona con DTNB con una constante similar, sugiriendo que no existen diferencias estructurales entre ambos

dominios. La obtención del DomI de la HSA abre la posibilidad a realizar estudios estructurales de las formas oxidadas de la Cys34, que sumen a la comprensión de la naturaleza química y reactividad de las mismas. Además, el conocimiento generado en torno al pigmento significará un aporte importante respecto al uso de *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Tioles y oxidaciones biológicas

2.1.1 Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS respectivamente) incluyen especies radicalares y no radicalares de relevancia fisiológica, relacionadas a los productos de reacción parcial del oxígeno. Algunas de ellas son el radical hidroxilo (OH^\cdot), el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), los radicales peroxilo (ROO^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO^\cdot), el peroxinitrito (ONOO^-), el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), el dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y el ácido hipocloroso (HOCl). Durante muchos años se asumió que el rol de estas especies en la biología estaba limitado a reacciones de oxidación de biomoléculas que impactaban perjudicialmente sobre las funciones biológicas, produciendo daño a nivel celular. Este paradigma cambió con el descubrimiento de que el NO^\cdot , una pequeña molécula radicalar de difusión libre, se generaba endógenamente en mamíferos y participaba en vías de transducción de señales. Este nuevo rol del NO^\cdot se extendió a los RNS y ROS, ganando gran aceptación. Actualmente se sabe que las especies oxidantes se generan en el organismo y que participan en eventos de señalización de manera que son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis. De hecho, el resultado de la generación de estos oxidantes depende de varios factores. Por ejemplo, es importante la naturaleza, la reactividad y la concentración tanto de la especie oxidante como de su molécula blanco. También son determinantes los fenómenos de difusión y la localización celular del oxidante, así como la presencia de moléculas encargadas de la defensa antioxidante. Se debe diferenciar entonces la señalización redox del estrés oxidativo. El primero comprende las respuestas biológicas impulsadas por cambios en los niveles de especies oxidantes (1), mientras que el estrés oxidativo se refiere a la alteración de dicha señalización, producida por el desbalance entre los oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros (2).

En la célula, son varias las fuentes de especies oxidantes. Algunas de ellas son enzimas, como las NADPH oxidasas, mieloperoxidasa, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa. También se generan por medio de la cadena de transporte de electrones mitocondrial como consecuencia directa del metabolismo aeróbico. Dada la relevancia de la producción de especies oxidantes y su participación en la señalización celular, se trata de un tema continuamente revisado en la literatura (3, 4).

2.1.2 Generalidades y funciones

El azufre es un elemento presente en la naturaleza en una gran variedad de biomoléculas, que incluyen a las proteínas, azúcares, ácidos nucleicos, cofactores y metabolitos de bajo peso molecular. Es por esto que junto con el carbono, nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y fósforo, es un componente elemental de los seres vivos. En la tabla periódica puede encontrarse al azufre en el grupo VIA junto al oxígeno, por lo que comparten en cierta medida propiedades como la reactividad química. Sin embargo, al posicionarse el azufre un período más abajo que el oxígeno, adquiere propiedades distintas que son aprovechadas por las moléculas que lo contienen. Un ejemplo surge de comparar los enlaces disulfuro y los enlaces peróxido, donde la mayor estabilidad de los primeros es una de las principales causas de que sean una pieza fundamental de la estructura de las proteínas, y no así los segundos. Otro ejemplo es la acidez de las moléculas que lo contienen, como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) versus el H_2O . Como consecuencia de que posee seis electrones de valencia y un orbital *d* vacío, el azufre puede adoptar una amplia variedad de estados de oxidación, cada uno con reactividades y propiedades físicas propias. La forma totalmente reducida está representada por los tioles (RSH) y posee un estado de oxidación de -2. La nucleofilia del mismo se ve aumentada en la forma desprotonada, conocida como anión tiolato (RS^-). Dentro de las formas oxidadas se incluyen los disulfuros (RSSR') y los ácidos sulfénico (RSOH), sulfínico (RSO_2H) y sulfónico (RSO_3H) (5, 6).

En sistemas biológicos los tioles pueden encontrarse en cisteínas y sus derivados de alto y bajo peso molecular. Se caracterizan por ser además de buenos nucleófilos, buenos reductores ($E^\circ(\text{RSSR}/2\text{RSH})_{\text{Cys libre}} = -0.24 \text{ V}$) (7). La capacidad del tiol de pasar de su estado reducido a sus diferentes estados oxidados les confiere gran versatilidad química. Como consecuencia, los tioles participan de un amplio espectro de reacciones y procesos en proteínas, que se manifiestan en las distintas funciones que pueden cumplir. Se estima que el 80% de las cisteínas proteicas son funcionalmente importantes, mientras que solo un 20% no presenta funciones específicas (8). Desde el punto de vista evolutivo, se ha visto que la cisteína como aminoácido posee un patrón de conservación inusual, pudiendo estar poco o muy conservada. Esto depende de varios factores, uno de ellos, la existencia o no de una función específica (9). Se pueden definir los distintos tipos de cisteínas según sus funciones (10):

Cisteínas que catalizan reacciones redox. Se encuentran por ejemplo, en el sitio activo de oxidorreductasas y están involucradas directamente en la catálisis. Son residuos muy conservados en cuanto a su posición en la secuencia y su función. Como consecuencia de su participación en reacciones de oxidación, reducción e isomerización de disulfuros, entre

otras, el estado de oxidación de estas cisteínas cambia, siendo posteriormente regenerado por enzimas especializadas.

Cisteínas reguladoras. También son cisteínas conservadas. No son catalíticas pero mediante cambios en su estado redox se encargan de modular la actividad de las proteínas que las contienen. Se encuentran en factores de transcripción como por ejemplo OxyR de *Escherichia coli*, Yap1 de *Saccharomyces cerevisiae*, así como en quinasas y fosfatasas, y de esta manera participan de procesos de señalización redox. Algunas de las modificaciones oxidativas que pueden sufrir estas cisteínas, y en las que se basan estos mecanismos de señalización, son formación de disulfuros inter e intramoleculares, S-nitrosación y glutationilación.

Cisteínas estructurales. Son aquellas que forman puentes disulfuro inter e intramoleculares, y que por lo tanto son, entre otros factores, determinantes de la estructura y el plegamiento de la proteína. Se ha visto que la formación de disulfuros intramoleculares es uno de los principales mecanismos de estabilización estructural. Estos son muy comunes en proteínas de secreción como la HSA.

Cisteínas que coordinan iones metálicos. Son residuos altamente conservados, capaces de coordinar iones metálicos de zinc, cobre, níquel, cobalto, magnesio, hierro y molibdeno. Estos metales pueden ser elementos importantes para estabilizar la estructura de la proteína, pueden estar directamente involucrados en la catálisis o funcionar como cofactores. Algunas de ellas pueden ser sensibles a la oxidación.

Cisteínas catalíticas no redox. Como su nombre lo indica, si bien participan de la catálisis, no cambian su estado de oxidación. Son cisteínas altamente reactivas que se encuentran en el sitio activo de la enzima y cuyas propiedades nucleofílicas son responsables de la catálisis. Este tipo de cisteínas puede encontrarse por ejemplo, en enzimas como la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa y las proteasas de cisteína.

Cisteínas como sitios de modificaciones postraduccionales. En este caso el tipo de modificación influye en la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo puede determinar su interacción con otras proteínas o la unión de la misma a una membrana, como es el caso de la palmitoilación o isoprenilación.

Esta categorización no es estricta ya que hay cisteínas que caen en más de una categoría. También existen cisteínas sin funciones específicas que tienen baja conservación. Por lo general comparten características como ser poco reactivas, poseer el átomo de azufre poco expuesto, no estar cerca de otras cisteínas y presentar un pK_a alto.

La relevancia de la cisteína y de las funciones que puede abarcar, se ve resaltada si se piensa en el porcentaje que representa este aminoácido en la composición de las proteínas. En humanos, del total de 20 aminoácidos, el porcentaje típico de cisteína en proteínas es de ~ 2%. Además se ha visto que dicho contenido no es igual en todos los organismos, sino que aumenta con la complejidad de los mismos. Se postuló que las habilidades de la cisteína han sido incorporadas por la evolución y aprovechadas para el desarrollo de organismos más complejos (11).

2.1.3 Oxidación de tioles biológicos

La oxidación de tioles puede dar lugar a distintos productos, según el proceso de oxidación que ocurra. Estos pueden incluir mecanismos de uno y dos electrones. Dentro de las oxidaciones por dos electrones se encuentran las reacciones de intercambio tiol-disulfuro reversibles que dan lugar a la formación de nuevos disulfuros (RSSR') (Figura 2.1, vía *a*), así como la reacción con hidroperóxidos (POOH) que conduce a la formación de ácidos sulfénicos (RSOH) (Figura 2.1, vía *b*). Estos son por lo general inestables y se generan como intermediarios en procesos de oxidación, sobreoxidándose a ácidos sulfínico (RSO₂H) y sulfónico (RSO₃H), productos típicamente irreversibles. El ácido sulfénico puede también reaccionar con un tiol para dar un disulfuro, con otro sulfénico para dar un tiosulfinato (RS(O)SR'), o con una amina o amida generando una sulfenamida (RSNHR'). En lo que respecta a las oxidaciones por un electrón, los tioles pueden reaccionar con radicales libres formando radicales tiolo (RS•) altamente reactivos (Figura 2.1, vía *c*). Estos pueden reaccionar consigo mismos o con tioles, para formar disulfuros o radical anión disulfuro (RSSR^{•-}), respectivamente. Por último, por reacción de un radical tiolo con oxígeno se genera radical tioperoxilo (RSOO•) que a su vez puede dar origen a ácidos sulfínico y sulfónico (12, 13).

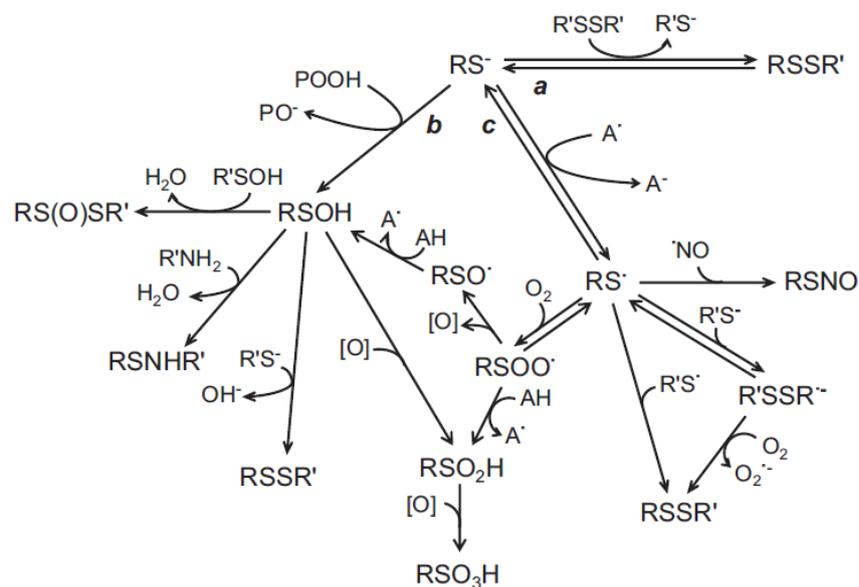


Figura 2.1. Vías de oxidación del tiol por mecanismos de uno y dos electrones. Tomado de (13).

2.1.4 Ácido sulfénico en proteínas

El ácido sulfénico se genera como intermediario en la oxidación de tioles proteicos, por mecanismos de uno y dos electrones. Por un electrón, se forma por reacción del radical tiilo con oxígeno. Por dos electrones se puede formar por ejemplo, por hidrólisis de disulfuros, o por reacción del anión tiolato con peróxido de hidrógeno, alquil hidroperóxidos, ácido peroxinitroso/peroxinitrito, ácidos hipohalosos como el ácido hipocloroso y cloraminas (4, 14).

Una característica muy importante del ácido sulfénico es su carácter dual. Esto hace referencia a que puede actuar como electrófilo y como nucleófilo, lo que le da versatilidad a esta especie. Una vez formado, el sulfénico inestable puede ser transformado en especies de mayor estabilidad, por distintas reacciones. Como se comentó previamente, el sulfénico puede sobreoxidarse para dar los ácidos sulfínico y sulfónico, puede reaccionar con un tiol para dar un disulfuro, o con otro sulfénico para dar un tiosulfonato. También puede dar una sulfenamida por reacción con aminas y amidas (Figura 2.1) (5, 14).

Los ácidos sulfénicos de bajo peso molecular presentan en general una vida media muy corta debido fundamentalmente a la rápida reacción con otro tiol para dar un disulfuro (15, 16). En proteínas, la reactividad del ácido sulfénico depende de varios factores que están determinados por el microambiente proteico. El mayor determinante de la estabilidad es la ausencia de tioles en las proximidades con los que pueda reaccionar. Además influye la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, la accesibilidad al solvente y por lo tanto su exposición (14).

La formación de ácido sulfénico ha sido detectada en una gran variedad de proteínas, mostrando roles diversos. Algunos forman parte del ciclo catalítico de enzimas antioxidantes como es el caso de las peroxirredoxinas y de la metionina sulfóxido reductasa. Otros están involucrados en sensar señales y gatillar respuestas celulares frente a especies oxidantes. Ejemplos de estos son los sulfénicos que se forman en algunas fosfatasas y receptores proteínas quinasas de tirosina. También hay factores de transcripción sensibles a peróxidos en los que se ha evidenciado cómo la oxidación de una cisteína crítica puede determinar por ejemplo la desrepresión de la transcripción de un gen. El alcance de la señalización celular mediada por ácido sulfénico es grande y puede repercutir en el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, así como en la respuesta inmune, entre otras (5, 14).

2.2 Albúmina sérica humana

2.2.1 Generalidades y estructura

La albúmina sérica humana (HSA, por su nombre en inglés, Human Serum Albumin) comprende el 60% del total de las proteínas plasmáticas, lo que la convierte en la proteína mayoritaria del plasma. Con una concentración de 43 g/L (~ 0.6 mM), la HSA cumple varias funciones en dicho compartimento, que se relacionan con su estructura y sus características fisicoquímicas. En su secuencia primaria se destaca un alto número de aminoácidos ácidos y básicos que son los responsables de que a pH 7, por cada molécula de HSA haya 215 iones. Esto se corresponde con una carga neta de -19 a dicho pH, lo que le confiere una buena solubilidad en medio acuoso. Además, la HSA presenta un único triptofano y 35 residuos de cisteína. De estas, 34 se encuentran formando 17 puentes disulfuro y solo una queda libre, la Cys34. Sobre dicha cisteína se profundizará más adelante. Otra particularidad de esta proteína es que carece de grupos prostéticos y que a diferencia de la mayoría de las proteínas plasmáticas, no se encuentra glicosilada ya que carece de secuencias consenso de glicosilación en su secuencia primaria (17).

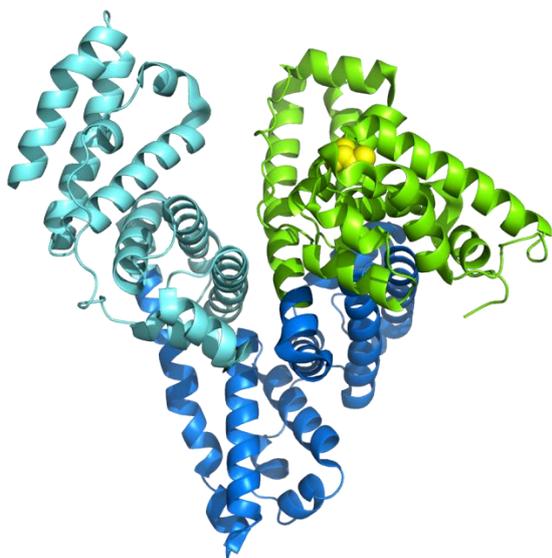


Figura 2.2. Estructura tridimensional de la HSA. Se muestra el dominio I en verde, el II en azul y el III en celeste. En amarillo se muestra la Cys34. La figura se generó utilizando PyMol (PDB ID: 4EMX).

Actualmente existen varias estructuras cristalográficas de la HSA con y sin ligandos. En las mismas, se puede apreciar que se trata de una proteína monomérica globular, compuesta en un 67% por α -hélices y sin hojas β -plegadas. Además está formada por tres dominios homólogos denominados dominio I, II y III (contando desde el amino terminal), que a su vez se dividen en subdominios A y B cada uno (Figura 2.2). Más allá de su similitud estructural, la disposición de estos dominios es asimétrica y le dan a la HSA su forma característica de corazón. Los dominios I y II se posicionan casi

perpendiculares entre sí mientras que el III se desprende del II en un ángulo de 45° (18). La molécula de HSA también puede sufrir cambios conformacionales. Por ejemplo, dependiendo del grado de acidez o basicidad de la solución se pueden encontrar distintos isómeros: N (“normal”) entre pH 8 y 4.3, F (“fast”) entre pH 4.3 y 3, E (“extended”) por

debajo de pH 3, B (“basic”) a pH mayor a 8 y A (“aged”) a pH mayor a 10 (17). Asimismo, se pueden producir cambios como consecuencia de la unión de ligandos. En el caso de los ácidos grasos, su unión induce modificaciones tanto a nivel global como local. Globalmente, se producen rotaciones relativas de los dominios que determinan cambios en la posición de uno respecto a otro. En lo local, los cambios son más sutiles pero de importancia ya que conducen a una mayor exposición de la Cys34 (19, 20). Además, en un trabajo reciente en el que participó nuestro grupo se ha evidenciado cómo la ionización de la Cys34 genera variaciones en la rigidez de su entorno local. Cuando la Cys34 se encuentra en su estado más reactivo, es decir, como tiolato, hay una reducción en la flexibilidad y adaptabilidad de la estructura en torno a ella (21).

2.2.2 Metabolismo y distribución

La síntesis de la HSA se lleva a cabo principalmente en el hígado. Esto sucede a una velocidad de 10-15 g/día en adultos sanos, lo que representa el 10% de la síntesis proteica de dicho órgano (22). La síntesis sigue la regla de “un gen-una proteína” y como resultado de la traducción del ARN mensajero se obtiene la pre-pro-albúmina (preproHSA). Como su nombre lo indica, esta posee dos segmentos adicionales que se ubican en el extremo amino terminal. Uno de ellos, el prepéptido, se compone de 18 aminoácidos y es la señal de secreción que se encarga de dirigir a la cadena en crecimiento a través de la membrana del retículo endoplásmico a la cual se ancla para continuar su traducción. El propéptido por otro lado, está formado por 6 aminoácidos y su función es desconocida. El plegamiento de la cadena polipeptídica se da cotraduccionalmente y al ser una proteína monomérica, no necesita ensamblaje de cadenas. Antes de que finalice la traducción comienza la formación de puentes disulfuro en sentido amino-carboxilo terminal. Esta se da de manera secuencial a lo largo de la cadena polipeptídica, empezando desde la segunda cisteína. Una peptidasa localizada en la membrana del retículo endoplásmico en el sitio de traslocación se encarga de cortar el prepéptido, y la proteína pasa a llamarse proHSA. Una vez plegada y en el lumen del retículo, el propéptido es cortado por una convertasa, dando lugar a la HSA madura. En ese momento la HSA está pronta para ser secretada del hepatocito (17).

Dado que no existe almacenamiento de HSA en el hepatocito, una vez sintetizada se secreta al torrente sanguíneo inmediatamente. De allí pasa a localizarse en un 60% en espacios intersticiales y extracelulares, principalmente piel y músculo. El resto permanece en el compartimento intravascular. La vida media de la proteína es de 19 días y se estima que cada 22-24 h una molécula de HSA abandona la circulación. La degradación tiene lugar principalmente en músculo, piel, hígado y riñón (17).

En el organismo, la HSA puede asociarse a la superficie de células endoteliales por unión específica, de manera consistente con una interacción receptor-ligando. La HSA nativa por ejemplo, es reconocida por un receptor denominado gp60 o albodina, que se encuentra en células endoteliales. Este receptor es el encargado del transporte transendotelial de la HSA nativa. Al unirse la HSA a gp60 se produce la internalización y subsecuente transcitosis, sin ingresar aparentemente al sistema de degradación lisosomal (17, 23). La HSA no nativa, sea que se encuentre desnaturalizada o modificada en residuos específicos, se une a los receptores gp18 y gp30. Estos receptores, también presentes en células endoteliales, median la unión de la HSA no nativa a la superficie celular para que sea luego endocitada y degradada en los lisosomas. Se ha postulado que el cambio conformacional en la HSA inducido por los distintos tipos de modificación es suficiente para prevenir el reconocimiento de gp60 y aumentar la afinidad por gp18 y gp30 (17, 24–26).

2.2.3 Funciones

Las funciones de la HSA son variadas e involucran tanto al compartimento intra como extravascular.

Transporte de metabolitos. La HSA tiene la reputación de “esponja molecular”, que deriva de su habilidad de unir y transportar distintos tipos de moléculas, tanto endógenas como exógenas, de alto y bajo peso molecular. Esto se debe en parte, a que su estructura flexible le permite adaptarse a los distintos ligandos. Además presenta una gran variedad de sitios de unión distribuidos a lo largo de sus tres dominios. Esta característica de la HSA de unir y transportar tan amplia variedad de ligandos, la ha llevado a convertirse en una molécula de especial interés en investigaciones de carácter farmacológico, clínico y nutricional.

Ácidos grasos. Entre los principales ligandos endógenos de la HSA se encuentran los ácidos grasos de cadena media y larga. Estos son relativamente insolubles por lo que la HSA actúa como facilitador del transporte por el organismo, entre el plasma, las lipoproteínas y los tejidos. De esta manera, la HSA juega un rol importante en el metabolismo de lípidos. En condiciones fisiológicas, una molécula de HSA transporta ~ 0.1-2 ácidos grasos (27). Este número puede incrementarse durante el ejercicio intenso, estimulación adrenérgica y patologías como diabetes mellitus (17, 28). En su estructura la HSA posee varios sitios de unión a ácidos grasos de cadena media y larga (C10-C18) distribuidos de manera asimétrica en la proteína y con diferente afinidad (Figura 2.3). Generalmente están formados por un bolsillo hidrofóbico que interactúa con la cadena hidrocarbonada del ácido graso y un residuo básico o polar que interacciona con el carboxilato (29–31). Estos sitios (FA) se pueden clasificar de acuerdo a la afinidad por dichos ácidos grasos. Por ejemplo, los sitios FA2,

FA4 y FA5 son de alta afinidad, mientras que los sitios FA1, FA3, FA6 y FA7 son de baja afinidad. El FA1 se localiza en el subdominio IB y une distintos ligandos, entre ellos, hemo-Fe(III), bilirrubina y diversos ácidos grasos. El FA2 por otro lado, se encuentra en la interfase entre los subdominios IA y IIA. El FA3 ubicado en la interfase entre los subdominios IIB y IIIA, junto con el FA4 que se encuentra en el subdominio IIA, forman el sitio Sudlow II que une carboxilatos aromáticos de conformación extendida, como el ibuprofeno. El FA5 se encuentra en el subdominio IIIB y el FA6 se localiza en la interfase de los subdominios IIA y IIB. Finalmente el FA7 se localiza en una cavidad hidrofóbica del subdominio IIA y comprende el sitio Sudlow I, que une principalmente aniones heterocíclicos voluminosos como la warfarina (31–33).

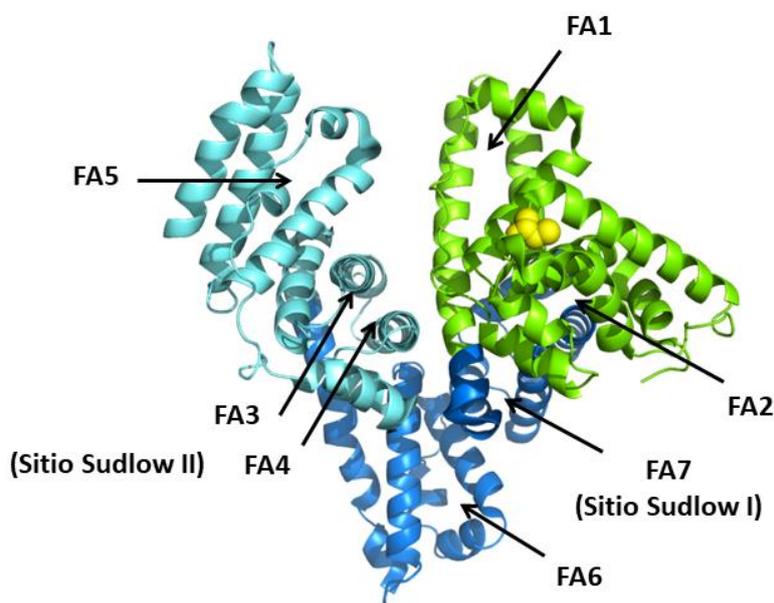


Figura 2.3. Sitios de unión a ligandos de la HSA. Se muestra la localización de los sitios de unión a ácidos grasos 1 a 7 (FA1-FA7) distribuidos en los dominios I, II y III (verde, azul y celeste, respectivamente). En amarillo se destaca la Cys34. La figura se generó utilizando PyMol (PDB ID: 4EMX).

Metales. La HSA posee varios sitios de unión a iones metálicos, siendo capaz de unir Cu(I/II), Cd(II), Hg(II), Zn(II), Au(I/II), Co(II/III), Mg(II), Ca(II), Al(II), Mn(II), Pt(II), Ni(II) y Tb(III). Los sitios más caracterizados son tres y difieren tanto en estructura como en la especificidad de iones metálicos que unen. Uno de ellos es conocido como NTS (“N-terminal site”) y está compuesto por los primeros tres residuos de la proteína, Asp1-Ala2-His3. La coordinación del metal está dada por los nitrógenos del enlace peptídico, y el nitrógeno extra de His3. Se destaca por su alta afinidad para la unión de Cu(II) y Ni(II). El tiol de la Cys34 constituye el segundo sitio y dada su localización posee accesibilidad limitada. Se ha visto que es capaz de unir Ag(I), Au(I), Hg(II) y Pt(II), iones que favorecen la coordinación lineal. Finalmente, el tercer sitio es conocido como MBS-A (“Multimetal binding site-A”) se encuentra en la interfase de los dominios I y II, y está formado por los residuos His67, His247 y Asp249. Si bien une varios metales, se destaca su alta afinidad por Cd(II) y Zn(II), siendo la HSA el principal transportador de Zn(II) del plasma (17, 33).

Otros compuestos de bajo peso molecular. Además de los ligandos ya mencionados, la HSA puede unir colesterol, ácidos biliares, bilirrubina, hemina, fosfolípidos, hormonas esteroideas (progesterona, testosterona, estradiol, estrona y aldosterona), vitaminas liposolubles (A, D, E y K), vitamina B12 y aminoácidos. Asimismo se pueden unir compuestos exógenos como fármacos, incluyendo en la lista a la warfarina, penicilina, tetraciclina, sulfamidas, digoxinas y barbituratos, entre otros. Por lo general la unión se da en los sitios Sudlow I y II, aunque también pueden reaccionar covalentemente con la Cys34. Esto dependerá del tipo de compuesto que se trate (17, 34).

Proteínas. La lista de proteínas que se asocian a la HSA ha aumentado con el paso de los años, con el desarrollo de estrategias de proteómica y el estudio de interactomas. Algunas de ellas son la hemoglobina, ceruloplasmina, transferrina y apolipoproteínas (35). Al conjunto de péptidos y proteínas que se unen a la HSA se le llama albuminoma y es un tema que continúa en estudio. Actualmente se han encontrado del orden de 170 proteínas que posiblemente se unan a la HSA directa o indirectamente. Si bien muchas de ellas ya han sido confirmadas como pertenecientes al albuminoma, aún resta confirmar buena parte de dichos posibles interactores (36).

Funciones en la circulación. Dado que constituye el 60% de las proteínas plasmáticas, la HSA es responsable del 80% de la presión coloidosmótica del plasma (~25 mmHg), por lo que ayuda en gran medida a mantener el agua en el compartimento intravascular. Además es considerada el principal anión macromolecular del plasma ya que presenta ~ 19 cargas negativas a pH fisiológico. La gran cantidad de grupos ionizables a pH neutro y su bajo punto isoeléctrico (pI, 4.7-5.8) le confiere además capacidad amortiguadora de pH en fluidos extravasculares (17).

Funciones de protección. Se ha propuesto para la HSA un rol antioxidante que deriva en parte de los compuestos que es capaz de unir. Por ejemplo, la HSA une bilirrubina, que es capaz de atrapar radicales lipoperoxilo. Además impide que esta atraviese la barrera hematoencefálica, previniendo posibles efectos neurotóxicos. En el caso de los iones metálicos, su unión a la HSA evita fenómenos como química de Fenton. El cobre por su lado, se une con gran afinidad al sitio NTS, lo cual inhibe parcialmente procesos de oxidación. El efecto neto de la HSA sobre la oxidación catalizada por metales viene dado, en parte, por la naturaleza del metal y los sitios de unión sobre la proteína. En este sentido es importante también la cantidad de metal unido, es decir, la proporción metal/HSA (13). Además de todo esto, en el plasma la HSA constituye un blanco importante de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. El principal atrapador de dichas especies es el tiol de la Cys34, dada su reactividad y su abundancia en el compartimento intravascular (13, 37). Dado que el plasma

es relativamente pobre en cuanto a defensas antioxidantes, esta función de la HSA toma relevancia. Sobre esto se profundizará en la sección 2.3.3.

2.2.4 Aplicaciones clínicas

La demanda de HSA en el mercado ha aumentado en los últimos tiempos, dado que posee diversas aplicaciones. Por un lado se utiliza en la clínica para tratar situaciones como hipovolemia, shock, quemaduras, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, cirugías y hemodiálisis. Este uso farmacológico de la HSA es un tema que hoy día continúa en debate (38–40). Por otro lado se están llevando a cabo investigaciones que proponen el uso de HSA como transportadora de drogas (41, 42), beneficiándose de su capacidad de unión de diversos ligandos, su estructura estable, tamaño y durabilidad en plasma entre otras características. En este sentido se ha visto por ejemplo, un aumento en la direccionalidad y en la vida media de las moléculas conjugadas a la HSA. Se han conjugado con éxito, compuestos orgánicos sintéticos (43), nanopartículas (44, 45) y pequeños ARN de interferencia (46).

La HSA también se utiliza en la clínica como biomarcador para la detección temprana de isquemia miocárdica. Más precisamente, lo que se utiliza como biomarcador son los niveles de “albúmina modificada por isquemia” (IMA, de su nombre en inglés “ischemia – modified albumin”). La IMA es HSA que se caracteriza por su reducida afinidad para unir Co(II) y se ve aumentada significativamente en isquemia. La base fisiológica para esa disminución de la unión de Co(II) no está clara, pero se ha propuesto que estaría relacionada a la mayor concentración de ácidos grasos que se uniría a la HSA e impediría la unión de Co(II). Los niveles de IMA se miden utilizando un test que mide la unión de Co(II) (ACB assay, de su nombre en inglés “albumin cobalt-binding” assay)(33, 47).

Además se ha utilizado la HSA producida de manera recombinante (HSA_r) por ejemplo para la expresión de proteínas de fusión, en general con el objetivo de aumentar la vida media en la circulación de la proteína de interés. Este tema se retomará más adelante (sección 2.5.2).

2.3 Tiol de la albúmina y sus derivados oxidados

2.3.1 Reactividad del tiol

Como se mencionó previamente, la HSA tiene una única cisteína reducida (Cys34), cuya reactividad está finamente controlada por su entorno proteico. Estudios cristalográficos de la HSA indican que la Cys34 se localiza en la superficie del DomI con el

átomo de azufre hacia el interior, de modo que el tiol queda en una hendidura a $\sim 9.5 \text{ \AA}$ de la superficie. Además se encuentra próximo a las cadenas laterales de tres residuos ionizables que son Asp38, His39 y Tyr84 (Figura 2.4) (18). Estos aminoácidos que conforman el entorno cercano de la Cys34, son en parte responsables de las propiedades y de la reactividad de la misma (21, 48). Esto se debe principalmente a los enlaces de hidrógeno que son capaces de establecer y que tienen consecuencias directas sobre la acidez, basicidad, nucleofilia y exposición del tiol de la HSA (HSA-SH). En particular, la Tyr84 y la His39 cumplen un papel fundamental en la regulación de la accesibilidad del tiol al medio, modulando entonces la reactividad de la Cys34 (21). Esto es consistente con reportes previos en los que se propuso a la Tyr84 como modulador de la acidez del tiol, siendo uno de los determinantes de su pK_a (48).

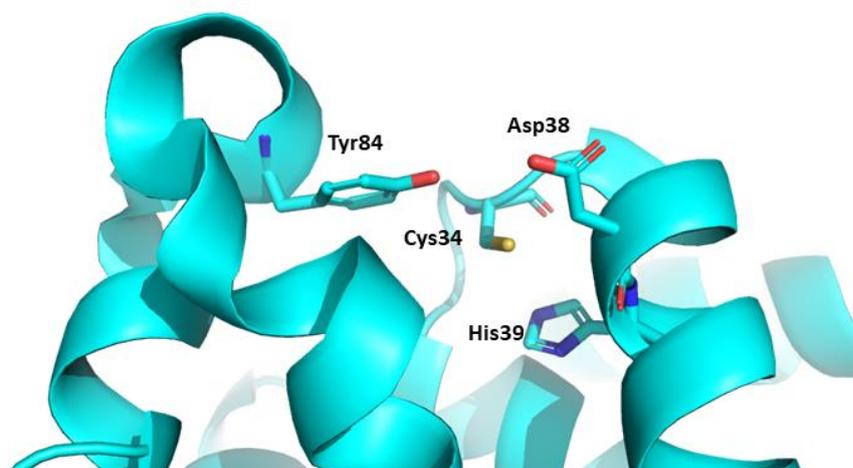


Figura 2.4. Entorno aminoacídico de la Cys34. Se destacan Asp38, His39 y Tyr84. La figura se generó utilizando PyMol (PDB ID: 4EMX).

Respecto al pK_a del tiol de la HSA hay controversia y los valores reportados van entre 5 y 8.8 (20, 21, 48–51). Estas diferencias en las determinaciones pueden atribuirse fundamentalmente a los cambios conformacionales que sufre la HSA de acuerdo al pH (17), así como a los ligandos que puedan estar unidos a la HSA y le modulan el pK_a (20). Según distintos trabajos de nuestro grupo, el pK_a para la HSA libre de ligandos es de ~ 8 (20, 21, 50), lo que implica que en plasma el $\sim 17\%$ del tiol estará en su forma tiolato. Este valor de pK_a muestra que el entorno de la Cys34 estabiliza moderadamente al tiolato, considerando que el pK_a de una cisteína en un péptido típico es de ~ 9.1 (21).

Si se compara la reactividad independiente del pH (correspondiente al 100% del tiol en forma de tiolato) del tiol de la HSA versus tioles de bajo peso molecular, se ve que estos últimos son más reactivos. Con H_2O_2 por ejemplo, la constante independiente del pH es de $\sim 5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20) para la HSA, mientras que para cisteína, cisteamina y penicilamina, tioles de bajo peso molecular de pK_a similares (7.9-8.3), ronda los $18\text{-}26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (52). Si se compara la reactividad con moléculas más grandes que el H_2O_2 como el 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)

(DTNB), la diferencia es de hasta tres órdenes de magnitud. Se ha propuesto que esto se relaciona directamente con las características estructurales de la HSA y su Cys34. Más específicamente, el posicionamiento del átomo de azufre hacia el interior de la estructura tridimensional de la proteína genera un cierto impedimento estérico. Esto sumado a la limitada exposición al solvente del tiol, dificultan el acceso a especies que puedan reaccionar con él, así como el correcto alineamiento geométrico entre ambos (13).

Como se mencionó anteriormente, la reactividad de tiol varía con la unión de ligandos. Trabajos de nuestro grupo con ácidos grasos mostraron que el tiol de la HSA lipidada es más reactivo el de la HSA deslipidada. Por ejemplo, la constante de reacción con DTNB es $15.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en ausencia de ácidos grasos (20, 53) y aumenta a $92\text{-}117 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dependiendo del ácido graso unido y de la relación ácido graso:HSA. Con H_2O_2 la constante se duplica en esa misma dirección. Además se vio que el pK_a de la HSA lipidada es 0.5 unidades menor que en ausencia de ácidos grasos. El aumento en la reactividad del tiol de la HSA en presencia de ácidos grasos puede explicarse por un lado, por el cambio conformacional generado a partir de la unión de ácidos grasos. Esto tiene como consecuencia, un aumento en la exposición al solvente del tiol y un menor impedimento estérico que permite el mejor alineamiento geométrico de las especies que van a reaccionar. Además la mayor exposición al solvente determina la disminución del pK_a y como consecuencia aumenta la disponibilidad de tiolato para reaccionar (20).

2.3.2 Ácido sulfénico, un intermediario clave

La formación de ácido sulfénico en la HSA (HSA-SOH) se da como resultado de la oxidación por dos electrones de HSA-SH. Por ejemplo, la constante de reacción del HSA-SH con H_2O_2 para dar HSA-SOH, es de $2.1 \pm 0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C), según varios reportes de nuestro grupo (20, 21, 53, 54). El HSA-SOH es un intermediario de oxidación que ha sido detectado *in vitro* utilizando distintos métodos. Las técnicas de detección incluyeron la oxidación de HSA-SH con H_2O_2 y derivatización del sulfénico con distintas moléculas como dimedona o cicloalquino para su posterior detección por espectrometría de masas (54, 55). En ambos casos se confirmó la formación de HSA-SOH en la Cys34.

También se estudió la formación de HSA-SOH mediante su reacción con el tiol amarillo tionitrobenzoato (TNB). Este absorbe a 412 nm, por lo que su consumo se traduce en una disminución de la absorbancia a dicha longitud de onda, lo que permite observar la reacción. De esta manera, se logró cuantificar el HSA-SOH formado y caracterizarlo desde el punto de vista de su estabilidad y reactividad. La determinación de las constantes cinéticas de reacción con moléculas de interés biológico y analítico permitió definir tres posibles

destinos para el HSA-SOH formado. En primer lugar, puede sobreoxidarse por dos electrones y dar ácido sulfínico (HSA-SO₂H) (Figura 2.5, vía *a*). En segundo lugar, puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular para dar disulfuros mixtos (HSA-SSR) (Figura 2.5, vía *b*). Por último, HSA-SOH puede decaer espontáneamente con una constante de primer orden de $1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) a un producto aún no caracterizado (HSA-SX) (Figura 2.5, vía *c*), probablemente una sulfenamida (HSA-SNHR). Teniendo en cuenta las constantes de reacción y las concentraciones plasmáticas, es posible concluir que las vías de reacción principales para un HSA-SOH formado *in vivo* serán la reacción con tioles de bajo peso molecular o el decaimiento espontáneo. La vida media estimada de HSA-SOH en plasma es de 4-5 min, lo que lo hace más estable que otros sulfénicos proteicos. Esto se debe en parte a que se encuentra relativamente estabilizado por su entorno proteico (13, 53).

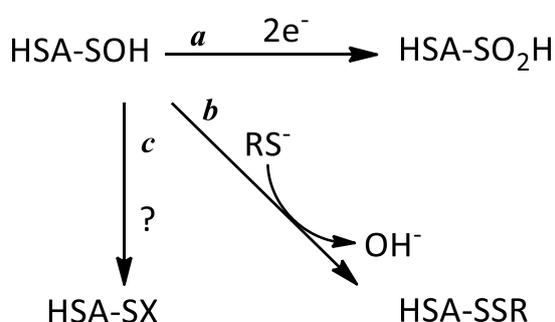


Figura 2.5. Posibles destinos para el HSA-SOH. El HSA-SOH puede sobreoxidarse para dar HSA-SO₂H (vía *a*), reaccionar con tioles de bajo peso molecular para dar HSA-SSR (vía *b*) o decaer espontáneamente a HSA-SX (vía *c*).

El efecto de la lipidación también se evaluó para HSA-SOH, observando en dichas condiciones un aumento de la reactividad de HSA-SOH con tioles de bajo peso molecular. Por ejemplo la constante con cisteína es $21.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para HSA deslipidada mientras que para HSA lipidada con ácido esteárico (HSA:AE, 1:5) es $69 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ambas determinadas a pH 7.4 y 25 °C. En cuanto a la constante de decaimiento espontáneo no se observaron variaciones (20).

Los hallazgos sobre el aumento de la reactividad de HSA-SH y HSA-SOH como consecuencia de la lipidación, cobran relevancia fisiológica si se piensa en que en el plasma, la HSA tiene ácidos grasos unidos. De hecho, en condiciones como diabetes mellitus, ejercicio intenso y estimulación adrenérgica, en las que se observa un aumento de las formas oxidadas y una disminución de la reducida, también aumenta el número de ácidos grasos unidos. Esto indica que tal vez, el aumento en el número de ácidos grasos unidos en dichas condiciones de estrés oxidativo, funciona como mecanismo de protección, aumentando la capacidad antioxidante de la HSA. Particularmente para HSA-SOH, el aumento en la reactividad con tioles de bajo peso molecular podría impactar sobre el destino final del HSA-SOH formado *in vivo*. Esto implicaría un aumento en la proporción de disulfuros mixtos formados (reversibles) en comparación con las isoformas

irreversiblemente oxidadas como HSA-SO₂H y HSA-SO₃H, lo cual potenciaría la capacidad antioxidante de la HSA (56).

2.3.3 Contexto intravascular

A diferencia del interior celular, el compartimiento plasmático se caracteriza por poseer escasas defensas antioxidantes. Si bien existen varias moléculas con dicha función, sus concentraciones son bajas y pueden encontrarse oxidadas. Entre ellas se encuentran tioles de alto y bajo peso molecular, así como otras moléculas con capacidad antioxidante. (57).

El tiol de bajo peso molecular mayoritario del plasma es la cisteína seguido de cisteinilglicina, homocisteína y glutatión. Estos pueden encontrarse principalmente en dos estados, reducidos u oxidados como disulfuros, ya sea con otros tioles de bajo peso molecular o con proteínas (13, 57). En la Tabla 2.1 se muestra para cada uno de estos tioles, la concentración total y la concentración de tiol reducido. En total, la concentración de tioles de bajo peso molecular reducidos es de 12-20 μM (13).

Tabla 2.1. Concentración de tioles de bajo peso molecular presentes en el plasma. Datos tomados de (13, 57).

Tiol	Concentración (μM)	
	Total	Reducido
Cisteína	202-281	8.3-10.7
Cisteinilglicina	18.6-35.8	2.0-2.9
Homocisteína	6.5-11.9	0.17-0.32
Glutatión	4.9-7.3	2.0-5.1

Además de tioles, el plasma presenta otros antioxidantes de bajo peso molecular, particularmente ácido ascórbico (30-150 μM), ácido úrico (160-450 μM) y bilirrubina (5-20 μM). Esta se encuentra principalmente unida a la HSA circulante. También presenta antioxidantes lipofílicos unidos a lipoproteínas como α y γ-tocoferol (15-40 μM), ubiquinol (0.4-1.0 μM), licopeno (0.5-1.0 μM) y β-caroteno (0.3-0.6 μM) (13, 57).

Aparte de HSA, el plasma presenta una amplia variedad de proteínas que están involucradas en procesos biológicos como señalización, transporte, crecimiento y defensa. El número y la identidad de la totalidad de las proteínas es un tema que hoy en día continúa en investigación y presenta creciente interés para la identificación de biomarcadores relacionados a patologías (58, 59). Algunas de las proteínas incluyen componentes del sistema inmune como inmunoglobulinas y proteínas del complemento, también factores de

coagulación, apolipoproteínas e inhibidores de proteasas, entre otras. Se estima que en total, son más de 3000 los componentes que conforman el proteoma del plasma, de los cuales la mayoría presentan concentraciones bajas mientras un pequeño grupo se considera de concentración elevada (57). Una de ellas es la HSA (527-783 μM) que se encuentra reducida en un 75% como retomaremos más adelante, y que comprende el 80% de los tioles plasmáticos (13). Dentro de los 150 polipéptidos más abundantes del proteoma se destaca además de la HSA, otra proteína con capacidad antioxidante, la glutatión peroxidasa 3 (Gpx3). Esta cataliza la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos a expensas de glutatión. La Gpx3 se encuentra, en condiciones fisiológicas, en concentraciones entre 0.5-0.8 μM . No obstante dado que el GSH es tan escaso, no está clara su eficiencia (13, 57).

Si se compara la concentración de tioles totales reducidos (de alto y bajo peso molecular) entre el espacio intra y el extracelular, se observa que la diferencia es de 100 veces; mientras que en el espacio intracelular es de ~ 50 mM, en plasma ronda los 0.4-0.6 mM. Además, dado que los tioles en plasma se encuentran más oxidados y en menor concentración, las relaciones tiol/disulfuro también disminuyen. Por lo tanto si en el interior celular dichas relaciones son altas, en plasma son sensiblemente menores. Para cisteína, cisteinilglicina y homocisteína, son menores a 0.1, mientras que para glutatión es ~ 2 y para HSA ~ 3 (13).

El eritrocito, en cambio, es muy rico en defensas antioxidantes. Además de antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico, α -tocoferol y glutatión, presenta enzimas como la CuZn superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasa, glutatión peroxidasa y el sistema peroxirredoxina/tiorredoxina/tiorredoxina reductasa. De manera diferencial pero en conjunto estos antioxidantes contribuyen al atrapamiento de especies reactivas dentro del eritrocito. La peroxirredoxina 2 (PRDX2) es la Prx más abundante (60); incluso en términos de proteínas totales, es la tercera en orden de abundancia (~ 240 μM). Las constantes de reacción de esta proteína con H_2O_2 y ONOO^- son 1.0×10^8 y 1.4×10^7 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C), respectivamente (61). Si se considera que la distancia promedio entre los eritrocitos es de ~ 3 μm , una molécula oxidante que difunda en forma típica (coeficiente de difusión del orden de 10^{-5} cm^2/s) alcanzará el eritrocito en unos pocos milisegundos. Es de esperar entonces, que aquellos oxidantes que puedan atravesar la membrana, sean consumidos por antioxidantes presentes dentro del eritrocito y no por la HSA (13). En particular se ha visto que dentro del eritrocito, en condiciones fisiológicas, la primera línea de defensa para el consumo de H_2O_2 es la Prx2, seguida por la catalasa y la Gpx (62).

Distinto es el caso cuando el ONOO^- es el oxidante, ya que en presencia de CO_2 forma rápidamente dióxido de nitrógeno (NO_2^\cdot) y radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). Esta reacción

toma relevancia dado que presenta una constante de $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) y que la concentración de CO_2 en estado fisiológico es relativamente alta ($\sim 1.3 \text{ mM}$). Estas especies radicalares, en particular $\text{CO}_3^{\cdot-}$, son altamente reactivas y poseen poca capacidad de difusión (12), por lo que la HSA del plasma constituirá un blanco importante (21, 63). Por lo tanto, cuando se trata de oxidantes cargados o muy reactivos, u oxidantes secundarios generados a nivel de macromoléculas como lípidos o proteínas, es de esperar que la HSA del plasma constituya uno de los blancos principales (13, 21). La oxidación de HSA-SH dependerá entonces de varios factores. Por un lado, dependerá de las constantes de reacción con las especies oxidantes, de la concentración de HSA-SH y de los potenciales competidores que pueda tener en el atrapamiento de dichas especies. Por otro lado, dependerá de aspectos de difusión y compartimentalización (13).

En el contexto del plasma la Cys34 de la HSA participa de intercambios tiol disulfuro con tioles de bajo peso molecular. Un reporte reciente muestra las constantes de reacción de HSA-SH con disulfuros presentes en plasma como cistina, homocistina, glutatión disulfuro y cistinilglicina. De acuerdo con este reporte, la cistina sería el disulfuro más oxidante *in vivo* lo que concuerda con el hecho de que el disulfuro mixto con HSA sea el más abundante para esta proteína en adultos sanos. En cuanto a la reacción entre HSA-SH y cistina, las constantes directa y reversa determinadas en este artículo, permiten calcular a partir del cociente, una constante de equilibrio (K_{eq}) de 0.09 (64). Por otro lado si la K_{eq} se calcula como el cociente de la concentración de especies a partir de los valores detallados en (13), se obtiene una K_{eq} de 0.07. Esto sugeriría que la HSA y el par cisteína/cistina se encuentran en equilibrio, a diferencia de lo que ocurre entre otros pares tiol/disulfuro de bajo peso molecular (13). En cuanto a los 17 disulfuros de la proteína, se ha visto que no participan de reacciones de que involucren disulfuros mixtos (64).

2.3.4 Heterogeneidad del tiol

El concepto de heterogeneidad del tiol de la HSA hace referencia al estado de oxidación de la única cisteína libre que posee esta proteína, la Cys34. Dicho residuo puede encontrarse en plasma en su forma reducida (HSA-SH), lo que se conoce como mercaptalbúmina (HMA) y que comprende un $\sim 75\%$ del total de la HSA circulante en adultos sanos. El $\sim 25\%$ restante se conoce como fracción no mercaptalbúmina (HNA) y contiene a la HSA que presenta el tiol modificado. Esta consiste principalmente en HSA que se encuentra formando disulfuros mixtos (HSA-SSR) con tioles de bajo molecular, mayoritariamente con cisteína, y en menor medida con cisteinilglicina, homocisteína y glutatión. También se encuentra en esta fracción la HSA que posee el tiol oxidado a sus formas irreversibles, HSA-SO₂H HSA-SO₃H, y comprende entre un 1-2% del total de la HSA

circulante. Otra forma en la que se puede encontrar al tiol de Cys34, aunque en concentraciones sensiblemente menores, es como S-nitrosoalbúmina (HSA-SNO). La concentración estimada es de menos de 0.2 μM y puede funcionar como reservorio de óxido nítrico. Finalmente, la reacción del tiol con aldehídos α,β -insaturados por adición de Michael da lugar a la formación de aductos carbonilados, otra forma en la que se puede encontrar a este grupo (13).

Esta heterogeneidad respecto al estado redox de la HSA plasmática también se ve en HSA comercial. En un trabajo que se describirá más adelante (sección 2.3.6) se comparó el estado de oxidación de la Cys34 de preparaciones de HSA de uso farmacéutico de tres laboratorios distintos. En el mismo se observó, para las distintas muestras, una gran variación en la fracción de HSA irreversiblemente oxidada (65).

2.3.5 Estado redox del tiol en patologías

Ciertas condiciones físicas como envejecimiento, ejercicio intenso y algunas patologías se encuentran asociadas a un aumento de especies oxidantes. Dentro de las patologías se destacan enfermedades renales, hepáticas y diabetes mellitus. Como se ha visto, el tiol de la HSA es uno de los principales blancos de especies oxidantes en el espacio intravascular, y se lo puede encontrar por lo tanto, oxidado en sus distintos estados. Dada la ausencia de estas formas oxidadas en la HSA secretada por el hepatocito, se ha planteado a lo largo del tiempo, que la HSA constituye un potencial biomarcador del estrés oxidativo. De hecho, se ha visto en dichas condiciones un aumento de las formas oxidadas de la HSA y una disminución de la forma reducida (13, 66, 67), lo que da cuenta de la capacidad antioxidante del tiol de Cys34. En la Tabla 2.2 se detallan algunas de las condiciones en las que se ha evidenciado ese desbalance de HSA reducida versus HSA oxidada (13). El abordaje utilizado para estas determinaciones ha ido variando a lo largo de los años en torno al desarrollo y la mejora de los métodos cromatográficos que se utilizan para separar las distintas isoformas, así como de la espectrometría de masa que permite identificarlas. Esto ha permitido continuar profundizando en los derivados oxidados que se pueden observar en las distintas condiciones (68–72).

Tabla 2.2. HSA oxidada en distintas condiciones.

Condición	Método	Observaciones/modificaciones	Referencias
Envejecimiento	Cromatografía ^a	Disminución en la fracción HSA-SH	(73–75)
	Medida de tioles	Disminución en la relación SH/HSA	
	Medida de tioles por HPLC	Disminución en los tioles proteicos reducidos	
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	Espectrometría de masa (LC-ESI-MS/MS para péptidos, ESI-MS para proteína entera) ^b	Detección de ácido sulfónico en HSA	(76, 77)
Disfunción renal	Cromatografía ^c	Incremento de las fracciones oxidadas, disminución de la función renal	(69, 78)
	Espectrometría de masa (ESI-TSQ) ^d	Incremento de HSA cisteinilada, disminución de HSA-SH	
Diabetes mellitus	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(79)
Desórdenes de la articulación temporomandibular	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas del líquido sinovial	(80)
Catarata senil	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas del humor acuoso	(81)
Enfermedad hepática (cirrosis, falla hepática aguda y crónica)	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(68, 82, 83)
	Espectrometría de masa (HPLC/ESI-Q-TOF) ^e	Aumento de HSA cisteinilada	
Sepsis	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(68)
Ejercicio intenso	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(84)
Restricción de crecimiento intrauterino	Espectrometría de masa (LC-ESI-TOF de proteína entera) ^f	Altos niveles de HSA materna cisteinilada	(85)
Hemodiálisis	Cromatografía ^c	Aumento en las fracciones oxidadas	(64, 86)
	Medida de tioles		
Cirugía invasiva y anestesia	Cromatografía ^a	Aumento en las fracciones oxidadas	(87)

^aCromatografía de intercambio iónico-interacción hidrofóbica. Columna Asahipak GS-520H, amortiguador de elución fosfato de sodio 0.03M, citrato de trisodio 0.3 M, pH 6.86-6.80. ^bLC, cromatografía líquida; ESI, ionización por electrospray; MS, espectrometría de masa. ^cCromatografía de intercambio iónico-interacción hidrofóbica. Columna Shodex Asahipak ES-502, fase móvil sulfato de sodio 0.4 M, acetato 0.05 M, pH 4.85 y elución con gradiente de etanol de 0 a 5-10%. ^dESI, ionización por electrospray; TSQ, triple cuadrupolo. Infusión directa. ^eHPLC, cromatografía líquida de alta performance; ESI, ionización por electrospray; Q-TOF, cuadrupolo tiempo de vuelo. ^fLC, cromatografía líquida; ESI, ionización por electrospray; TOF, tiempo de vuelo.

Si bien se aleja de nuestro enfoque en este trabajo, la oxidación de la Cys34, y la relación entre esta y la forma reducida, no son las únicas variables que se relacionan con condiciones patológicas y envejecimiento. Otras modificaciones postraduccionales de la HSA como carbamitación y glicosilación, también han sido propuestos como indicadores de condiciones patológicas que permitan evaluar la progresión de las mismas y la respuesta frente a los tratamientos aplicados. Además se ha visto que estas modificaciones comprometen funciones de la HSA tales como la unión de ligandos y la capacidad antioxidante (67).

2.3.6 Análisis del estado redox del tiol por cromatografía

Los primeros en analizar por cromatografía líquida de tipo HPLC las formas oxidadas de la HSA fueron Sogami y colaboradores. En su trabajo utilizaron una columna de intercambio aniónico y lograron separar la HSA en las fracciones HMA y HNA (88, 89). Más adelante, Era y colaboradores desarrollaron un método de HPLC de modo mixto, de cromatografía de intercambio aniónico-interacción hidrofóbica (AEIHC) de alta resolución, que les permitió además separar la HNA en una fracción que contenía a la HSA-SSR (HNA1) y otra que contenía las formas sobreoxidadas, HSA-SO₂H y HSA-SO₃H (HNA2). Según los autores, la separación se da no solo por diferencias de cargas, sino también por cambios en la conformación de la proteína, no caracterizados pero asociados al estado redox del tiol de la Cys34 (90). Estos métodos permitieron por ejemplo analizar el estado redox de la HSA en distintas patologías y en envejecimiento, con propósitos clínicos (73, 79, 87, 91) (Tabla 2.2).

Recientemente, el Dr. Horacio Botti, con la colaboración de la Dra. Lucía Turell y la Dra. Lucía Bonilla, desarrollaron otra técnica de cromatografía líquida que permite separar las formas oxidadas de la HSA en función de diferencias en sus puntos isoeléctricos (pI) y propiedades químicas. Este consiste en un cromatoenfoco con gradiente de pH externo (EPGC, de su nombre en inglés “external pH-gradient chromatofocusing”) utilizando una columna de intercambio aniónico de alta resolución (TSK-Gel DEAE-5PW) y detección por absorbancia a 280 nm (65).

Utilizando esta nueva metodología (65) se analizó HSA de uso farmacéutico previamente reducida, y se obtuvieron cuatro picos (Figura 2.6, panel A). El pico mayoritario, denominado **a**, corresponde a HSA-SH y el pico **b** corresponde a la forma HSA-SO₂⁻. Como se mencionó antes, la HSA es heterogénea respecto al estado de oxidación del tiol y posee una fracción no reducible, compuesta mayoritariamente por HSA-SO₂H. El pK_a para un RSO₂H genérico es 2.2-2.3 (92) mientras que el de la Cys34 es de ~ 8 (20, 21, 50). Esto implica que el HSA-SO₂H presente en la muestra esté desprotonado en el rango de pH

utilizado en la técnica (5.35-3.95). Esta carga negativa adicional determina una disminución en el pI de esta isoforma respecto al de HSA-SH, por lo que eluye a menor pH . Los dos picos restantes, a' y b' corresponden a HSA_{3-585} -SH y HSA_{3-585} -SO₂⁻, respectivamente. Se trata de una isoforma de la HSA trunca, que carece de los dos primeros aminoácidos de su secuencia. Estos son Asp1-Ala2 por lo que llamaremos a esta isoforma HSA_{3-585} . La misma ha sido detectada en muestras de plasma de individuos sanos y también en condiciones patológicas, en pequeñas cantidades (67). El pK_a esperado para un carboxilo de un aspartato es de ~ 4 , por lo que nuevamente en el rango de pH utilizado, la pérdida de dicho aminoácido implica que HSA_{3-585} tenga una carga negativa menos respecto a la HSA completa. Como consecuencia, el pI de HSA_{3-585} es mayor, lo que determina que eluya a mayor pH . La identidad de los picos obtenidos en el cromatograma se verificó por espectrometría de masa de proteína entera (65).

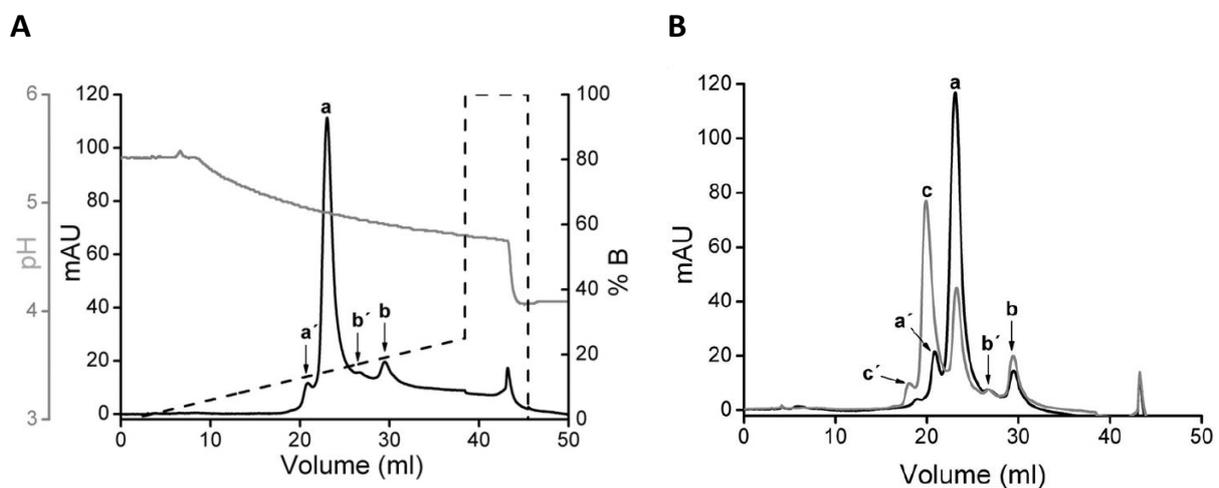


Figura 2.6. Cromatoenfoque con gradiente de pH externo de HSA de uso farmacéutico deslipidada y reducida. (A) HSA sin tratamientos adicionales, (B) HSA oxidada con H_2O_2 y tratada (trazo gris) o no (trazo negro) con $HgCl_2$. Tomado de (65).

Al tratar HSA reducida con H_2O_2 se produce la oxidación selectiva del tiol de Cys34 dando lugar a la formación de HSA-SOH. Este puede decaer a HSA-SX o reaccionar con otros tioles formando HSA-SSR. Dado que estas especies no presentan diferencias en su carga neta superficial (si R es neutro), coeluyen junto con HSA-SH y no es posible separarlas con esta metodología. Para ello se desarrolló un protocolo alternativo que incluye la incubación previa de la muestra con cloruro de mercurio ($HgCl_2$). El Hg^{2+} reacciona únicamente con HSA-S⁻, bloqueando el tiol y formando $HSA-SHg^+$, que tiene una carga positiva adicional por lo que aumenta el pI de la proteína, eluyendo a mayor pH . Esta disminución del tiempo de retención en la cromatografía permite separar el pico inicial de HSA-SH, HSA-SSR, HSA-SX y HSA-SOH, en uno correspondiente a $HSA-SHg^+$ (Figura 2.6, panel B; pico c para HSA entera y

c' para HSA₃₋₅₈₅) y otro correspondiente a HSA-SSR, HSA-SX y HSA-SOH (Figura 2.6, panel B) (65).

Cuando se analizó plasma humano fresco tratado con H₂O₂ se observó un aumento en el pico **b** y una disminución en el pico **a** respecto al plasma sin tratar, consistente con la formación de HSA-SO₂⁻ (Figura 2.7) (65).

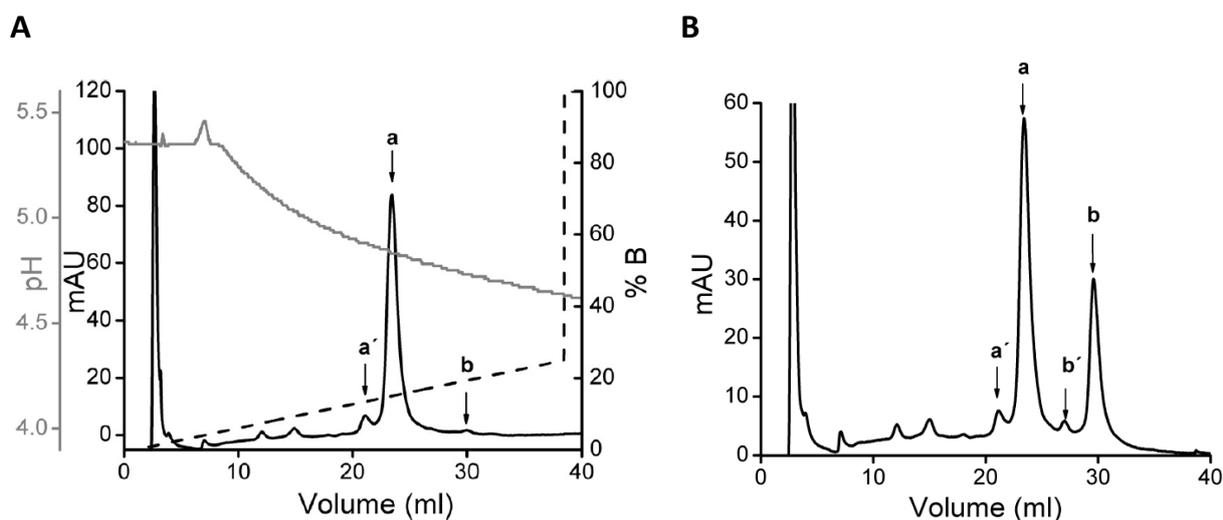


Figura 2.7. Cromatofoco con gradiente de pH externo de plasma fresco. (A) Plasma sin tratamientos adicionales, (B) plasma tratado con H₂O₂. Tomado de (65).

Originalmente esta metodología fue desarrollada en un equipo de FPLC con detector de absorbancia y fue posteriormente adaptada a un HPLC con detector de fluorescencia en el marco de la tesina de grado de Matías Deambrosi. En particular, en dicho trabajo se hizo un análisis de cómo afectaban la cantidad de muestra inyectada y la temperatura, a la resolución cromatográfica. Más precisamente se realizó el análisis por cromatofoco de 300 y 890 μ g de HSA comercial y se obtuvo una resolución (R_s , calculada entre los picos **a** y **b**) de 1.51 y 1.64, respectivamente. Esto muestra que a mayor cantidad de HSA inyectada, mayor es la resolución que se logra. La explicación a este fenómeno surge de la cantidad de interacciones electrostáticas posibles. Al aumentar la concentración de muestra se favorecen interacciones proteína-proteína que de alguna manera favorecen las interacciones proteína-matriz, generando un aumento en la capacidad de resolución que se refleja en la definición y separación de los picos. Por otro lado, para evaluar el rol de la temperatura en la resolución, se realizaron dos cromatofocos con la misma cantidad de HSA, uno a temperatura ambiente (20 °C) y uno a 37 °C. Como resultado se observó que a 37 °C se produjo una pérdida de resolución, por lo que se concluyó que la temperatura es un factor determinante en la resolución cromatográfica (93).

En suma, las ventajas del cromatoenfoco frente al método de HPLC de modo mixto desarrollado por Era y colaboradores, son varias. Por un lado se logran separar más isoformas, lo que permite determinar con mayor certeza la proporción de las mismas tanto en muestras de HSA comercial como en plasma, para así evaluar el estado redox del tiol. Además, el uso de una columna semi-preparativa permite purificar la proteína en sus diferentes estados para posteriores análisis. Por otro lado, el método de Era se basa en el uso de amortiguadores concentrados, cerca del límite de solubilidad de las sales que lo componen, y la elución se lleva a cabo con etanol. Esto dificulta el posterior análisis de las muestras por espectrometría de masa, ya que implica un tratamiento previo de las mismas. En cambio, en el cromatoenfoco se utilizan amortiguadores de bajo costo y volátiles, lo que posibilita el análisis de las muestras eluidas de la columna, por espectrometría de masa. Estos amortiguadores son de igual composición (acetato de amonio 10 mM), presentan fuerza iónica media y difieren únicamente en su pH (5.35 para el de unión y 3.95 para el de elución). Otra diferencia entre el método de HPLC de modo mixto y el cromatoenfoco es que el primero requiere trabajar a temperaturas superiores a la ambiente (35 °C), mientras que el segundo no, lo que facilita la realización del experimento. Finalmente, el uso de fluorescencia en la detección permite aumentar la sensibilidad del método. Esto es importante para detectar aquellas isoformas que son poco abundantes.

2.4 Expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

El uso de la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas heterólogas ha aumentado con el paso del tiempo debido a ciertas ventajas que presenta frente a otros sistemas. Por ejemplo, al ser un organismo eucariota, posee la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de eucariotas superiores. Algunas de ellas involucran la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, adición de lípidos y procesamiento proteolítico. En este sentido, el correcto procesamiento de secuencias señal le permite expresar la proteína de interés intra o extracelularmente. Dichas secuencias consisten en péptidos que indican la secreción al exterior celular de la proteína que lo posea. También se conocen con el nombre de prepéptidos. Dado que los niveles de proteínas endógenas secretadas por *P. pastoris* son bajos, la secreción de la proteína heteróloga al medio de cultivo sirve como primer paso de purificación. Además, *P. pastoris* puede crecer de manera aeróbica o anaeróbica alcanzando altas densidades y concentración de proteína, en medios de cultivos de bajo costo (94, 95). Una ventaja que presenta frente a otros sistemas eucariotas, es la facilidad de manipulación en cuanto a las herramientas de biología molecular necesarias así como la existencia de un genoma completamente secuenciado para varias cepas (96–98). Asimismo, la posibilidad de integrar

el vector de expresión al genoma de la levadura le da cierta estabilidad genética, a diferencia de lo que ocurre en bacterias (94, 95).

2.4.1 Vía de utilización del metanol y promotores AOX

P. pastoris es una levadura metilotrófica por lo que puede crecer en metanol como única fuente de carbono (Figura 2.8). El primer paso en la vía de utilización del metanol tiene lugar en el peroxisoma celular y es catalizado por la alcohol oxidasa (AOX). Esta enzima dependiente de FAD, oxida el metanol a formaldehído y H_2O_2 , utilizando al oxígeno como aceptor terminal de electrones. El H_2O_2 resultante es transformado en agua y oxígeno por acción de la catalasa, también en el peroxisoma. El formaldehído formado puede entrar en una vía catabólica o en una anabólica. En el primer caso, el formaldehído pasa al citosol y es oxidado a formiato y dióxido de carbono por la formaldehído deshidrogenasa (FLD) y la formiato deshidrogenasa (FDH). En estas deshidrogenaciones se genera poder reductor en forma de NADH que servirá como fuente de energía para las células en crecimiento. El formaldehído restante ingresa en la vía anabólica, y es condensado con xilulosa 5-fosfato por la enzima peroxisomal dihidroxiacetona sintasa (DAS) para dar dihidroxiacetona y gliceraldehído 3-fosfato, que se utilizarán para dar lugar a componentes celulares (94, 95).

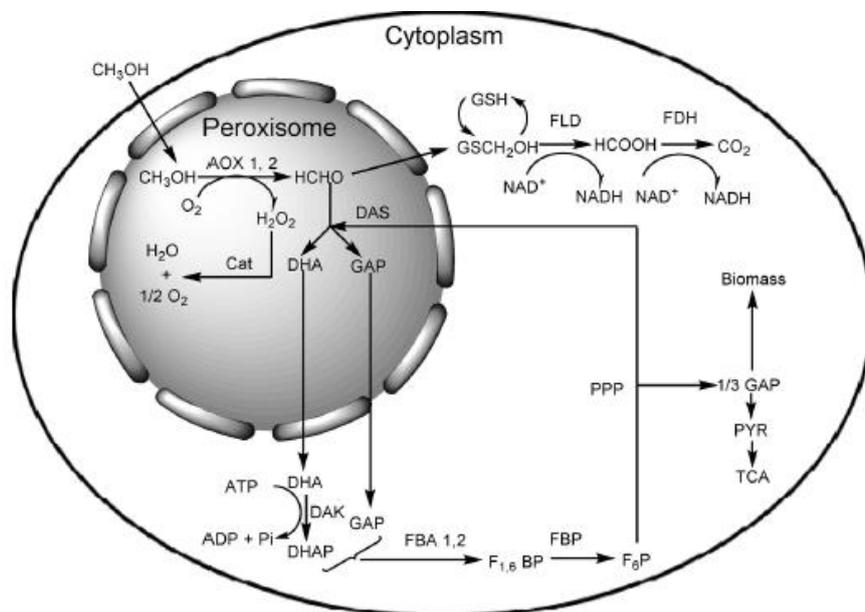


Figura 2.8. Vía de utilización del metanol de *P. pastoris*. Se destacan las reacciones catalizadas por las enzimas AOX: alcohol oxidasa, FLD: formaldehído deshidrogenasa, FDH: formiato deshidrogenasa, DAS: dihidroxiacetona sintasa. Tomada de (95).

Hay dos genes que codifican para la AOX en *P. pastoris*, *AOX1* y *AOX2*, siendo el primero el responsable de la mayor parte de la producción de la enzima. La expresión a

partir de *AOX1* está fuertemente regulada a nivel de la transcripción y es inducida en presencia de metanol. *AOX2* por otro lado, es controlado por un promotor más débil, contribuyendo al 15% del total de la actividad AOX en la célula (94, 95). Los niveles de AOX producidos a expensas del gen *AOX1* pueden alcanzar hasta el 30% del total de las proteínas solubles en levaduras crecidas en metanol como única fuente de carbono (99, 100), lo que muestra la fuerza del promotor. Además, la inducción de la expresión no solo es lograda en presencia de metanol sino que es reprimida en presencia de otras fuentes de carbono, como glicerol, etanol y glucosa. En células crecidas en metanol, el ~ 5% del ARN corresponde al *AOX1*, mientras que en presencia de otras fuentes de carbono es indetectable. Esto, sumado a las demás ventajas de esta levadura, hacen que sea propicia para la expresión de proteínas heterólogas bajo el control del promotor *AOX1*, permitiendo lograr crecimiento celular previo a la inducción de la expresión de la proteína de interés (94, 95).

2.4.2 Promotores alternativos

Existen además promotores alternativos al *AOX1*. Por ejemplo, el del gen *GAP* que codifica para la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Se trata de un promotor constitutivo que se expresa de manera continua en fuentes de carbono como glucosa, glicerol, etanol y ácido oleico. Esto implica que se pueda llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante sin utilizar metanol. Otro promotor utilizado es el de la formaldehído deshidrogenasa (promotor *FLD1*). Esta enzima participa en el metabolismo del metanol y de ciertas metilaminas, por lo que puede inducirse con ambos compuestos. Tanto el promotor *GAP* como el *FLD1* son promotores fuertes y pueden alcanzar niveles de proteína recombinante similares a los obtenidos bajo el promotor *AOX1* (94, 95). Actualmente se continúa en la búsqueda de nuevos promotores que sean atractivos para la expresión de proteínas heterólogas así como las condiciones más adecuadas para llevarlo a cabo (95).

2.4.3 Vectores de expresión

Los vectores en general son bifuncionales ya que sirven para transformar tanto *E. coli* como *P. pastoris*. Esto permite hacer la propagación del vector en la bacteria para luego expresar la proteína de interés en la levadura. Cada vector se conforma por un promotor (comúnmente *AOX1*) al que le sigue el sitio de clonado del gen foráneo y luego una secuencia de terminación de la transcripción. Esta puede ser por ejemplo derivada de *AOX1*, y asegurará el correcto procesamiento del extremo 3' del mensajero y su poliadenilación. En caso que se desee expresar la proteína y dirigirla al exterior celular para purificarla directamente del medio de cultivo, hay vectores que poseen secuencias señal para la

exportación al inicio del sitio de clonado. Esto es reconocido por la levadura y escindido al momento de la secreción. Algunas de las secuencias señal utilizadas con este objetivo son la del factor- α y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*, la de la α -amilasa de *Aspergillus niger*, la de la ácido fosfatasa de *P. pastoris* y la de la HSA, entre otras. Asimismo existen marcadores de selección que permiten identificar a los transformantes. Hay marcadores auxotróficos que complementan genes ausentes en las cepas de expresión, como *His4* que codifica para una enzima fundamental para la biosíntesis de histidina. Otros vectores contienen genes que confieren resistencia a antibióticos, como zeocina, blasticidina y kanamicina (95, 101, 102). También es posible expresar la proteína con cola de histidinas y otras etiquetas que faciliten su purificación.

Uno de los vectores más utilizados es el pPICZ. Dentro de este existen distintos tipos, dependiendo de la combinación de enzimas de restricción que tenga, y de si tiene o no una señal de secreción para la proteína a expresar. Como se ve en la Figura 2.9, los pPICZ poseen el promotor *AOX1* (5' *AOX1*), el sitio de policlonado y la secuencia de terminación del *AOX1* (*AOX1 TT*). A continuación tienen dos promotores que dirigen la expresión del gen de resistencia a zeocina, uno para la levadura (*TEF1*) y otro para *E. coli* (*PEM7*), seguido de una secuencia de terminación para dicho gen (*cyc1 TT*). Finalmente tiene un sitio que permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en *E. coli* (pUC ori) y sitios de restricción para las enzimas *Sac I*, *Pme I* y *BstX1*, para linealizar el plásmido e integrarlo al genoma de *P. pastoris*. En el presente trabajo se utilizó la variante pPICZA de estos vectores (103).

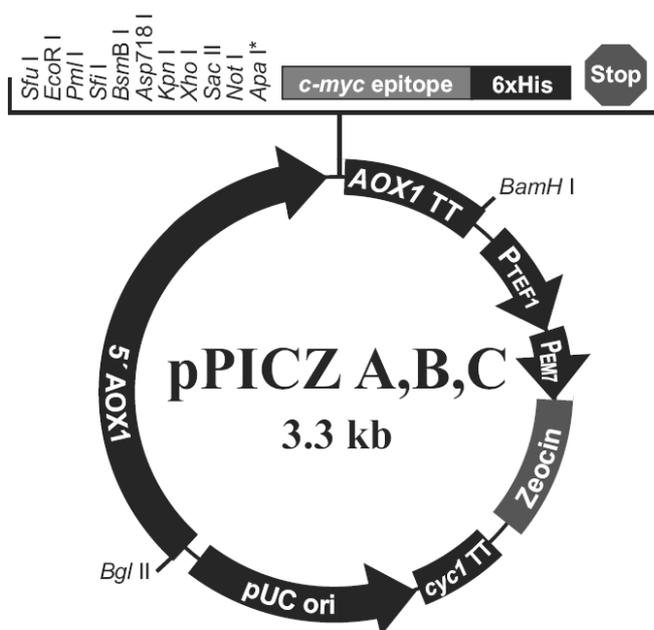


Figura 2.9. Vectores pPICZ. Se destacan en el mapa, en orden, el promotor 5' *AOX1*, el sitio de policlonado, la señal de terminación de la transcripción *AOX1*, los promotores *TEF1* y *EM7*, el gen de la resistencia a zeocina, la señal de terminación de la transcripción *cyc1 TT* y el origen pUC. Tomado de (103).

2.4.4 Cepas

La biología molecular y la ingeniería genética han facilitado la creación de distintas cepas de expresión. Mutaciones en genes auxotróficos dieron lugar a cepas que no pueden sintetizar ciertos aminoácidos como arginina e histidina. Como consecuencia estas levaduras crecen en medios complejos o en medios mínimos suplementados con dichos aminoácidos. La falta se compensa si se transforman las células con un plásmido que contenga el gen funcional, lo que permite identificar a los transformantes. Ejemplos de estas cepas son GS115 y GS200.

También se han generado mutantes en los genes *AOX* dando lugar a levaduras con distintas velocidades de metabolización de metanol, y por lo tanto, de crecimiento en este. La cepa GS115 posee ambos genes funcionales por lo que la metabolización es rápida (fenotipo Mut⁺), mientras que para KM71 que no posee el *AOX1*, la metabolización recae sobre el *AOX2* y crece más lento (fenotipo Mut^S). Otra variante es MC100-3, a la que le faltan los dos genes *AOX* y es por lo tanto, incapaz de crecer en metanol (fenotipo Mut⁻).

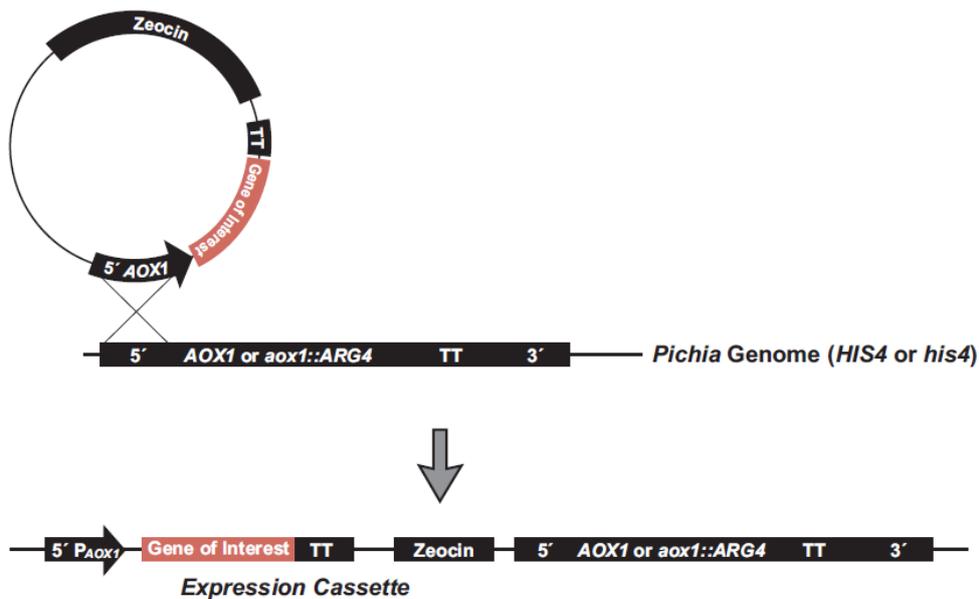
Un problema recurrente en la expresión de proteínas recombinantes de secreción es la degradación de las mismas por proteasas dentro o fuera de la célula. En el interior celular, la degradación ocurre durante el transporte vesicular de la proteína heteróloga por la vía secretora. Fuera de la célula, la degradación es llevada a cabo por proteasas liberadas al medio de cultivo por secreción o por lisis celular. Buscando resolver este problema se desarrollaron cepas deficientes en proteasas por delección de los genes que codifican para las mismas. Algunas de estas cepas son la SMD1165 y SMD1168. Una de las proteasas más conocida, la proteinasa A, es una aspartil proteasa presente en las vacuolas que además de activarse a sí misma, activa a otras proteasas tales como la carboxipeptidasa Y y la proteinasa B. Por lo general, son varias las proteasas involucradas en los eventos de degradación, por lo que es difícil solucionar el problema eliminando una sola (95, 102).

2.4.5 Integración, transformación y selección

Si bien existen algunos reportes sobre vectores episomales (104, 105) y es un tema que continúa en estudio (106, 107), el hecho de que sea posible integrar el ADN de interés al genoma de la levadura le da cierta estabilidad a la transformación y hacen de este sistema, uno más atractivo. La integración se da por recombinación homóloga por lo que es necesario que haya secuencias compartidas entre el vector y el genoma de la levadura. En general los vectores para *P. pastoris* tienen por lo menos un fragmento de ADN (por ejemplo en el promotor o en el gen marcador) con sitios de corte para enzimas de restricción que permiten la escisión y consecuente linealización del vector. Una vez

linealizado, se transforman las levaduras y los extremos libres del ADN foráneo estimulan la recombinación en un único evento, dirigiendo su integración al genoma (Figura 2.10, panel A). La inserción de múltiples copias también ocurre (Figura 2.10, panel B) y puede determinar una mayor expresión de la proteína heteróloga respecto a una célula que haya incorporado una copia sola. Estos eventos suelen ser más abundantes cuando la transformación se da por electroporación (94, 101).

A



B

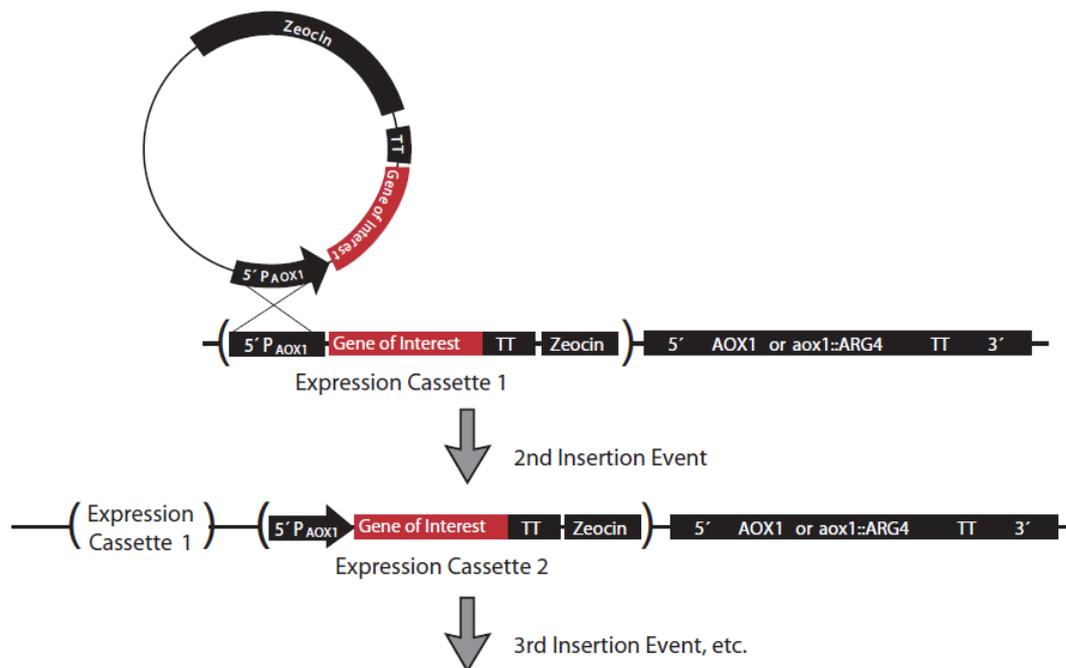


Figura 2.10. Inserción del cassette de expresión al genoma de *P. pastoris*. Inserción de (A) una copia y (B) múltiples copias. Ejemplificado para el promotor AOX1. Tomado de (103).

2.5 Albúmina recombinante

2.5.1 Sistemas de expresión de albúmina recombinante

Hoy día la mayor parte de la HSA comercial es obtenida a partir del fraccionamiento de plasma humano y se encuentra por lo tanto, sujeto a las donaciones de sangre. La posible presencia de patógenos sanguíneos en las preparaciones de HSA y por ende, la transmisión de los mismos, ha impulsado al desarrollo de técnicas para la obtención de HSA recombinante (HSAr) (108, 109). Esta, además de estar libre de patógenos, es menos heterogénea en cuanto a las modificaciones postraduccionales que puede presentar y se puede producir a gran escala. El costo económico de la producción dependerá del sistema de expresión utilizado.

El hecho de que sea una proteína no glicosilada ha permitido ensayar la expresión de HSAr en una amplia variedad de sistemas tanto eucariotas como procariotas. Inicialmente se ensayó la expresión de HSAr en procariotas. En particular, *E. coli* fue el primero en utilizarse (110), dada la facilidad de cultivo, la rápida velocidad de crecimiento, el bajo costo económico, y la simplicidad de la generación de células que expresen la proteína de interés por herramientas básicas de biología molecular. Al ser la HSA una proteína cuya estructura secundaria y terciaria dependen de la correcta formación de sus 17 puentes disulfuro, el principal inconveniente que se presentó fue que la expresión llevaba a la formación de cuerpos de inclusión. Aproximadamente el 90% del total de la HSAr se encontraba en la fracción insoluble, probablemente por problemas de agregación y mal plegamiento (110, 111). Actualmente se ha logrado obtener un 60% de la HSAr en forma soluble. Esto se debe a la optimización de las condiciones de crecimiento e inducción y al desarrollo de cepas con citoplasma más propicio para la formación de disulfuros o que coexpresan chaperonas (112), entre otras estrategias.

En lo que respecta a eucariotas, se ha expresado HSAr en plantas, animales transgénicos y levaduras. En plantas, se ha logrado la expresión en semillas de arroz, donde se han alcanzado rendimientos de hasta 2.75 g HSAr/kg de semilla de arroz. La proteína recombinante producida es equivalente a la obtenida del plasma en cuanto a sus características bioquímicas, estructurales y de inmunogenicidad (113). Otra planta que se ha utilizado es el tabaco, aunque los niveles de HSAr conseguidos son menores (114). En animales por ejemplo, se ha producido HSAr en las glándulas mamarias de ratones (115) y vacas (116), donde se purifica directamente de la leche. Una desventaja de estos sistemas es el costo económico que implica la generación de las líneas de animales sobreexpresantes. También se han utilizado gusanos de seda transgénicos, en los que la HSA es secretada

desde las glándulas sedosas hacia el capullo, del cual se purifica (117). En cuanto a las levaduras, se destacan *S. cerevisiae* (118, 119) y *P. pastoris* (120–124), en las que la estrategia adoptada fue la secreción de la proteína de interés para evitar la agregación y la formación de cuerpos de inclusión. Especialmente *P. pastoris* muestra un gran atractivo para la producción a nivel industrial, obteniéndose rendimientos altos, con bajo costo (120, 121).

2.5.2 Propiedades, usos y aplicaciones de la albúmina producida en *P. pastoris*

La HSAr producida en *P. pastoris* ha sido estudiada mediante distintas técnicas, como dicroísmo circular, difracción de rayos X y calorimetría, entre otros. Los resultados indican que es similar a la HSA purificada de plasma. Por ejemplo, se ha visto que comparten características como la viscosidad y la antigenicidad (125). Además, estudios realizados con algunos ligandos conocidos de la HSA, muestran que los sitios de unión se forman correctamente y son capaces de unir dichos ligandos de la misma manera. Asimismo se ha constatado por datos estructurales, que ambas proteínas comparten la estructura secundaria y terciaria (126), así como la secuencia de enlaces disulfuro (127). Esto conduce a que tengan además estabilidad química y térmica similares (126).

Los usos clínicos de la HSAr son diversos. Por un lado, se la ha utilizado exitosamente en pacientes con síndrome nefrótico, shock hemorrágico, cirrosis hepática y cirugía cardíaca (128–130). Por otro lado, se la ha utilizado como proteína de fusión para, por ejemplo, extender la vida media en la circulación de ciertas proteínas y péptidos. Este es el caso de la hormona de crecimiento (GH), una proteína de 191 aminoácidos que estimula la producción y liberación del factor de crecimiento IGF-1 a la circulación sistémica, que a su vez promueve el crecimiento en niños. El aumento de la vida media de la GH se logró con la producción de una proteína de fusión HSA-GH (131). Otros ejemplos son la interleuquina-2 (132) y el “glucagon-like peptide-1” (133).

El contar con HSAr también permite trabajar con preparaciones más homogéneas en cuanto al estado de la Cys34 que la aislada del plasma de donantes. Además permite la generación de mutantes en residuos de interés para estudiar por ejemplo aspectos de la reactividad de la proteína y su tiol. En este sentido, existen reportes acerca de la expresión en *P. pastoris* de los tres dominios de la HSA por separado. En estos, se estudió la capacidad de unión de ligandos a los distintos dominios y se profundizó también en aspectos estructurales de cada uno de ellos, por ejemplo, por dicroísmo circular (124, 134). Algunos de estos aspectos se retomarán más adelante.

2.5.3 Experiencia previa de nuestro grupo con albúmina recombinante

En el marco de la Tesis de Doctorado en Química de Lucía Turell (56) y de la Tesina de la Licenciatura en Bioquímica de Rodrigo Lombide (135), se comenzó con la expresión de HSAr en *P. pastoris* con el objetivo de contar con un sistema que permitiera generar mutantes en residuos clave para la reactividad del tiol. Por otro lado, con el objetivo de estudiar la estructura de las isoformas oxidadas, para las cuales no hay datos estructurales, se propuso expresar únicamente el DomI, en el que se encuentra la Cys34. El menor tamaño de DomI respecto a la HSA facilitaría la obtención de cristales para su análisis por cristalografía de rayos X o RMN de proteínas.

La secuencia codificante se obtuvo por retrotranscripción de una extracción de ARN total de un cultivo de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) utilizando cebadores específicos. La secuenciación del ADN amplificado mostró la presencia de dos mutaciones sinónimas y dado que estas no implicaban cambios en la secuencia de aminoácidos (ver anexo), se decidió continuar. Se clonó la secuencia en el vector de expresión pPICZA con la señal de secreción nativa de la HSA (pre péptido) pero eliminando el propéptido, y se transformó la cepa GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris*. La proteína se expresó como proteína de secreción satisfactoriamente, encontrándose en el medio de cultivo (Figura 2.11).

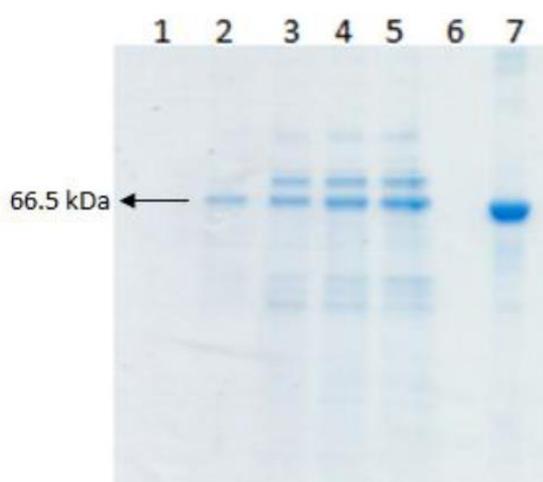


Figura 2.11. Expresión de HSAr en *P. pastoris*. SDS-PAGE de los sobrenadantes del medio de cultivo a tiempos crecientes. **Carriles 1-5:** sobrenadantes del medio de cultivo a $t = 0, 24, 48, 72$ y 96 h de inducción; **carril 6:** vacío; **carril 7:** HSA control. Adaptado de (135).

A continuación en el marco de una beca de iniciación a la investigación ANII otorgada a Rodrigo Lombide, se comenzó a trabajar en la expresión del DomI. Para ello, a partir del vector pPICZA que contenía a la secuencia de la HSA clonada con las mutaciones sinónimas, se amplificó la secuencia codificante para el DomI por PCR utilizando cebadores específicos. La expresión se llevó a cabo de manera análoga a la de la HSAr recién mencionada. El DomI se expresó correctamente hacia el medio de cultivo. Los crioinóculos preparados a partir de los clones obtenidos en esta parte del trabajo fueron el punto de partida para la expresión del DomI en la presente tesis.

3 OBJETIVOS

En el presente trabajo se propuso, como objetivo general, profundizar en la caracterización de los derivados oxidados de la albúmina sérica humana. Los dos objetivos específicos planteados fueron:

1. Poner a punto la técnica de cromatoenfoco para posteriormente evaluar el estado redox de la albúmina en muestras de sangre.
2. Producir y purificar el Dominio I (DomI) de la HSA utilizando *Pichia pastoris* como sistema de expresión con el fin de realizar estudios estructurales.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Equipamiento

El cromatofoco se realizó en un HPLC Agilent Infinity 1260 con detector de fluorescencia y las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetros Varian Cary 50 y 60 UV-visible. Para las medidas en placa se utilizó un lector de placas Varioskan Flash Thermo. El análisis por espectrometría de masa se realizó en un equipo MALDI TOF/TOF 4800 AB-Sciex. Las cromatografías de intercambio catiónico y de afinidad se realizaron en un FPLC AKTA - prime plus GE Healthcare, y la transformación de las levaduras se realizó en un electroporador Gene Pulser XCell de Biorad.

4.2 Análisis de muestras de plasma por cromatofoco

4.2.1 Materiales y soluciones

Para el cromatofoco se utilizó una columna de intercambio aniónico débil de alta resolución, TSK DEAE 5PW (glass 7.5 cm x 8 mm I.D., 10 μm) de Tosoh Biosciences LLC.

Para reducir la HSA utilizada como estándar se preparó una solución de 2-mercaptoetanol 0.8 M en agua. Para cuantificar los tioles se preparó una solución madre de DTNB 20 mM en etanol, a partir de la cual se preparó una solución 200 μM en amortiguador pirofosfato de sodio 0.1 M, pH 9.0. Los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Applichem a no ser que se indique lo contrario y los solventes eran de calidad HPLC.

Amortiguadores del cromatofoco. Se utilizaron dos amortiguadores de igual composición y distinto pH. El amortiguador A, acetato de amonio 10 mM pH 5.35, es el utilizado para el equilibrado de la columna e inyección de la muestra. El amortiguador B, acetato de amonio 10 mM pH 3.95, es el utilizado para la elución. Ambos se prepararon a partir de acetato de amonio en agua milli-Q y se ajustó el pH con ácido acético glacial. Previo a su uso se filtraron por membrana de 0.45 μm y se degasaron en un sistema de vacío cerrado con agitador magnético por 10 min.

Soluciones de HSA. Con el objetivo de eliminar ácidos grasos y otros posibles componentes hidrofóbicos, se realizó la deslipidación de la HSA mediante el método del carbón activado (136, 137). La concentración de proteína se determinó por absorbancia a 279 nm ($\epsilon = 0.531 (\text{g/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$, PM = 66438 Da) (17). En preparaciones comerciales el tiol de la HSA se encuentra oxidado, por lo que es necesario reducirlo para evaluar su reactividad. Para eso, se incubó HSA con 2-mercaptoetanol 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente, en

agitación, y se eliminó el exceso de reductor por gel filtración. La concentración de tioles se midió utilizando DTNB (137, 138) 200 μ M en amortiguador pirofosfato de sodio 0.1 M pH 9.0. La relación HSA-SH/HSA obtenida fue de 0.60-0.67.

Muestras de plasma. Previa tramitación con el comité de ética y con el consentimiento de dos donantes sanos, se colectó sangre fresca (5 mL) en un tubo heparinizado. La muestra se centrifugó a 1000 g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante (plasma) se separó de los glóbulos rojos y se centrifugó nuevamente, en las mismas condiciones. Luego se filtró el sobrenadante utilizando una membrana 0.22 μ m y se guardó a -80 °C hasta su análisis.

4.2.2 Métodos

Cuantificación de HSA en plasma. Se utilizó el colorante púrpura de bromocresol (BCP), cuya absorbancia a 603 nm aumenta cuando está unido a la albúmina (137, 139). Para la determinación se preparó una solución de BCP 40 μ M en amortiguador acetato de amonio 0.1 M pH 5.2. Se realizó una curva de calibración con HSA comercial deslipidada de 0-3 μ M y se midió absorbancia a 603 nm.

Evaluación de la estabilidad de la HSA en las condiciones del cromatofoco. Para evaluar si la HSA presente en el plasma precipita en las condiciones de trabajo del cromatofoco, se tomó una muestra de plasma, se diluyó 1/10 en amortiguador A o no, y se filtró en una membrana de 0.22 μ m. A eso se le determinó la concentración de HSA con el método BCP.

Análisis por cromatofoco de isoformas redox de la HSA. Se utilizó un método previamente reportado (65) adaptado a un equipo de HPLC con columna de intercambio aniónico de alta resolución (TSK DEAE), y detección por fluorescencia (93). Brevemente se equilibró la columna con amortiguador de inicio (A, acetato de amonio 10 mM, pH 5.35), se inyectó la muestra y se inició la elución con un gradiente de 0-40 % de amortiguador de elución (B, acetato de amonio 10 mM pH 3.95) en 60 min. Luego de los 60 min se realizó un salto a 100 % de B para eliminar otras moléculas que hubiesen quedado unidas a la resina. Todas las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente y a un flujo de 1 mL/min.

Puesta a punto de la cantidad de HSA a utilizar en el cromatofoco. Con el fin de obtener una buena separación de los picos se puso a punto la cantidad de HSA a inyectar. Para ello se diluyó plasma fresco 1/10 en amortiguador A y se evaluó el cromatofoco al inyectar 20, 100 y 150 μ L de dicha dilución. Tomando como valor de referencia una

concentración de HSA en plasma de 43 g/L, los volúmenes ensayados corresponden a 86, 430 y 645 µg de HSA. En todos los casos la muestra fue centrifugada antes de ser inyectada a la columna para asegurar la ausencia de partículas que pudiesen dañar la columna y el equipo.

4.3 Expresión, purificación y caracterización del DomI

4.3.1 Materiales y soluciones

La purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el kit comercial “PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit”. La cepa GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris* y el vector pPICZA forman parte del “EasySelect Pichia Expression Kit”. Ambos kits son de Invitrogen. Para el ensayo del ácido bicinconínico se utilizó el “Bicinchoninic acid Kit for Protein Determination”, adquirido en Sigma-Aldrich. La resina DEAE Sepharose, las columnas HiPrep CM FF 16/10 y HiTrap Blue HP, las microcolumnas de gel filtración PD SpinTrap G-25 y los dispositivos de ultra filtración, son de GE Healthcare.

Los marcadores de peso molecular utilizados en los geles de poliacrilamida fueron el “Sea Blue Plus 2” de Thermo Fisher y el “LMW calibration kit for SDS electrophoresis” de Amersham. Para el gel de agarosa se utilizó “1 kb plus DNA ladder” también de Thermo Fisher.

Para la determinación de tioles se preparó DTNB 20 mM en etanol. A partir de esta solución se prepararon diluciones 0.2, 0.4 o 10 mM en amortiguador fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4, DTPA 0.1 mM, dependiendo de los requerimientos del experimento.

Para la alquilación reductiva y tripsinización se utilizaron las siguientes soluciones madre: cloruro de guanidinio 8 M en amortiguador Tris 0.2 M pH 7.8, ditiotreitolo (DTT) 0.25 M y ácido iodoacético 1 M ambos preparados en agua destilada, 2-mercaptoetanol 14.3 M, bicarbonato de amonio 0.1 M y tripsina de páncreas bovino “Proteomics Grade, Sigma” resuspendida en HCl 1M para una concentración de 1 µg/µL.

En el caso del marcado diferencial y tripsinización se utilizaron las siguientes soluciones madre: 2-mercaptoetanol 0.5 M, iodoacetamida (IAM) 0.3 M, DTT 10 mM y ácido iodoacético 50 mM, todos ellos preparados en agua destilada; bicarbonato de amonio 0.1 M y tripsina de páncreas bovino “Sequencing grade, modified, Promega” resuspendida en HCl 1M para una concentración de 0.4 µg/µL.

Excepto que se especifique lo contrario, el resto de los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o Applichem.

4.3.2 Medios de cultivo

YPD agar: extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, agar 2%, zeocina 100 µg/mL.

YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%.

BMGY: extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, base de nitrógeno de levadura 1.34%, biotina 4.5×10^{-5} %, glicerol 1%.

BMMY: extracto de levadura 1%, peptona 2%, fosfato de potasio 100 mM pH 6.0, base de nitrógeno de levadura 1.34%, biotina 4.5×10^{-5} %, metanol 0.5%.

YPDS agar: extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, 1 M sorbitol, 2 % agar.

LB low salt agar: triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, agar 15 g/L, pH 7.5.

4.3.3 Métodos

Se partió de dos crioinóculos distintos, ambos de células de la cepa GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris* transformadas para la expresión de DomI. Uno de ellos fue generado por Lucía Turell y Rodrigo Lombide en años anteriores, a partir de la secuencia codificante para la HSA obtenida de células HepG2. El otro, fue generado en el marco de este trabajo, como se detalla a continuación.

La diferencia entre ambas construcciones reside en que la obtenida de células HepG2 posee dos mutaciones sinónimas en la secuencia codificante respecto a la secuencia de referencia. Por ello, para diferenciarlas les llamaremos DomI_{MS} al que posee mutaciones sinónimas, y DomI_{SR} al que se sintetizó GenScript en base a la secuencia de referencia. Para hacer referencia a aspectos generales de la proteína o a experimentos que se realizaron con las dos variantes, le llamaremos simplemente DomI.

Transformación de *P. pastoris* para la expresión de DomI_{SR}. El ADN copia que codifica para el DomI_{SR} fue sintetizado y clonado en el vector pPICZA por la compañía Gen Script utilizando la secuencia de referencia (ver anexo). La misma incluye la señal de secreción nativa de la HSA (pre péptido) y no fue optimizada para *P. pastoris*. El vector se propagó mediante transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* de la cepa XL1 siguiendo protocolos estándar. Las células transformadas se seleccionaron en medio LB low salt con zeocina 25 µg/mL y se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit detallado en la sección 4.3.1. Los 18 µg de ADN obtenidos se linealizaron incubándolos con 105 U de la enzima PmeI a 37 °C, toda la noche. La digestión se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para purificar el ADN lineal, se agregó a la mezcla de digestión acetato de sodio 0.08 M y etanol 70%, y se centrifugó a 12000 g por 30 min a 4 °C. De esta manera, el ADN lineal precipita por lo que se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 80%. Finalmente se resuspendió el ADN en 10 µL de agua de calidad biología molecular (140). La

concentración del mismo se determinó mediante absorbancia a 260 nm, obteniéndose 8.6 µg de ADN que se utilizaron para electroporar células GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris*.

Previo a la electroporación de las levaduras fue necesario preparar las células. Para ello, se partió de células comerciales de la cepa GS115 His⁻ Mut⁺ sin transformar, que se plaquearon en YPD agar sin zeocina y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Se utilizó una colonia aislada para inocular un YPD que se incubó toda la noche a 28 °C. Este luego se utilizó para hacer un escalado 1/5000 del cultivo, que se incubó en las mismas condiciones. Una vez alcanzada una turbidez, determinada por la medida de absorbancia a 600 nm, de 1.3-1.5 se procedió a concentrar a las células, reduciendo el volumen mediante sucesivas rondas de centrifugación y resuspensión de las mismas. Para ello, en primer lugar se centrifugaron los 500 mL de cultivo y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 mL de agua fría y se centrifugaron nuevamente, resuspendiendo esta vez en 250 mL. A esto le siguieron dos rondas de centrifugación, en las que las células se resuspendieron primero en 20 y luego en 1 mL de una solución fría de sorbitol 1 M. Todas las centrifugaciones fueron realizadas a 1500 g por 5 min a 4 °C. Las células se mantuvieron en frío hasta electroporar.

La electroporación se llevó a cabo mezclando 80 µL de células con 10 µL de ADN, utilizando un programa preestablecido en el equipo. Inmediatamente luego de electroporar se agregó 1 mL de sorbitol 1 M y se incubaron las células a 28 °C sin agitación por 1-2 h. Pasado ese tiempo se plaquearon 10, 25, 50, 100 y 200 µL en YPDS agar con zeocina 100 µg/mL y se incubaron a 28 °C durante 4-5 días. De esta manera se seleccionaron aquellas células que incorporaron al menos una copia del plásmido en su ADN genómico. Las colonias aisladas que crecieron se plaquearon en YPDS agar con zeocina 700 µg/mL para seleccionar aquellas que hubiesen adquirido múltiples copias. Los clones que presentaron mayor crecimiento se utilizaron para preparar crioinóculos, nuevamente según lo establecido en el kit (103). No se realizó un control con el plásmido vacío, es decir, sin la secuencia codificante para el DomI_{SR}.

Preparación de crioinóculos para la expresión de DomI_{SR}. De aquellos clones que presentaron mayor crecimiento en la placa multicopia, se seleccionaron cinco para preparar crioinóculos. Para ello, partiendo de dicha placa se inocularon 25 mL de YPD por cada clon y se incubaron a 28 °C durante toda la noche en agitación. A continuación, se midió la turbidez de los cultivos para obtener un estimado del número de células de cada uno, tomando como referencia que una absorbancia a 600 nm de 1 equivale a $\sim 5 \times 10^7$ células/mL. Se centrifugaron los 25 mL de cultivo a 1500 g por 5 min y a temperatura ambiente. Se resuspendieron las células en YPD con glicerol 15% de modo que el número

final de células estuviese entre $(2.5-5) \times 10^7$ células/mL. Finalmente se alicuotaron los crioinóculos de los cinco clones y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (103).

Expresión del DomI. La expresión se llevó a cabo de igual manera para ambas construcciones. El protocolo utilizado para la expresión del DomI está optimizado para minimizar la lisis celular y controlar así la contaminación en el medio de cultivo (56, 135). Para comenzar, se plaqueó el crioinóculo en YPD agar y con colonias aisladas se inocularon 5 mL de YPD que se incubaron 7-8 h. Pasado ese tiempo se evaluó el crecimiento del cultivo mediante la medida de la turbidez, determinada por absorbancia a 600 nm. Se escalaron los cultivos inoculando matraces con 25 mL de medio BMGY de manera de obtener una absorbancia inicial de 0.0234. De este modo, nos aseguramos que pasadas 15-17 h de incubación, los cultivos alcancen una absorbancia de 2-6, que es lo recomendado para inducir. Logrado esto, se centrifugaron los cultivos y se resuspendieron las células en medio BMMY para iniciar la inducción. Esta se llevó a cabo durante 96 h agregando 0.5% de metanol cada 24 h. Cada día se tomaron alícuotas de los cultivos para evaluar la expresión mediante SDS-PAGE reductor. Estas alícuotas se centrifugaron para separar las células del medio de cultivo, y los sobrenadantes correspondientes se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Toda la expresión se llevó a cabo a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en agitación.

Control de contaminación. Se realizó con el objetivo de evaluar la posible presencia de contaminantes en los cultivos, que pudiese explicar la presencia del pigmento marrón. Para ello se crecieron cultivos a partir de crioinóculos de expresión de DomI_{SR}. Se plaquearon cultivos de 54 h de inducción en medio BMMY, en tres medios ricos. Por un lado se utilizó YPD con zeocina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o sin zeocina, por otro lado se utilizó Medio Completo para *Aspergillus nidulans* (141). Este último además de tener extracto de levadura, peptona y dextrosa, como el YPD, está enriquecido en vitaminas, sales y aminoácidos. Las placas se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se monitoreó el crecimiento al cabo de 14, 24 y 86 h de incubación.

Precipitación con sulfato de amonio. Luego de 96 h de inducción con metanol se centrifugaron los cultivos a 4000 g durante 10 min a temperatura ambiente, y se recuperó el medio de cultivo donde se espera encontrar al DomI. La proteína se separó del medio por precipitación con sulfato de amonio al 70% de saturación a pH 4 y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación, toda la noche, y luego se centrifugó a 12000 g por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de agua (~ 40 mL) y se dializó contra agua y luego contra amortiguador, ambos durante 24 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando membranas con un corte de 14 kDa (56, 126, 134, 142). Los amortiguadores utilizados fueron acetato de sodio 25 mM, pH 4.2 o fosfato de sodio 20 mM, pH 7.4.

Cromatografías. Para purificar el DomI de otros contaminantes se evaluaron varias cromatografías. En todos los casos primero se pasó la muestra por dispositivos de ultrafiltración para concentrarla y cambiar el amortiguador al de inicio de la cromatografía correspondiente. Al finalizar la misma se ultrafiltraron los picos recolectados para lavar y concentrar.

Intercambio aniónico. Se realizó en *batch* con una resina con intercambiadores dietilaminoetil (DEAE Sepharose) y se evaluaron varios amortiguadores buscando lograr una buena separación. En todos los casos el amortiguador de inicio y el de elución difirieron en que este último contenía NaCl 1 M. De esta manera al mezclar distintas proporciones de ambos se logró hacer una elución con aumento gradual en la concentración de NaCl. Los amortiguadores utilizados fueron: Tris 50 mM, pH 7.4; acetato de amonio 20 mM, pH 5.2; ácido fórmico 100 mM, pH 3.0 con urea 6 M; acetato de amonio 20 mM, pH 4.0 con urea 6 M. Se sembró la muestra, conteniendo al DomI_{MS}, se realizaron tres lavados y se comenzó la elución. Para todas las fracciones, luego del agregado de fase móvil, se centrifugó a 10000 g, 10 min, para bajar la resina y se guardó el sobrenadante.

Intercambio catiónico. La columna utilizada para la cromatografía posee carboximetilos como intercambiadores (HiPrep CM FF 16/10). Se ensayaron dos amortiguadores de inicio, acetato de sodio 25 o 20 mM a pH 4.2 y 5.0 respectivamente. En ambos casos la elución se realizó cambiando la fuerza iónica mediante un salto en la concentración de NaCl a 1 M. El flujo de la cromatografía fue de 3 mL/min.

Afinidad. Se utilizó una columna con resina derivatizada con grupos Cibacron Blue F3G-A (HiTrap Blue HP) a la que se le inyectó DomI_{SR} previamente purificado por intercambio catiónico. Como amortiguador de inicio se utilizó fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0 y para la elución se realizó un salto en la concentración de NaCl hasta 2 M final. El flujo de la cromatografía fue de 1 mL/min.

Ensayo del ácido bicinonínico (BCA). Para determinar la concentración de DomI_{MS}, se realizó una curva de calibración con HSA comercial deslipidada de concentración conocida en el rango de 0-9 µg/mL. Una vez mezcladas las muestras con el reactivo BCA, se incubó 30 minutos a 60 °C y se midió absorbancia a 562 nm (143). Para descontar la posible contribución de la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de trabajo, se realizaron controles sin el reactivo BCA.

Ensayo de Bradford. Para determinar la concentración de DomI, al igual que para BCA, se realizó una curva de calibración con HSA comercial deslipidada de 0-6 µg/mL. Al igual que para BCA, debido al color de la muestra se realizaron controles a los que no se les agregó

reactivo de Bradford. El ensayo se llevó a cabo en placa midiendo absorbancia a 595 nm (144). A diferencia de BCA que se utilizó solo para el DomI_{MS}, el ensayo de Bradford se utilizó para ambos DomI.

Reducción del DomI con 2-mercaptoetanol. Como primer paso para caracterizar la reactividad del tiol de la Cys34, es necesario reducir previamente la proteína. Para ello, se ensayaron dos condiciones de reducción basados en la experiencia previa con HSA, que difieren únicamente en el tiempo y la temperatura de incubación. En el caso del DomI_{MS} se ensayaron ambas condiciones, mientras que para el DomI_{SR} se ensayó solo una. Más precisamente, se incubó DomI_{MS} con 2-mercaptoetanol 10 mM por 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Este experimento se realizó en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.4. Alternativamente se realizó la incubación de DomI_{MS} o DomI_{SR}, ambos 43-44 μ M con 2-mercaptoetanol 10 mM toda la noche y a 4 °C. Estos experimentos se realizaron en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM. En todos los casos, luego de transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el exceso de reductor mediante gel filtración. A continuación se cuantificó el DomI por el método de Bradford y se cuantificaron tioles con DTNB como se describe más adelante.

Reducción del DomI con DTT. Con el objetivo de evaluar otro reductor se utilizó DTT. Se incubó DomI_{MS} 100 μ M con DTT 5 mM a 4 °C en agitación. Al cabo de 1 h se sacó una alícuota de 140 μ L y se gel filtró dos veces con microcolumnas de gel filtración para eliminar el exceso de reductor. Se cuantificó el DomI_{MS} por el método de Bradford y se cuantificaron tioles con DTNB cómo se indica más adelante. Luego de transcurridas 2 h de incubación, se sacó otra alícuota y se repitió el procedimiento. Este experimento se realizó en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM.

Cuantificación de tioles y determinación de la constante de reacción con DTNB. Se mezcló DomI reducido 11.5-95 μ M con DTNB y se siguió la formación de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) por absorbancia a 412 nm ($\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (138). Las concentraciones de DTNB variaron entre 50-200 μ M dependiendo del experimento. En todos los casos se realizó un control con DomI sin DTNB para evaluar la contribución del mismo y del pigmento remanente en la muestra. Además se realizó un control sin proteína para descontar la posible hidrólisis del DTNB a TNB, que se ve favorecida en medio alcalino. También se midió la absorbancia a 412 nm en el tiempo para HSA reducida 10 μ M y DTNB 100 o 200 μ M, dependiendo del experimento. Esto se utilizó como control en los ensayos para la determinación de la constante de orden 2 entre el DomI y el DTNB (k_{DomI}). Todo el experimento se realizó en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM o en fosfato de sodio 20 mM pH 7.4.

Alquilación reductiva y tripsinización. Se mezcló Doml_{MS} 30 μ M con cloruro de guanidinio 6 M y DTT 2 mM con el fin de desnaturalizar la proteína y reducir los tioles. La concentración de DTT corresponde a un exceso de 6 veces respecto a la cantidad total de tioles reducidos y disulfuros que posee el Doml. La mezcla se degaseó con argón, se incubó 2 h a 37 °C y se le agregó ácido iodoacético 10 mM para bloquear los tioles reducidos. Se incubó 1 h en oscuridad, se agregó mercaptoetanol 100 mM para atrapar el iodoacético remanente, y se incubó 30 min. Luego la muestra se lavó por ultrafiltración con bicarbonato de amonio 0.1 M. Finalmente se tripsinizó agregando tripsina 1:50 respecto al Doml_{MS} y se incubó toda la noche a 37 °C.

Reducción, marcado diferencial de tioles y tripsinización. Como se explicó anteriormente, mediante el tratamiento de HSA con 2-mercaptoetanol, ya sea 30 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, se logra la reducción únicamente del tiol de Cys34 (137). Para evaluar si con el Doml sucede lo mismo o, en caso contrario, evaluar qué otras cisteínas se reducen, se realizó un experimento de marcado diferencial de tioles con análisis por espectrometría de masa. Específicamente, se trató Doml con 2-mercaptoetanol 10 mM toda la noche a 4 °C en agitación. Las concentraciones de Doml utilizadas fueron 25 y 3.4 μ M para el Doml_{MS} y Doml_{SR}, respectivamente. Transcurrido el tiempo de incubación, se trataron ambas muestras con iodoacetamida 50 mM durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente. De esta manera se bloquean tanto los tioles proteicos reducidos por el 2-mercaptoetanol, como el reductor remanente. Se lavaron las muestras con bicarbonato de amonio 0.1 M utilizando dispositivos de ultrafiltración de corte de 10 kDa y a continuación se incubaron las muestras con DTT 2 mM durante 2 h a 37 °C para reducir todos los disulfuros de la proteína. Para bloquear estos nuevos tioles libres, tanto proteicos como del DTT, se incubaron las muestras con ácido iodoacético 10 mM durante 1 h en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las muestras con bicarbonato de amonio 0.1 M. Finalmente se tripsinizó agregando tripsina 1:50 respecto al Doml y se incubó toda la noche a 37 °C.

Espectrometría de masas de MALDI-TOF. La muestra digerida fue analizada en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo. Previo al análisis se desaló la muestra por columna de fase reversa C18 en tip (zipTip C18) eluyendo directamente en la placa con la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 60% acetonitrilo:0.1% ácido trifluoroacético. Alternativamente se acidificó la muestra (sin desalar por zip tip) con ácido trifluoroacético 10% y se cargó en la placa junto con la matriz antes mencionada. Se realizaron espectros de masa (MS) y masa en tándem (MS/MS), que se adquirieron en modo reflector positivo. Para el experimento de alquilación reductiva se

realizó una calibración con péptidos estándar mientras que para los experimentos de marcado diferencial se realizó una calibración interna con péptidos propios de la muestra.

4.3.4 Servicios y plataformas

La identificación de proteínas a partir de gel se realizó por espectrometría de masa en un equipo de MALDI-TOF como servicio contratado en el UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo.

La secuenciación del plásmido sintetizado por la empresa Gen Script fue realizada por el servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, luego de la propagación y purificación del plásmido.

Propiedades del DomI tales como el peso molecular, coeficiente de extinción molar y punto isoeléctrico se determinaron con el programa ProtParam a partir de la secuencia primaria del DomI maduro. La predicción de los péptidos obtenidos para el DomI tras la hidrólisis con tripsina se realizó utilizando el programa PeptideMass a partir de la secuencia primaria del DomI. Ambos programas se encuentran disponibles en la plataforma Expasy, de libre acceso (<https://www.expasy.org/>). Para más información sobre la secuencia del DomI maduro y del PreDomI, ver anexo.

La predicción de los iones formados tras la fragmentación por espectrometría de masa se realizó con el programa de libre acceso, Fragment Ion Calculator del Institute for Systems Biology (<http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis de muestras de plasma por cromatografía

Como se comentó previamente en la introducción, se ha realizado un avance importante en cuanto al desarrollo del cromatografía para el análisis del estado redox de la Cys34 de la HSA. Dichos avances incluyen el análisis de muestras de HSA comercial reducida, oxidada con H_2O_2 y también bloqueada con Hg^{2+} , así como el análisis de una muestra de plasma fresco (65). Asimismo se logró adaptar la técnica de un equipo de FPLC con detector de absorbancia, a un HPLC con detector de fluorescencia (93). En base a todo esto, se propuso en el presente trabajo, avanzar en la puesta a punto del análisis de muestras de plasma. En particular, resultaba interesante evaluar el estado redox de la Cys34 en personas con sepsis versus personas sanas. Esto se debe a que la sepsis es una condición en la que se observa un aumento en la producción de especies oxidantes (145–147).

Para analizar muestras de plasma mediante cromatografía en el equipo de HPLC, fue necesario poner a punto la técnica. Para que las diferentes isoformas interactúen correctamente con el intercambiador de la columna y por lo tanto se logre una buena separación, es importante que la muestra esté al mismo pH que el amortiguador de inicio (amortiguador A, pH 5.35). Por ello se debe diluir el plasma en amortiguador A previo a la inyección en el equipo. Al realizar esta dilución se observó la precipitación de ciertos componentes del plasma, probablemente por la disminución en el pH de la muestra respecto al pH 7.4 fisiológico. Fue necesario entonces, realizar un control para corroborar que no fuera la HSA quien estuviera precipitando.

El control de precipitación consistió en cuantificar la HSA de una muestra de plasma sin diluir, y de una diluida en amortiguador A y posteriormente filtrada, utilizando el método del BCP. Este es un colorante que interactúa específicamente con albúmina, aumentando su absorbancia a 603 nm (139). Se realizó una curva de calibración con HSA deslipidada como estándar (Figura 5.1), que se utilizó para determinar la concentración de HSA en las muestras de plasma. Las concentraciones de HSA obtenidas para el plasma sin diluir y para el plasma diluido (corregido por la dilución) fueron de 36.5 y 35.1 g/L respectivamente, lo cual, considerando el error experimental, permite concluir que no hay precipitación de HSA en el amortiguador A.

De todas maneras, la centrifugación o el filtrado de la muestra diluida en amortiguador A previo a la inyección en la columna, es crítico para evitar la precipitación de otros componentes del plasma dentro la misma, ya que de lo contrario se deterioraría.

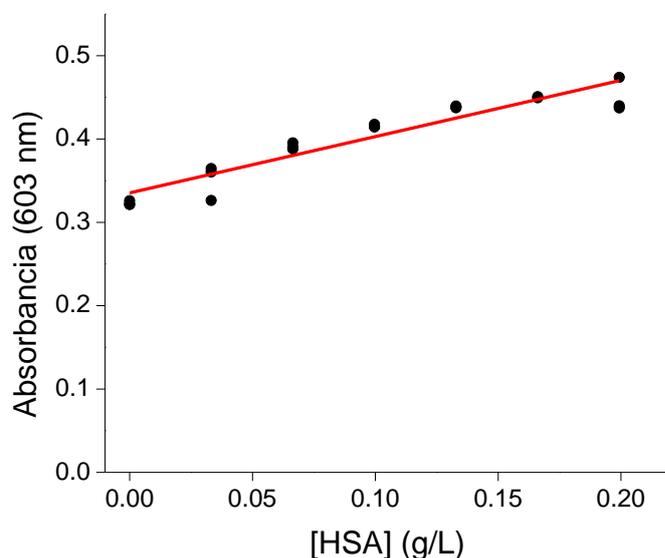


Figura 5.1. Curva de calibración del método BCP para la cuantificación de HSA en plasma de donantes sanos. La misma se realizó con HSA comercial deslipidada, por duplicado y se ajustaron los datos a una ecuación lineal.

5.1.1 Puesta a punto de la cantidad de HSA de inyección y análisis de las isoformas por cromatoenfoco

Como se comentó en la sección 2.3.6, experimentos previos utilizando HSA comercial mostraron que uno de los parámetros determinantes de la capacidad de resolución del método es la cantidad de HSA que se inyecta (93). Es por ello que, en siguiente lugar, se ensayó el cromatoenfoco para distintos volúmenes de plasma con el objetivo de determinar cuál era la cantidad de HSA necesaria para lograr una buena resolución de los picos correspondientes a sus isoformas (Figura 5.2).

Si se comparan visualmente los tres cromatogramas (Figura 5.2), se observa que a medida que aumenta el volumen de plasma inyectado, y por lo tanto la cantidad de HSA, se obtienen picos más definidos y separados. Además se puede calcular la resolución (R_s) utilizando la ecuación:

$$R_s = \frac{2\Delta R_V}{(W_1 + W_2)}$$

Donde ΔR_V es la diferencia en los volúmenes de retención de los analitos 1 y 2, y W_1 y W_2 son el ancho de cada pico a nivel de la línea de base. Se realizó entonces el cálculo de resolución en base a los picos a y a' , dado que el pico b es pequeño y no se logra definir. Esto se hizo solo para los cromatogramas B y C, ya que en el cromatograma A la escasa separación de los picos hace que no sean confiables los datos extraídos de él. Los R_s

obtenidos son de 0.45 y 0.79 para los cromatogramas B y C, respectivamente, lo que confirma que la resolución es mejor si se inyecta más HSA. En suma, se determinó que la mejor separación se logra con 645 μg de HSA.

El tiempo de retención del pico **a** en los cromatogramas B y C es de 43.1 y 44.2 min, respectivamente. Esta mínima diferencia se puede explicar por pequeñas variaciones en las fases móviles y/o la temperatura ambiente a la que se haya realizado el experimento (93).

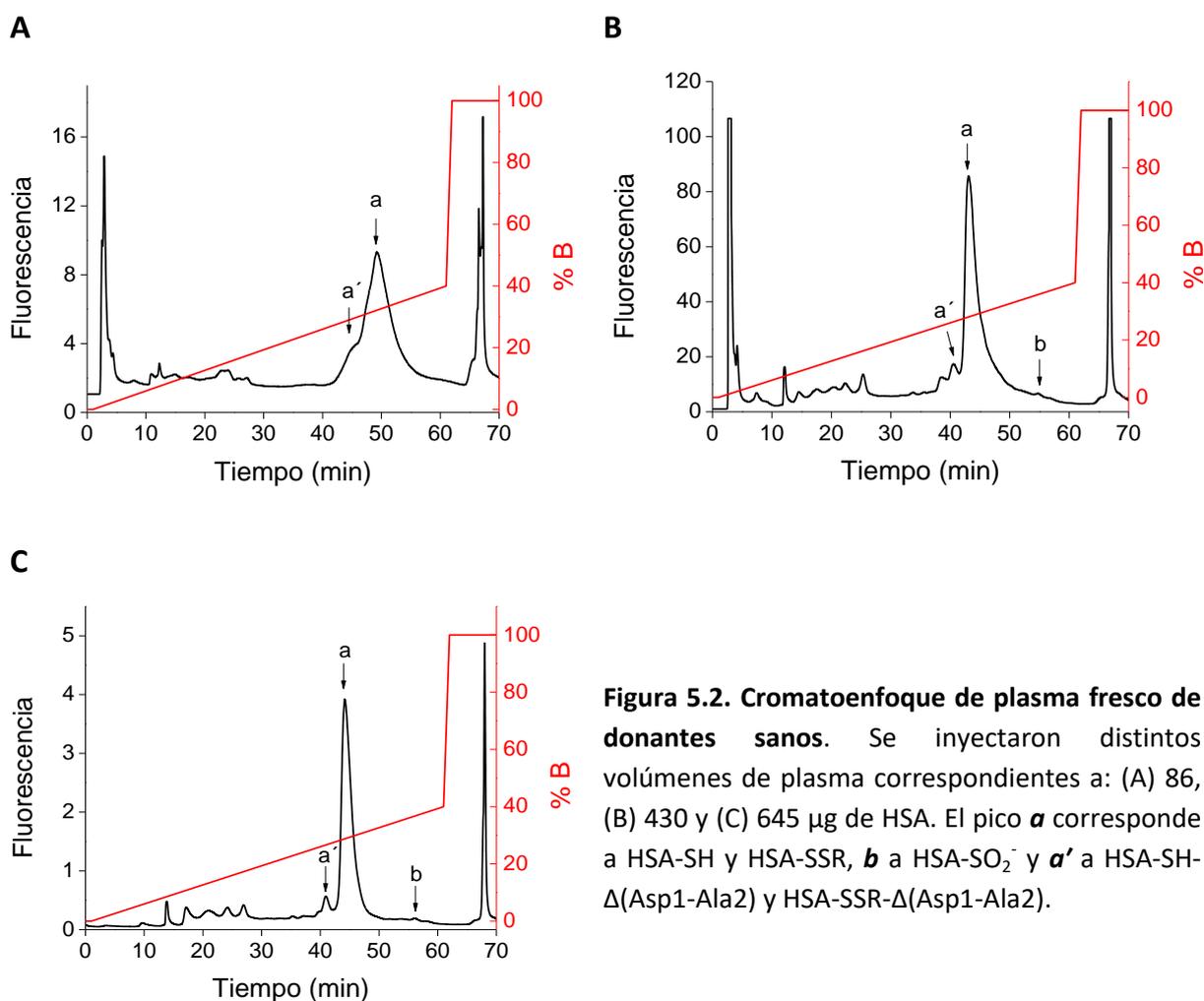


Figura 5.2. Cromatofluoreograma de plasma fresco de donantes sanos. Se inyectaron distintos volúmenes de plasma correspondientes a: (A) 86, (B) 430 y (C) 645 μg de HSA. El pico **a** corresponde a HSA-SH y HSA-SSR, **b** a HSA-SO₂⁻ y **a'** a HSA-SH- Δ (Asp1-Ala2) y HSA-SSR- Δ (Asp1-Ala2).

La ganancia del fotomultiplicador establecida para los cromatogramas fue diferente y a esto se deben las diferencias observadas en la intensidad de fluorescencia entre los mismos. Esto explica por ejemplo, por qué el cromatograma C tiene una intensidad de picos menor que los demás, siendo que es en el que se inyectó la mayor cantidad de HSA.

Respecto a la naturaleza de los picos, se asignaron de acuerdo lo observado en (65), artículo en el que se confirmó la identidad de los mismos por espectrometría de masa. Estos se pueden diferenciar principalmente en los cromatogramas de los paneles B y C de la

Figura 5.2. De este modo y como se explicó en la introducción, el pico **a** corresponde a la mezcla de HSA-SH y HSA-SSR. A su vez, en el caso de la HSA trunca que carece de los dos primeros aminoácidos de la secuencia (Asp1-Ala2), estas isoformas salen en el pico **a'**. La disminución en el tiempo de retención se debe a la pérdida de una carga neta negativa por la falta del aspartato inicial. Finalmente, el pico **b** corresponde a la HSA que se encuentra irreversiblemente oxidada a HSA-SO₂⁻, y que por lo tanto posee una carga negativa adicional respecto a las formas HSA-SH y HSA-SSR, aumentando su tiempo de retención. El resto de los picos no fueron tomados en cuenta para el análisis ya que corresponden a otros componentes del plasma.

La proporción de cada isoforma presente en plasma se puede determinar a partir de la integral del área de cada pico. En el caso del cromatograma C que es el que presenta mejor resolución de los tres, se determinó que el pico **a** representa el 86%, **a'** el 6% y **b** el 1%. Estos resultados coinciden con lo reportado para el análisis de plasma realizado con esta misma técnica (**a** 89%, **a'** 6%, **b** 2%) (65), lo que da la pauta de que la separación funcionó correctamente.

En suma, se logró poner a punto el análisis de muestras de plasma mediante cromatoenfoco. Se constató que la HSA no precipita en el amortiguador A y que a mayor cantidad de HSA mejor es la resolución de la columna. Además se compararon las proporciones de los picos **a**, **a'** y **b**, y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en un análisis de plasma anterior.

El análisis de muestras de plasma de personas con sepsis y personas sanas se vio retrasado y finalmente postergado por diversos motivos. Entre ellos se destacan el deterioro de la columna y la ruptura del HPLC. Esto condujo al entrecimiento de esta parte del trabajo, priorizando los experimentos con el DomI producido en *P. pastoris*.

En dicho análisis de plasma de personas sépticas se esperaba observar un aumento de las formas oxidadas (HSA-SO₂H y HSA-SSR) y una disminución de HSA-SH. El análisis puede realizarse de dos maneras. Una de ellas implica utilizar el cromatoenfoco tal cual se presentó en este trabajo y evaluar el aumento del pico **b** (HSA-SO₂H). El pico **a** por otro lado, contiene a las formas HSA-SSR y HSA-SH juntas por lo que no sería de utilidad evaluar los cambios en su proporción. La segunda alternativa implica el tratamiento del plasma, tanto de personas sanas como de personas sépticas, con HgCl₂, previo a la inyección en el equipo. Como se comentó en la introducción, el Hg²⁺ reacciona únicamente con HSA-S⁻, bloqueando el tiol y formando HSA-SHg⁺. Este tiene una carga positiva adicional, por lo que disminuye su tiempo de retención. Se obtendría entonces un cromatograma con un pico adicional,

correspondiente a HSA-SHg⁺, separado del pico de HSA-SSR. Independientemente del uso o no de HgCl₂ el análisis continúa con la determinación de la proporción de los picos de interés, calculada como la integral del área de cada uno. Para comparar los resultados obtenidos para los dos grupos de personas, se puede realizar un análisis estadístico de diferencias de medidas (ANOVA, P < 0.05) o medianas (en caso de que la distribución no sea normal). Además se puede buscar si correlaciona el nivel de oxidación de la albúmina con otros parámetros (score de gravedad, proteína C reactiva, etc.), determinando los coeficientes de corrección de Pearson.

5.2 Expresión, purificación y caracterización del DomI

En esta parte del trabajo se propuso expresar y purificar el DomI de la HSA en *P. pastoris*, con el objetivo de realizar estudios estructurales de los derivados oxidados. Para ello resultaba necesario además, caracterizar la reactividad del tiol de la Cys34 de dicho DomI.

El DomI se expresó utilizando dos construcciones diferentes. Una de ellas presentaba dos mutaciones sinónimas en la secuencia codificante respecto a la secuencia de referencia de la HSA. Al DomI expresado a partir de dicha construcción se le llamó DomI_{MS} (por DomI con mutaciones sinónimas). La otra construcción fue generada en base a la secuencia de referencia de la HSA y el DomI expresado a partir de la misma se denominó DomI_{SR}.

5.2.1 Dominio I con mutaciones sinónimas (DomI_{MS})

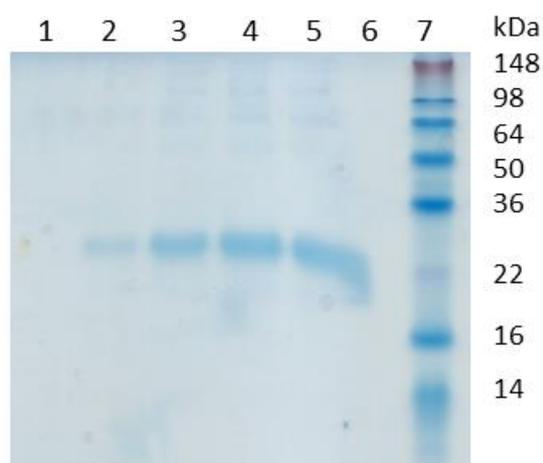


Figura 5.3. Expresión del DomI_{MS}. SDS-PAGE reductor. **Carriles 1-5:** sobrenadantes del medio de cultivo a t = 0, 24, 48, 72 y 96 h de inducción; **6:** vacío; **7:** Marcador de peso molecular (MPM).

y se tomaron alícuotas cada 24 h para evaluar la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 5.3). En el gel de expresión se observa una banda que migra de acuerdo al peso molecular teórico del DomI (22371.39 Da) y que se intensifica de acuerdo aumenta el tiempo de expresión. Se estudió la banda del gel mediante espectrometría de masa de MALDI-TOF. El análisis de los fragmentos trípticos obtenidos identificó de manera estadísticamente significativa al DomI de la HSA, confirmando la identidad de la proteína.

Expresión. Se utilizaron células de *P. pastoris* modificadas para la expresión del DomI_{MS}, preparadas previamente por Rodrigo Lombide y Lucía Turell a partir de la secuencia obtenida para la HSAr (56, 135). Se plaqueó un crioinóculo de dichas células en medio con zeocina (100 µg/mL) y se utilizó una colonia aislada para crecer un precultivo y escalar. Una vez alcanzada la turbidez necesaria se realizó el cambio de medio BMGY que tiene glicerol, a BMMY que en su lugar contiene metanol. De este modo se dio comienzo a la inducción y se tomó dicho momento como el tiempo cero (t = 0 h). Se expresó el DomI_{MS} durante 96 h

Purificación. La secuencia del DomI_{MS} clonada en el pPICZA posee la señal de secreción nativa de la HSA por lo que se espera encontrar al DomI_{MS} en el medio del cultivo. Por eso, al finalizar la inducción, se centrifugó el cultivo y se precipitó el sobrenadante con sulfato de amonio. Se resuspendió el precipitado en agua y se dializó contra agua y luego contra el amortiguador adecuado en función de la técnica que se fuera a llevar a cabo en siguiente lugar. A esta muestra se le denominó “dializado”. En el gel se puede observar que el dializado contiene al DomI_{MS} y se destaca su pureza respecto a la presencia de otras proteínas contaminantes (Figura 5.4, panel A). Esto, como se comentó en la introducción, es una ventaja clara de que el DomI se exprese como proteína de secreción hacia el medio de cultivo. Otra característica del dializado es que presenta una coloración marrón intensa (Figura 5.4, panel B).

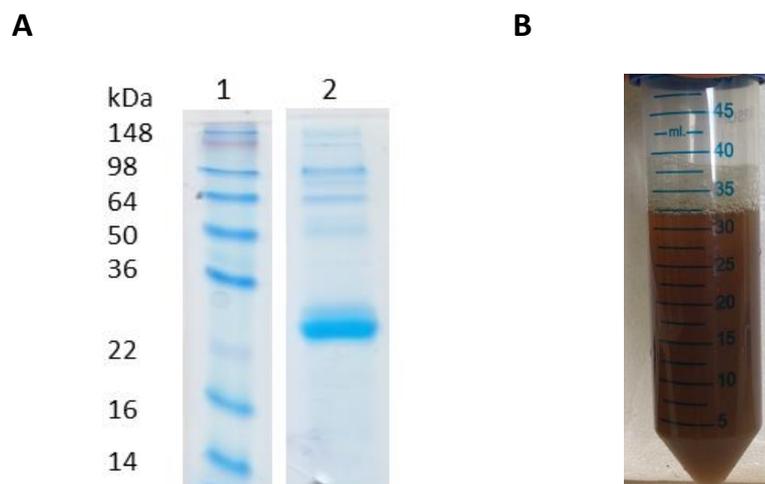


Figura 5.4. Precipitación del DomI_{MS} con sulfato de amonio y diálisis. (A) SDS-PAGE reductor del dializado. **Carril 1:** MPM; **2:** Dializado. (B) Foto del dializado. Se destaca la coloración marrón.

Si bien *P. pastoris* es un sistema de expresión ampliamente utilizado, hay pocos reportes en la literatura respecto a coloraciones de este tipo (148–151). La escasa literatura sugiere que no hay relación con la cepa de *P. pastoris* utilizada para la expresión, ya que se ha evidenciado dicha coloración en proteínas expresadas tanto en GS115 (151) como en X-33 (148, 150). Incluso realizando la expresión en distintos medios de cultivo, se aprecia este fenómeno. Aparentemente podría deberse a pigmentos producidos por la levadura durante el tiempo de crecimiento, como consecuencia de la sobreexpresión de una proteína heteróloga o de la inducción con metanol, que son los factores comunes en todos los casos (148, 150, 151).

Estos pigmentos interaccionan, en principio, de manera no covalente con la proteína heteróloga. Además, según su composición, varían en complejidad, color, tamaño y carga,

lo que dificulta su remoción eficiente (148–151). En un trabajo de Moore y colaboradores lograron remover el pigmento y purificarlo, para analizarlo mediante RMN. Observaron que se trata de un oligosacárido complejo que envuelve a la proteína, del que no lograron elucidar la estructura completa (148). En un principio, las técnicas utilizadas para eliminar el pigmento incluían combinación de cromatografías, como intercambio catiónico y de interacción hidrofóbica (148, 149). En el año 2018 se publicaron dos artículos más en los que los investigadores reportan la presencia de pigmentos de *P. pastoris* en la producción de proteínas recombinantes. En los mismos recurren al tratamiento con carbón activado (151) o desnaturalización y replegado de la proteína en cuestión (150), para despegar el pigmento unido a la misma de manera no covalente. En uno de ellos recurren, al igual que Moore, a métodos de cristalización para eliminar el pigmento (148, 150).

En nuestro caso, observamos que al dializar la muestra en una membrana de corte de 14 kDa, parte del pigmento sale de la membrana y parte permanece dentro. Lo mismo sucede al pasar la muestra por dispositivos de ultrafiltración de corte de 10 kDa, parte queda en el filtrado y parte retenido con la proteína. De hecho, cuando se lo pasa por filtros de corte de 5 kDa, la cantidad de pigmento que pasa al filtrado es menor. Esto nos hace pensar que no se trata de un único componente de peso molecular determinado, sino que estamos frente a un conjunto de moléculas, de las que desconocemos su identidad y complejidad. Esto se vio incluso en experimentos de Lucía Turell y Rodrigo Lombide, en los que buscaron purificar a la HSAr del pigmento por cromatografía de exclusión molecular. Además sabemos por otros experimentos previos, que no se trata de una proteína y que posee carga negativa, lo que es consistente con reportes de la literatura recién mencionados (148, 149). Por ello, el siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico, considerando un $pI_{\text{teórico}}$ para el DomI de 5.32.

Cromatografía de intercambio aniónico

En primer lugar se realizó un intercambio aniónico en *batch*, en el que se ensayaron varias fases móviles en un rango de pHs que incluían desde Tris pH 7.4, hasta ácido fórmico pH 3.0 con agentes desnaturalizantes (datos no mostrados). El amortiguador que mejor funcionó fue acetato de amonio 20 mM, pH 5.2 eluyendo con concentraciones crecientes de NaCl (25-1000 mM). En este caso, se pretendía tener al DomI_{MS} cerca de la neutralidad para que no interaccionara con la resina y saliera en la fracción no unida, mientras que el pigmento negativo quedaría retenido para ser eluido por el aumento de fuerza iónica. En el cromatograma se observa un pico y un hombro que no se logran resolver adecuadamente (Figura 5.5, panel A). Del gel se observa que la mayor parte del DomI_{MS} se encuentra en el hombro del cromatograma, lo que corresponde a la elución con NaCl entre 75 y 200 mM

(Figura 5.5, panel C). Esto sugiere que el principal responsable de la absorbancia a 280 nm del pico del cromatograma, es el pigmento. Además, si se observan los espectros (Figura 5.5, panel B) se puede apreciar que los mismos tienen formas ligeramente distintas dependiendo de la proporción pigmento/proteína que contengan. Por ejemplo, en el caso de los eluidos E6 y E7 que contienen principalmente pigmento, no se observan las características de un espectro de proteína. La absorbancia entre 300-450 nm es elevada y no hay una señal marcada a 280 nm (un pico o un hombro) sino que se observa una subida continua conforme disminuye la longitud de onda. Además se destaca la contribución del pigmento a la absorbancia en todo el rango de longitud de onda registrado.

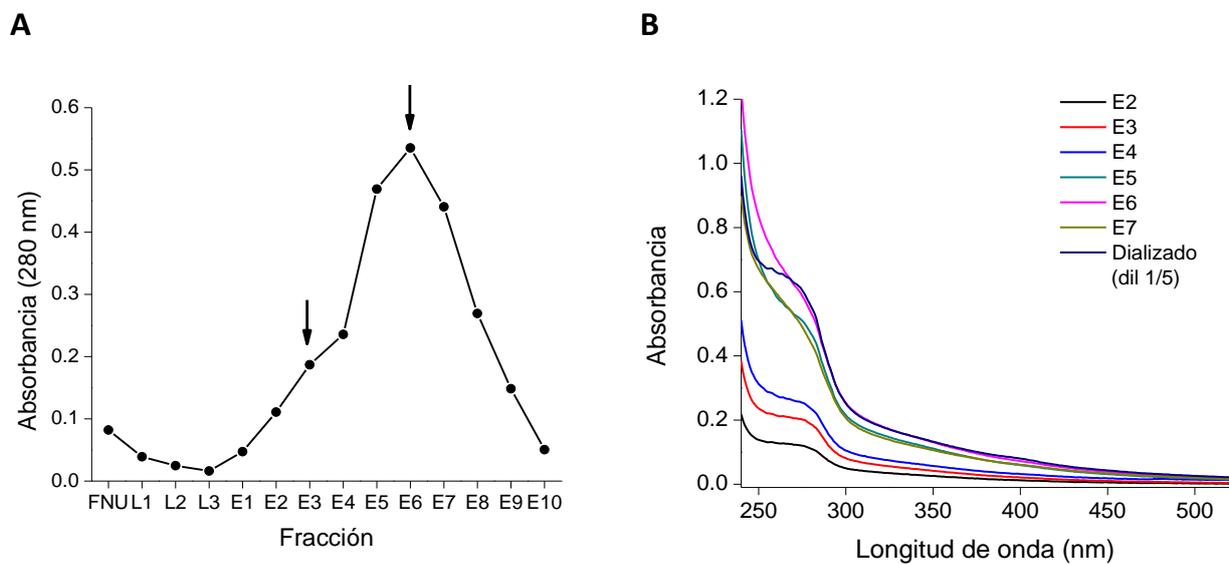


Figura 5.5. Purificación del DomI_{MS} por cromatografía de intercambio aniónico, DEAE sefrosa en *batch*. Los eluidos 1-10 corresponden a concentraciones de NaCl de 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750 y 1000 mM, respectivamente. (A) Cromatograma (FNU: fracción no unida, L: lavado, E: eluido). El amortiguador utilizado fue acetato de amonio 20 mM, pH 5.2, con concentraciones crecientes de NaCl (0-1 M). (B) Espectros UV-Vis de los E2-E7 y del dializado. (C) SDS-PAGE reductor, **carril 1: MPM; 2-7: E2-E7; 8: Dializado.**

Por lo tanto, se concluye que esta cromatografía no es útil para purificar el DomI_{MS} del pigmento ya que no se logró una buena separación de los mismos. Además, el pigmento permaneció adsorbido a la resina, incluso luego de varios lavados con NaCl 1M, lo que dificultó su regeneración. Esto coincide con los reportes presentados anteriormente en los

que se observó también una disminución en la vida útil de las resinas de intercambio aniónico a causa del pigmento (149, 151). El hecho de que hubiese quedado coloración marrón en la resina siendo que en el cromatograma se observa que la absorbancia a 280 nm para la fracción E10 es prácticamente cero, sugiere nuevamente que el pigmento puede estar formado por más de un componente. Se puede pensar incluso, que estos componentes interaccionen de manera distinta con la proteína y con la resina utilizada.

Cromatografía de intercambio catiónico

En segundo lugar se ensayó una cromatografía de intercambio catiónico a pH 4.2 de modo de cargar positivamente al DomI_{MS} para que interaccionara con la matriz y fuera retenido, mientras que el pigmento cargado negativamente eluiría en la fracción no unida. Luego de varios intentos se confirmó que a pHs menores que 4.7 el DomI_{MS} precipita, a diferencia de la HSA nativa que tiene una gran estabilidad en solución en un amplio rango de pH. Esto se ve reflejado por ejemplo en el proceso de deslipidación con carbón activado en el que se lleva a la HSA a pH 3 durante 2 h a 4 °C y, tras dos etapas de centrifugación, se obtiene la HSA deslipidada en el sobrenadante.

Cuando la misma cromatografía se llevó a cabo a pH 5.0 se logró una mejor separación del DomI_{MS} y del pigmento, eliminando gran parte del mismo (Figura 5.6). Esto se ve reflejado por un lado en el cromatograma, en el cual se obtienen dos picos bien definidos, uno correspondiente a la fracción no unida (FNU) a la columna y otro a la fracción unida (FU), eluida mediante un aumento en la fuerza iónica (Figura 5.6, panel A). Por otro lado, si se comparan los espectros de las fracciones obtenidas de la cromatografía y del dializado, se ve que son claramente diferentes (Figura 5.6, panel B). En el caso de la FU, a diferencia de la FNU y el dializado, hay un pico más marcado en torno a los 280 nm y una disminución de la absorbancia a 300-450 nm. Esto sugiere que la FU tiene un menor componente de pigmento que las otras dos muestras, pudiéndose apreciar mejor el espectro de la proteína. De todos modos la contribución a la absorbancia entre 300-450 nm indica que la remoción del pigmento, si bien es importante, no es completa. Finalmente del gel se observa que una pequeña porción del DomI_{MS} se pierde en la FNU (Figura 5.6, panel C), es decir, que no interacciona con los intercambiadores de la resina. Esto era de esperar ya que el pH de la cromatografía es 5.0, muy próximo al $pI_{teórico}$ para el DomI (5.32). Se debe destacar también la variedad de proteínas contaminantes que eluyen en la FNU y que por lo tanto contribuyen a purificar al DomI_{MS}.

En suma, si bien se pierde una fracción del DomI_{MS} mediante esta cromatografía de intercambio catiónico, se logró remover gran parte del pigmento y proteínas contaminantes. Cabe destacar que este procedimiento se repitió varias veces, obteniendo

siempre una buena reproducibilidad y por lo tanto fue utilizado para purificar al DomI_{MS} para los siguientes ensayos.

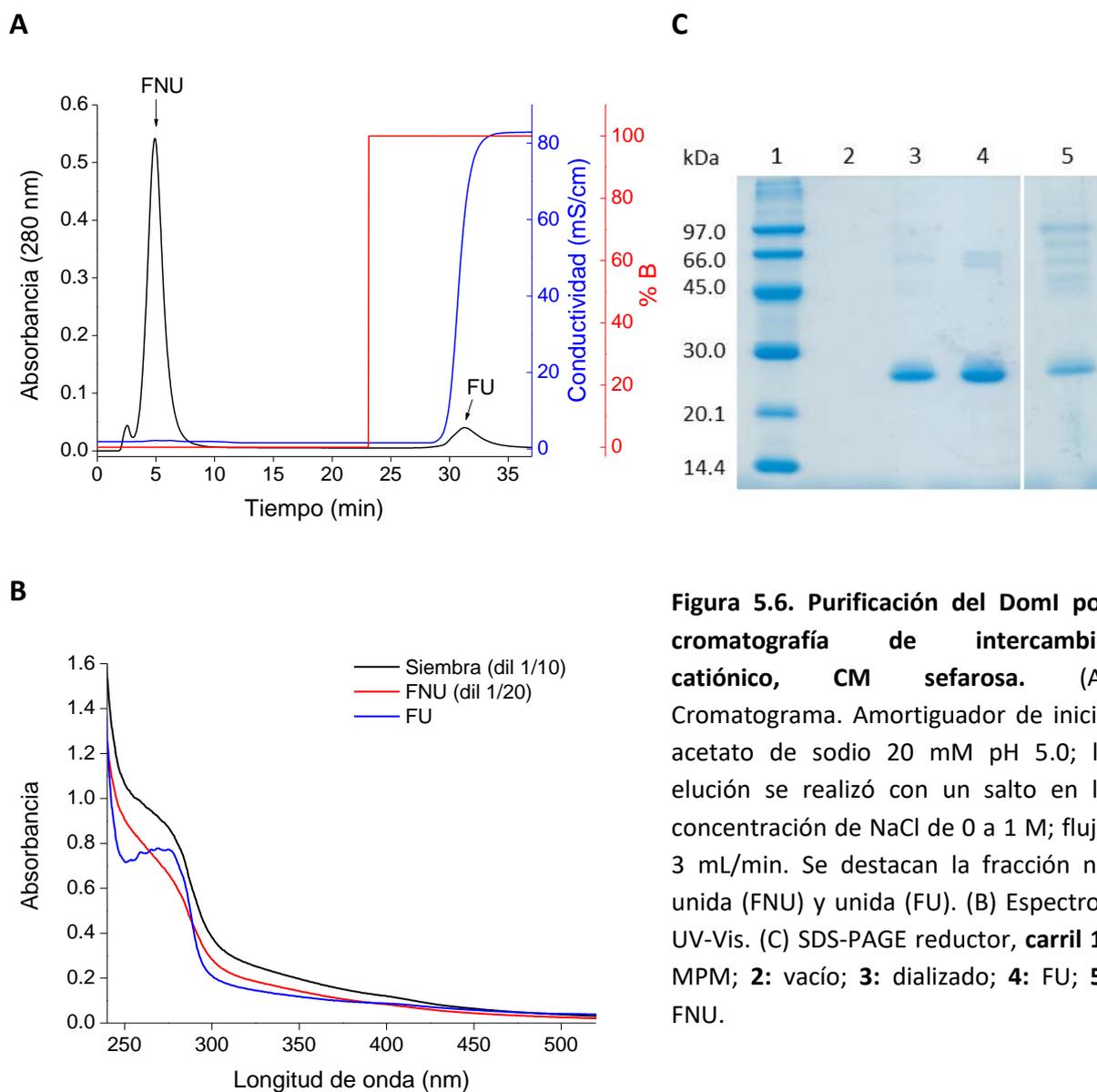


Figura 5.6. Purificación del DomI por cromatografía de intercambio catiónico, CM sefarosa. (A) Cromatograma. Amortiguador de inicio acetato de sodio 20 mM pH 5.0; la elución se realizó con un salto en la concentración de NaCl de 0 a 1 M; flujo 3 mL/min. Se destacan la fracción no unida (FNU) y unida (FU). (B) Espectros UV-Vis. (C) SDS-PAGE reductor, **carril 1:** MPM; **2:** vacío; **3:** dializado; **4:** FU; **5:** FNU.

Cuantificación. Si bien se logró eliminar la mayor parte del pimento mediante cromatografía de intercambio catiónico, se puede observar del espectro UV-Vis (Figura 5.6, panel B) que la presencia de pigmento remanente en la fracción purificada de DomI_{MS} interfiere en la cuantificación proteica por absorbancia a 280 nm. Con el objetivo de encontrar una manera confiable para cuantificar al DomI_{MS} purificado, se compararon tres métodos, absorbancia a 280 nm, BCA (143) y Bradford (144). Utilizando estas tres aproximaciones se determinó la concentración de proteínas del dializado y del DomI_{MS} (Tabla 5.1). Para los dos métodos de desarrollo de color, BCA y Bradford, se realizaron curvas de calibración con HSA como

patrón (Figura 5.7) y se realizaron controles de absorbancia de cada muestra. Para absorbancia a 280 nm se utilizó un $\epsilon_{\text{teórico}} = 11055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Como se observa en la Tabla 5.1, para el DomI_{MS} hay una sobreestimación de la concentración cuando esta es determinada por absorbancia a 280 nm dado que el pigmento remanente absorbe a dicha longitud de onda. En el caso del dializado, no se midió la absorbancia a 280 nm debido a que dicha contribución es aún mayor. En cuanto a BCA, se hace evidente en la cuantificación del dializado que el pigmento interfiere en la determinación por motivos que se desconocen. El método que presentó menos interferencias fue Bradford. Comparando distintas expresiones y purificaciones, se determinó que hay cierta reproducibilidad en la proporción en la que se purifica el DomI_{MS} del pigmento. Esto se expresa como la relación entre la concentración de DomI_{MS} calculada a partir de la absorbancia a 280 nm sobre la concentración obtenida por Bradford ($[\text{DomI}]_{\text{Abs280nm}}/[\text{DomI}]_{\text{Bradford}}$). Los valores obtenidos en purificaciones independientes de expresiones independientes están entre 1.5 y 2.1, siendo el resultado ideal un cociente de 1.

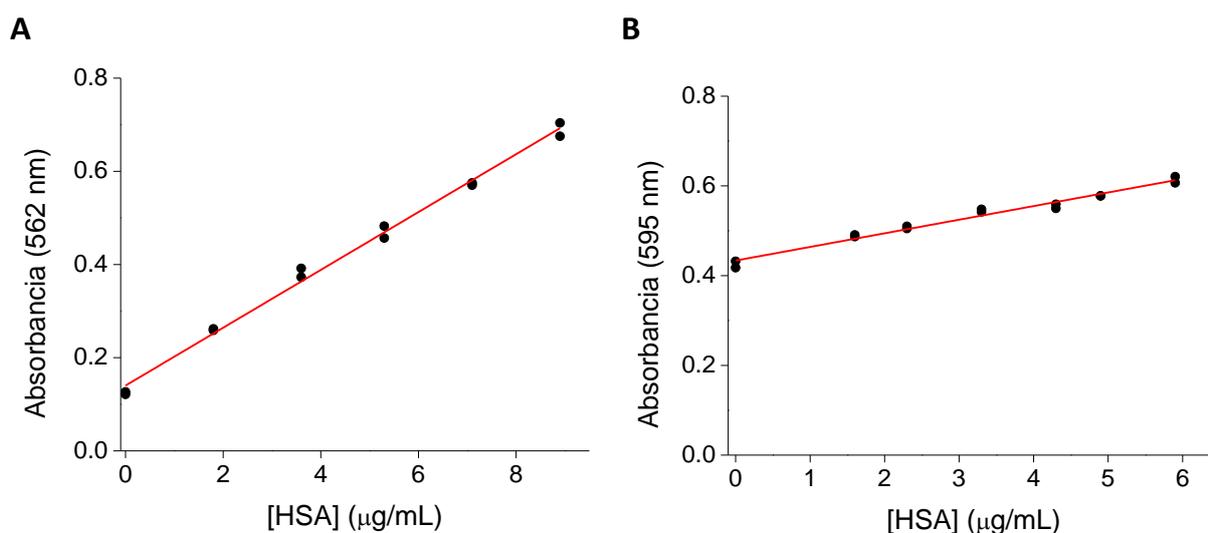


Figura 5.7. Curvas de calibración con HSA para la cuantificación de proteínas. Para ambos métodos se utilizó como estándar HSA comercial deslipidada, y se realizó cada curva por duplicado. (A) BCA. (B) Bradford.

Tabla 5.1. Cuantificación de proteínas por absorbancia a 280 nm, BCA y Bradford del dializado y de la fracción purificada (DomI_{MS}).

Método	[Proteínas] _{dializado} (µM)	[Proteínas] _{DomI MS} (µM)
Absorbancia _{280 nm}	-	45
BCA	300	20
Bradford	43	26

Alquilación reductiva, tripsinización y análisis por espectrometría de masas de MALDI-TOF. Cuando se contó con la proteína purificada y con un método para cuantificarla, se realizó un análisis por espectrometría de masas de la misma. Resultaba de especial interés para la continuidad del presente trabajo, evaluar la capacidad del tiol de la Cys34 de reducirse, ya que dadas las condiciones de expresión y purificación utilizadas, era posible que el tiol estuviese irreversiblemente oxidado. Para eso se llevó a cabo una alquilación reductiva del DomI con el objetivo de bloquear todos los tioles, estuviesen originalmente reducidos u oxidados a disulfuro. Posteriormente se tripsinizó la proteína para analizar los fragmentos tripticos resultantes. De esta manera, es posible no solo evaluar el estado de oxidación del tiol sino también la integridad de la proteína.

En el espectro de masas (MS) se identificaron varios péptidos cuyas relaciones masa/carga (m/z) monoisotópicas coinciden con péptidos esperados para el DomI alquilado y tripsinizado (Figura 5.8, panel A). La cobertura de secuencia obtenida fue del 71% (Figura 5.8, panel B). La mayor parte de los péptidos que no se observaron coincidieron con aquellos que por su tamaño están en el límite de detección de la técnica.

Además se buscaron señales que pudieran indicar la presencia del prepéptido en la proteína debido a un incorrecto procesamiento del mismo por parte de la levadura. Los péptidos buscados corresponden a los esperados para el pre-DomI tripsinizado, considerando que la enzima se saltee hasta 2 sitios de corte. No fue necesario contemplar la alquilación ya que no hay cisteínas involucradas. Los $m/z_{teórico}$ de los mismos son: 2332.20, 2591.34, 3011.54, 3270.68 y 3286.70. Se confirmó la ausencia de dichas señales en el MS, lo que apoya la ausencia del prepéptido en la proteína. En este sentido, hay reportes en la literatura que reafirman este hallazgo. Por ejemplo, en un trabajo de Huang y colaboradores, expresan una proteína de fusión con HSAr en *P. pastoris*, utilizando el prepéptido de la HSA como secuencia señal de secreción. En el mismo confirman el correcto procesamiento del prepéptido por parte de la levadura mediante secuenciación amino terminal (152). De manera similar, en un reporte de Bobik y colaboradores en el que expresan HSAr en GS115 de *P. pastoris*, también verifican el correcto procesamiento del prepéptido (122). En conjunto, la ausencia de señales correspondientes al prepéptido en el MS y los reportes de la literatura, refuerzan la idea de que la levadura corta correctamente el prepéptido antes de la secreción de la proteína al exterior celular.

Se destaca también la presencia de una señal en el MS de m/z 1149.60 que puede corresponder a los primeros 10 aminoácidos de la secuencia (extremo amino terminal, $m/z_{teórico} = 1149.58$) cuando la tripsina saltea un sitio de corte, o bien puede corresponder a los aminoácidos 42-51 ($m/z_{teórico} = 1149.62$). Ambos péptidos se muestran en naranja en la

Figura 5.8, panel B. Para confirmar la identidad del péptido es necesario fragmentarlo y obtener el MS/MS donde se puedan ver los iones hijos **b** e **y**. En esta ocasión no se fragmentó pero se tendrá en cuenta para futuros experimentos.

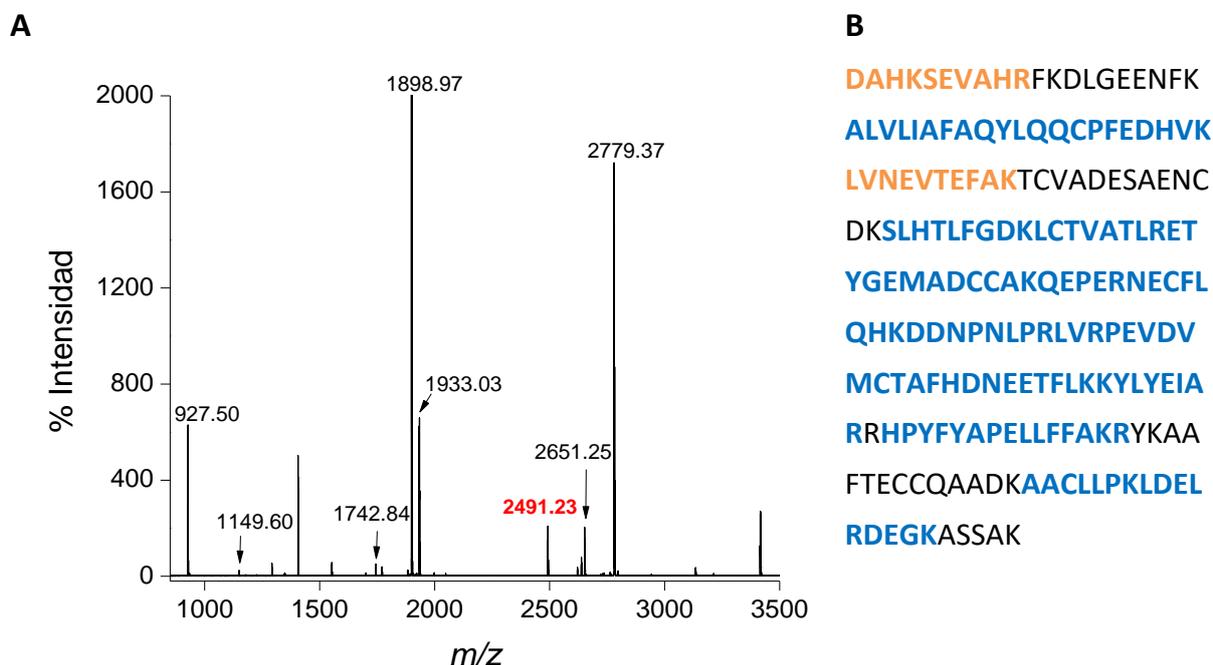


Figura 5.8. Espectrometría de masa MALDI-TOF del DomI_{MS}. Se realizó una alquilación reductiva y posterior tripsinización del DomI_{MS}. La muestra se desaló mediante zip tip. (A) MS del DomI_{MS} con asignación de péptidos. En rojo se muestra el péptido monocargado de la Cys34 modificado por iodoacético. (B) Secuencia aminoacídica del DomI. Se muestran en azul los péptidos identificados en el MS, y en naranja los dos péptidos posibles para la señal de 1149.63.

En particular, se logró detectar el péptido que contiene a la Cys34 ($m/z_{teórico} = 2433.26$, reducido sin alquilar) modificado por la reacción con iodoacético (+ 58.03 Da, $m/z_{teórico} = 2491.29$; destacado en rojo en la Figura 5.8, panel A). Como era de esperar, no se vio el péptido reducido sin modificar, así como tampoco se observaron los derivados oxidados ácido sulfénico (+ 16 Da, $m/z_{teórico} = 2449.26$), sulfínico (+ 32 Da, $m/z_{teórico} = 2465.26$) y sulfónico (+ 48 Da, $m/z_{teórico} = 2481.26$).

Para confirmar que se trataba del péptido de la Cys34 alquilado se fragmentó dicho péptido ($m/z = 2491.23$) y se obtuvo el espectro de masas en tándem (MS/MS). Se encontraron varios iones **b** e **y** hijos, que mostraron la presencia de la modificación en la posición de la Cys34 (Figura 5.9). En particular se destacan los iones **y**₇ y **b**₁₃ (los últimos sin modificar), y el **y**₈+58 y **b**₁₄+58 (los primeros modificados), que indican que la modificación por iodoacético se encuentra en la posición de la Cys34. Se puede ver en el espectro, que la señal del ion **y**₇, que corresponde a la fragmentación entre Cys34 y la prolina adyacente, es la señal más intensa del espectro. La buena intensidad de este péptido se ha visto en otras

ocasiones cuando se fragmenta el péptido de la Cys34 de la HSA (53, 54). En conjunto estos resultados demuestran que el tiol no se encuentra irreversiblemente oxidado y que es capaz de reducirse bajo condiciones de alquilación reductiva, lo cual es de especial relevancia para nuestro trabajo.

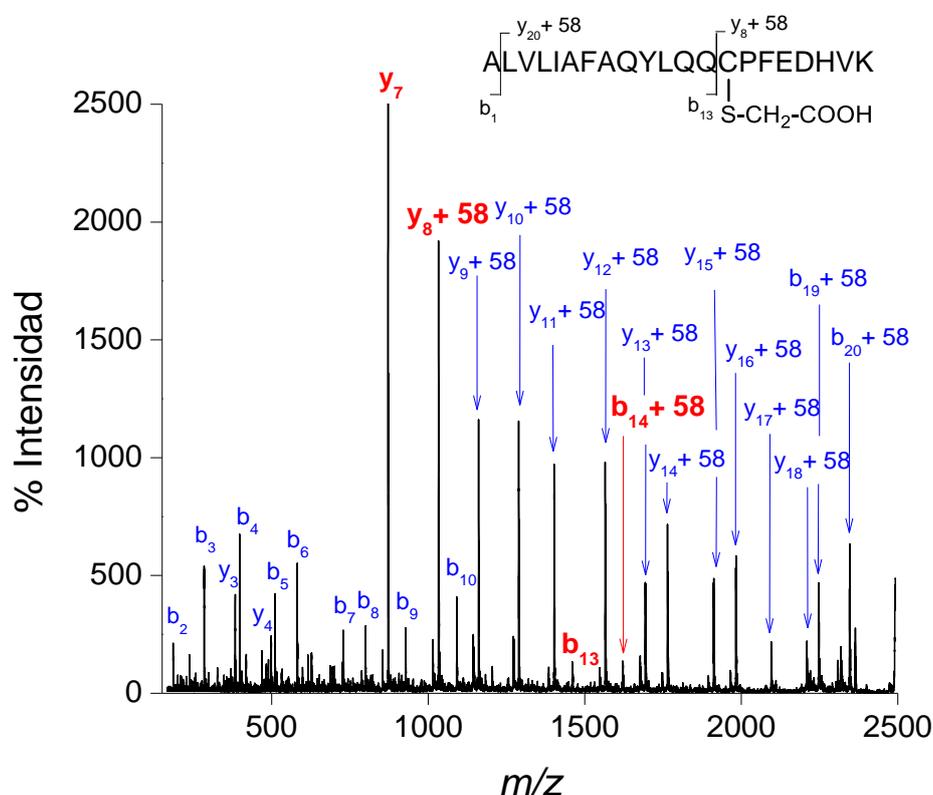


Figura 5.9. Espectrometría de masa de MALDI-TOF del DomI_{MS}. MS/MS del péptido de la Cys34 con iones *b* e *y* asignados. Se destacan en rojo iones claves para determinar la posición de la modificación por ácido iodoacético.

Reducción con 2-mercaptoetanol, cuantificación de tioles y determinación de la constante de reacción con DTNB. En el experimento anterior se buscó reducir todas las cisteínas por lo que se utilizaron condiciones de reducción “fuertes” incluyendo el uso de desnaturizantes. En particular resultaba de interés saber si la Cys34 era capaz de reducirse, al menos en esas condiciones fuertes de reducción. Una vez confirmado esto, se procedió a poner a punto la reducción selectiva de la Cys34, manteniendo los disulfuros como tales. Para ello, se ensayaron distintas condiciones de reducción variando el reductor, el tiempo y la temperatura de incubación. Uno de los reductores utilizados fue el 2-mercaptoetanol, que se usa habitualmente para reducir HSA (137).

En primer lugar, se realizó la reducción incubando con 2-mercaptoetanol (10 mM) durante 30 min en agitación y a temperatura ambiente, y luego se gel filtró para eliminar el exceso de reductor. La cuantificación de tioles se realizó mezclando DomI_{MS} (11.5 μM) con

distintas concentraciones finales de DTNB (50, 100 y 200 μM) y registrando la formación de TNB en el tiempo a 412 nm (Figura 5.10) (138). Además se realizó un control con HSA reducida y DTNB 200 μM . El experimento fue realizado en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.4. En la Figura 5.10 se muestra a modo de ejemplo uno de los cursos temporales obtenidos para el DomI_{MS}, el curso temporal para la HSA y los demás controles realizados. El aumento de la absorbancia fue considerablemente más rápido en el caso del DomI_{MS}, que en el caso de la HSA. Esto sugiere una mayor reactividad de la Cys34 del DomI_{MS}. Además se realizó un control de DTNB para tener en cuenta la absorbancia basal correspondiente a la hidrólisis espontánea del mismo, y uno del DomI_{MS} para tener en cuenta la contribución a la absorbancia a 412 nm considerando lo observado en el espectro (Figura 5.6, panel B).

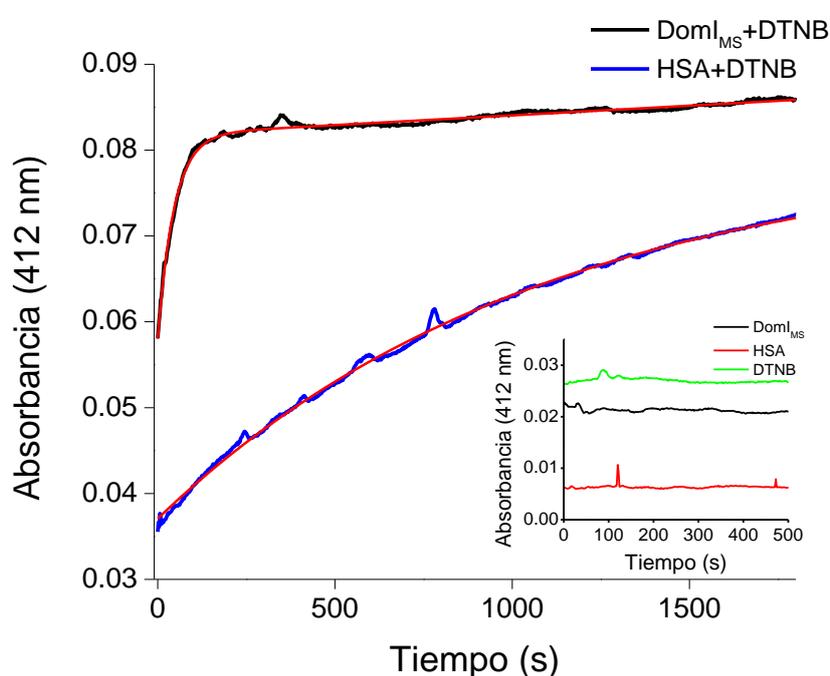


Figura 5.10. Cuantificación de tioles con DTNB. Se incubó DomI_{MS} (44 μM) con 2-mercaptoetanol (10 mM), 30 min a temperatura ambiente. Luego se eliminó el exceso de reductor. Se mezcló DomI_{MS} reducido (11.5 μM) con DTNB (200 μM) y se registró la absorbancia a 412 nm. El curso temporal se ajustó a una ecuación exponencial más recta. Además se realizó un control de HSA reducida (10 μM) con DTNB (200 μM), cuyo curso temporal se ajustó a una ecuación exponencial simple. Los ajustes se muestran en rojo. **Inserto:** controles correspondientes al DomI_{MS}, HSA y DTNB. Todo el experimento se realizó en amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.4.

En el caso de la HSA, se ajustó el curso temporal a una ecuación exponencial simple de la que se obtuvo una constante observada (k_{obs}). A partir de esta y en condiciones de pseudoprimer orden se obtiene la constante de reacción de orden dos (k):

$$k_{obs} = k[DTNB]$$

La k_{HSA} obtenida de esta manera es de $4.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (fosfato de sodio 20 mM, pH7.4 y 25 °C). El valor reportado para la HSA delipidada es de $15.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20, 53). La diferencia entre estos valores puede explicarse en términos de diferente fuerza iónica puesto que el reportado se determinó en fosfato 100 mM, pH 7.4 y 25 °C ($\mu = 0.26 \text{ M}$). De hecho, en uno de esos artículos se observó que a mayor fuerza iónica mayor es la constante de reacción. Considerando la fuerza iónica del fosfato de sodio 20 mM ($\mu = 0.052 \text{ M}$), y partir de los datos presentados en el artículo es posible estimar una k_{HSA} de $4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (20), lo cual coincide con el obtenido en este experimento.

En el caso del DomI_{MS}, los datos ajustaron a una ecuación exponencial más recta. El hecho que no ajuste a una ecuación exponencial simple sugiere que hay una reacción posterior, muy lenta, de reducción del DTNB. Esta reacción podría deberse a la reducción del DTNB por componentes del pigmento pero no se exploró en profundidad.

Para el cálculo de la concentración de tioles, dado que la reacción es rápida, se consideró la amplitud del ajuste y se corrigió por el valor de absorbancia inicial determinada como la suma de la absorbancia de los dos controles (DTNB y DomI_{MS}). Se obtuvo así un valor concentración de tioles de $2.3 \mu\text{M}$ que corresponden a una relación SH/DomI_{MS} de 0.20. Esto sugiere que la Cys34 no se redujo del todo, en estas condiciones, lo cual se discutirá más adelante. De hecho, en estas condiciones de reducción, para la HSA se obtienen normalmente valores entre 0.55 y 0.95 (137).

Para la determinación de la constante de reacción se registraron cursos temporales a distintas concentraciones de DTNB, se determinaron las k_{obs} y se construyó el gráfico de k_{obs} vs [DTNB]. Este se ajustó a una recta para obtener, a partir de la pendiente, la constante de orden dos, $k_{DomI MS}$ (Figura 5.11). La misma es de $110 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ en fosfato 20 mM pH 7.4 y 25 °C, y es ~ 24 veces mayor que lo observado para la HSA en iguales condiciones experimentales ($4.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El intercepto en el eje y del gráfico es 0, tal como se espera para una reacción irreversible.

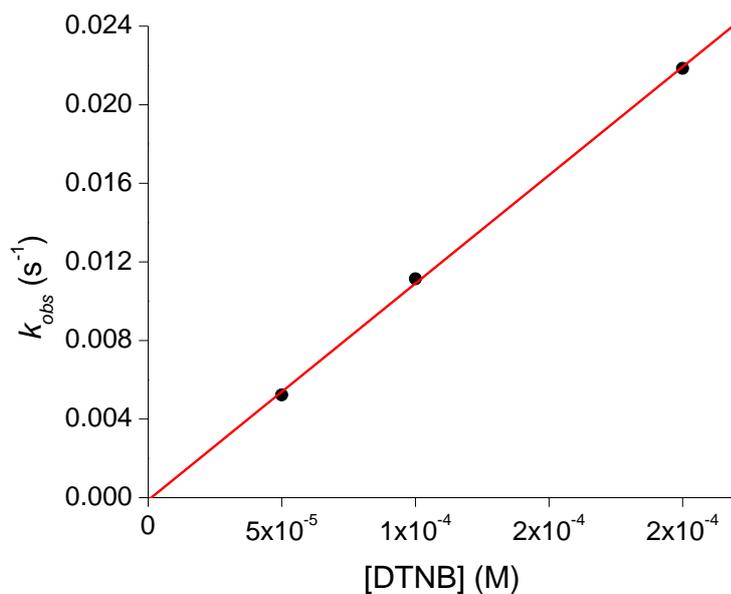


Figura 5.11. Gráfico secundario de k_{obs} (s^{-1}) vs [DTNB] (M) para el DomI_{MS}. Del ajuste a la recta se obtiene $k_{DomI MS}$.

Con el objetivo de tener un mejor cociente SH/DomI_{MS} se evaluó otra condición de reducción. En este caso se incubó la proteína (de la misma purificación) con la misma concentración de 2-mercaptoetanol (10 mM) pero durante toda la noche a 4 °C (53, 54, 137), y se eliminó el exceso de reductor por gel filtración. Luego se siguió nuevamente la reacción del tiol con DTNB por absorbancia a 412 nm. Dado que el resultado anterior indicaba que la $k_{DomI MS}$ es mayor que la k_{HSA} , incluso a baja fuerza iónica, para enlentecer la reacción se sustituyó la condición de DTNB 200 μ M y por una de 75 μ M. Se evaluó entonces la reacción con 50, 75 y 100 μ M DTNB. Se utilizó amortiguador fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM.

Al igual que en el experimento anterior se realizaron los controles correspondientes y se ajustaron los cursos temporales a una ecuación exponencial más recta para graficar k_{obs} vs [DTNB] y determinar la $k_{DomI MS}$ (Figura 5.12). La relación SH/DomI_{MS} se halló de la misma manera que en el experimento anterior ya que nuevamente no hay registro de los primeros segundos de la reacción. También se realizó el control de HSA reducida y DTNB 100 μ M.

La relación SH/DomI_{MS} determinada fue de 0.14, por lo que se concluye que la reducción no mejora en estas condiciones. En cuanto a la $k_{DomI MS}$, se determinó un valor de $229 M^{-1} s^{-1}$, mayor al determinado en el experimento anterior ($110 M^{-1} s^{-1}$). En el caso del control con HSA reducida, la k_{HSA} hallada fue de $11.5 M^{-1} s^{-1}$, del orden de lo reportado y mayor que lo hallado en el experimento anterior. Estas diferencias entre experimentos se adjudican al cambio en la fuerza iónica de trabajo, como se comentó anteriormente. Se puede ver como tanto para el DomI_{MS} como para el control de la HSA, cuando se utilizó el amortiguador fosfato de sodio 100 mM se obtuvieron constantes de reacción mayores que

cuando se utilizó fosfato de sodio 20 mM. Los datos obtenidos para el DomI_{MS} se resumen en la Tabla 5.2.

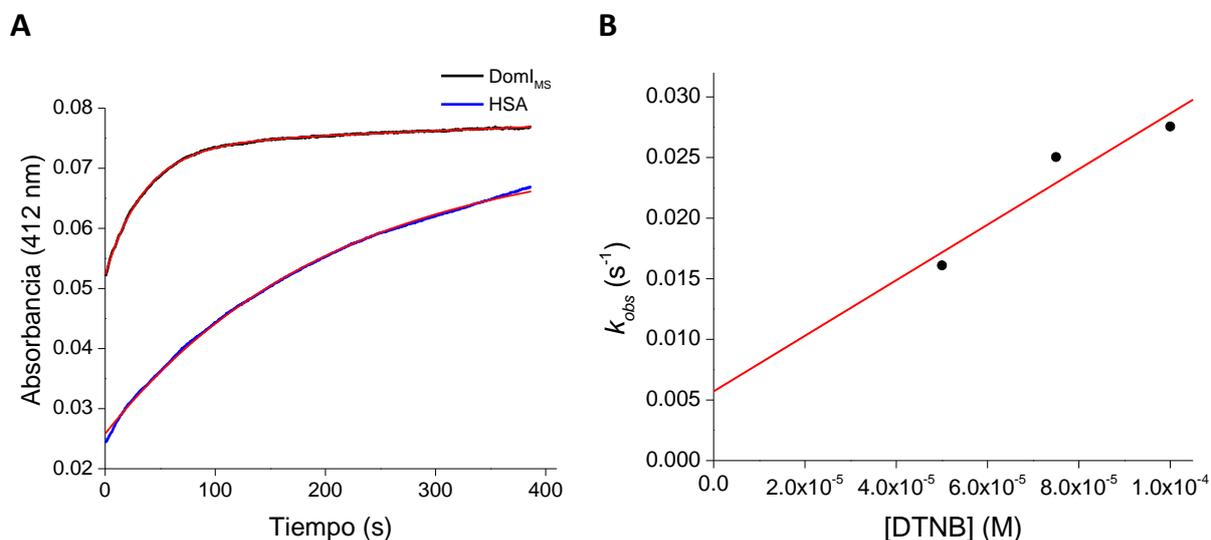


Figura 5.12. Cuantificación de tioles con DTNB y aproximación a la $k_{DomI_{MS}}$. Se incubó DomI_{MS} (44 μ M) con 2-mercaptoetanol (10 mM), toda la noche a 4 °C. Luego se eliminó el exceso de reductor. Se mezcló DomI_{MS} reducido (13 μ M) con DTNB (50, 75 y 100 μ M) y se registró la absorbancia a 412 nm. El experimento se realizó en amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM (A) Curso temporal de la reacción del DomI_{MS} con DTNB (100 μ M) ajustado a una ecuación exponencial más recta. Además se realizó un control de HSA reducida (10 μ M) con DTNB (100 μ M), cuyo curso temporal se ajustó a una exponencial simple. Los ajustes se muestran en rojo. (B) Gráfico secundario de k_{obs} (s⁻¹) vs [DTNB] (M) para el DomI_{MS}. Del ajuste a la recta se obtiene $k_{DomI_{MS}}$.

Tabla 5.2. Relación SH/DomI_{MS} y k_{DomI} obtenidos para las dos condiciones de reducción con 2-mercaptoetanol ensayadas.

Reducción	SH/DomI _{MS}	k_{DomI} (M ⁻¹ s ⁻¹)
30 minutos, temperatura ambiente ^a	0.20	110 (fosfato de sodio 20 mM)
16 h, 4 °C ^b	0.14	229 (fosfato de sodio 100 mM)

^a Se incubó DomI_{MS} 44 μ M con 2-mercaptoetanol 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente. Para la cuantificación se mezcló DomI_{MS} reducido 11.5 μ M con DTNB 50, 100 y 200 μ M. Se utilizó amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.4. ^b Se incubó DomI_{MS} 44 μ M con 2-mercaptoetanol 10 mM toda la noche (16 h) a 4 °C. Para la cuantificación se mezcló DomI_{MS} reducido 13 μ M con DTNB 50, 75 y 100 μ M. Se utilizó amortiguador fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM.

Reportes previos muestran que la k_{HSA} para la proteína deslipidada es de 15.4 M⁻¹ s⁻¹ (20, 53) mientras que para la HSA lipidada es de 100-115 M⁻¹ s⁻¹, dependiendo del ácido graso utilizado y la proporción en la que se lipidó (20). Ambas determinaciones fueron realizadas en fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 con DTPA 0.1 mM. Si se comparan estos

valores con los recién obtenidos para el DomI_{MS} (Tabla 5.2), teniendo en cuenta la concentración del amortiguador, se observa que los últimos son mayores. Esto indica una mayor reactividad del DTNB con el tiol del DomI_{MS} versus el tiol de la HSA. Se proponen las siguientes hipótesis para explicar dicha observación:

Aumento de la exposición del tiol de Cys34 en el DomI_{MS}. Esto implicaría un menor impedimento estérico para el DTNB en solución, lo que aceleraría la reacción con el tiol. Este aumento de exposición puede deberse a un cambio en la estructura terciaria respecto a la HSA, que puede explicarse por varios factores. Por un lado, puede estar determinado por una disminución en el número de interacciones no covalentes que ayudan a estabilizar la estructura, como consecuencia directa de la falta de los DomII y III. De hecho está reportado en experimentos de dicroísmo circular, que hay variaciones en los porcentajes de los distintos tipos de estructura secundaria entre los dominios por separado y la HSA (124). La exposición al solvente de porciones de la proteína que en la HSA están protegidas por los otros dominios, sobre todo tratándose de una proteína monomérica, puede ser causal para que adquiera una conformación y una estabilidad en solución distinta. Por otro lado, es posible que el DomI_{MS} posea ligandos unidos que generen pequeños cambios en la estructura, como se comentó anteriormente en la introducción. Finalmente, la presencia de glicosilaciones también podría influir en el plegamiento (123) y por lo tanto en la reactividad del tiol. En este sentido, se debe destacar que en la secuencia aminoacídica no hay secuencias consenso para N-glicosilación. De hecho la HSA sintetizada por el hígado es la única proteína plasmática no glicosilada. En un gel nativo realizado para HSA_r y HSA comercial por Lucía Turell y Rodrigo Lombide se observó que ambas proteínas migran igual indicando la ausencia de dicha modificación. Asimismo, en el trabajo de Dockal y colaboradores expresan los tres dominios por separado en GS115 y los analizan por espectrometría de masas de MALDI-TOF, isoelectroenfoque y gel filtración analítica, y concluyen que ninguno de los dominios es glicosilado por la levadura (124). De todas maneras, no contamos con evidencia experimental directa sobre la ausencia de glicosilación del DomI_{MS} expresado en este trabajo. *Disminución de las cargas del DomI_{MS} respecto a la HSA.* Dada la homología existente entre los tres dominios de la HSA, el DomI poseerá ~ 1/3 del total de las cargas. De esta manera, la carga neta a pH 7.4 continuará siendo negativa, pero menor que en el caso de la HSA. El DTNB también presentará carga negativa, dado que sus grupos carboxilato están desprotonados. Por lo tanto es razonable pensar que como consecuencia de la disminución de cargas del DomI, la reacción se vea acelerada, como se espera de acuerdo a la teoría del estado de transición en relación al efecto de la fuerza iónica (153).

Reducción de otras cisteínas. Basados en la experiencia de nuestro grupo en el trabajo con HSA y en particular en la reactividad de su único tiol libre, se espera que la cisteína que se redujo sea la Cys34 (137). En el caso que se hubiesen reducido puentes disulfuro y que entonces se tuviese una mezcla de distintas cisteínas reducidas, es de esperar que los registros fuesen más complejos, ajustando a funciones doble o triple exponencial. Además, se podrían obtener relaciones SH/DomI_{MS} mayores que uno. Si bien esto no sucede en nuestros registros (Figuras 5.10 y 5.12), para corroborar que efectivamente solo la Cys34 se reduce con 2-mercaptoetanol, se recurrirá nuevamente a la espectrometría de masa. Esto se retomará más adelante.

Reducción con DTT y cuantificación de tioles con DTNB. Dado que con la reducción con 2-mercaptoetanol se obtienen relaciones SH/DomI_{MS} bajas (0.14-0.20) se decidió explorar la reducción con DTT. Para poner a punto el tiempo de incubación, se mezcló DomI_{MS} con DTT y se dejó en agitación 1 o 2 h a 4 °C. Para cuantificar los tioles se utilizó DomI_{MS} 94 o 53 μM, para 1 y 2 h de incubación, y una sola concentración de DTNB (200 μM). En ambos casos los registros cinéticos resultaron complejos y ajustaron a más de una exponencial. Además, en la incubación de 2 h la relación SH/DomI_{MS} fue mayor a 1 (datos no mostrados). Esto indica la reducción de disulfuros internos del DomI_{MS}. Este comportamiento ya ha sido evidenciado para la HSA (17, 137). Por lo tanto, el DTT no resulta un buen reductor si lo que se busca es reducir únicamente a la Cys34.

Reducción, marcado diferencial y análisis por espectrometría de masa de MALDI-TOF. El objetivo de este ensayo fue corroborar que la única cisteína que se reduce con 2-mercaptoetanol es la Cys34. Con este objetivo, en primer lugar, se redujo el DomI_{MS} con 2-mercaptoetanol (10 mM), toda la noche a 4 °C. Los tioles reducidos de esta manera se bloquearon irreversiblemente con iodoacetamida, otro agente alquilante. Luego se hizo una reducción más fuerte con DTT (2 mM durante 2 h a 37 °C), de manera de reducir los puentes disulfuro del DomI_{MS}. Estos nuevos tioles se bloquearon con ácido iodoacético. Finalmente se tripsinizó la muestra para analizar los fragmentos trípticos. La razón por la que se realizó una segunda reducción es para que el análisis de los espectros resulte más sencillo. Se debe recordar que el DomI tiene 5 enlaces disulfuro y que en un mismo fragmento tríptico pueden encontrarse una o más cisteínas que pueden tener su par en otro péptido contiguo. Esto dificulta en gran medida el análisis de los resultados y las conclusiones que se puedan extraer.

Es importante tener en cuenta para el análisis, que la modificación de un tiol por iodoacetamida (carbamidometilación) o por ácido iodoacético (carboximetilación) genera un aumento de masa de + 57.05 y + 58.03 Da, respectivamente. Por lo tanto para hacer una

asignación de señales confiable y robusta, es necesario tener una buena calibración. Para ello se realizó una calibración interna con señales del propio MS, correspondientes a péptidos que no poseen residuos de cisteína y por lo tanto no están modificados. De esta manera se logró obtener un error de menos de 0.08 Da.

En el MS (Figura 5.13), se obtuvo una cobertura de secuencia del 90%. Nuevamente se observó un péptido de m/z 1149.62 que puede corresponder a los primeros 10 aminoácidos o al péptido de los aminoácidos 42-51. Los últimos 5 aminoácidos no se observaron en el espectro.

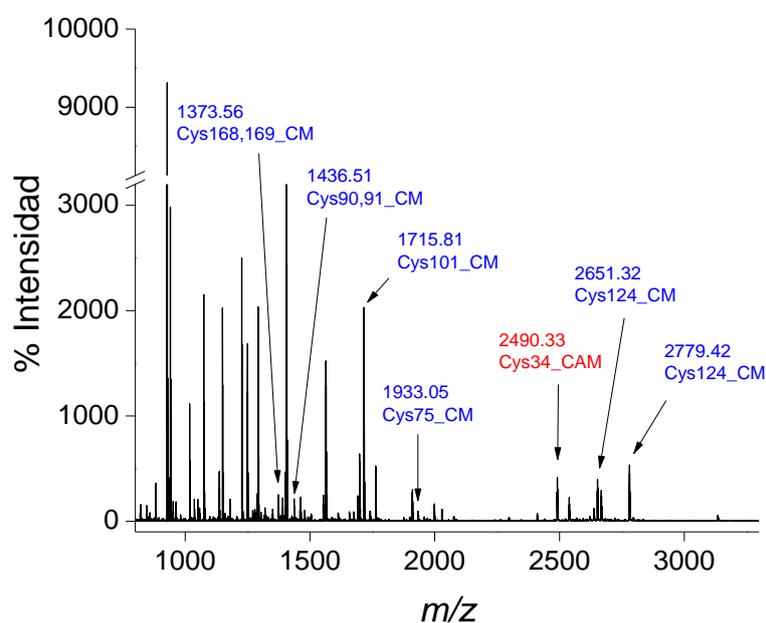


Figura 5.13. Marcado diferencial de cisteínas del DomI_{MS} y análisis por espectrometría de masa de MALDI-TOF. Se redujo el DomI_{MS} con 2-mercaptoetanol (10 mM, toda la noche a 4 °C) y se trató la mezcla con iodoacetamida. Luego se redujo con DTT, se trató con ácido iodoacético y se tripsinizó. La muestra se acidificó y se cargó en la placa junto con la matriz. Se muestra el MS del DomI_{MS} con asignación de péptidos monocargados de cisteínas modificadas. En rojo se destaca el de la Cys34 y en azul los restantes.

En el MS se destaca la señal de $m/z = 2490.33$ que corresponde al péptido de la Cys34 ($m/z_{teórico} = 2433.26$, reducido sin alquilar) carbamidometilado (+ 57.05, $m/z_{teórico} = 2490.31$; destacado en rojo en la Figura 5.13). El patrón de distribución isotópica del péptido (Figura 5.14, panel A) refleja que el marcado es homogéneo, es decir, que no está carboximetilado ($m/z_{teórico} = 2491.29$). El MS/MS que se obtiene al fragmentar el péptido de $m/z = 2490.33$ es consistente con la carbamidometilación de la Cys34 (Figura 5.14, panel B). En particular, la presencia de los iones y_7 e y_8+57 es fundamental para poder realizar esa afirmación.

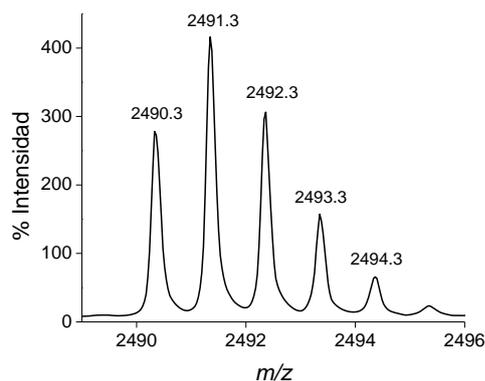
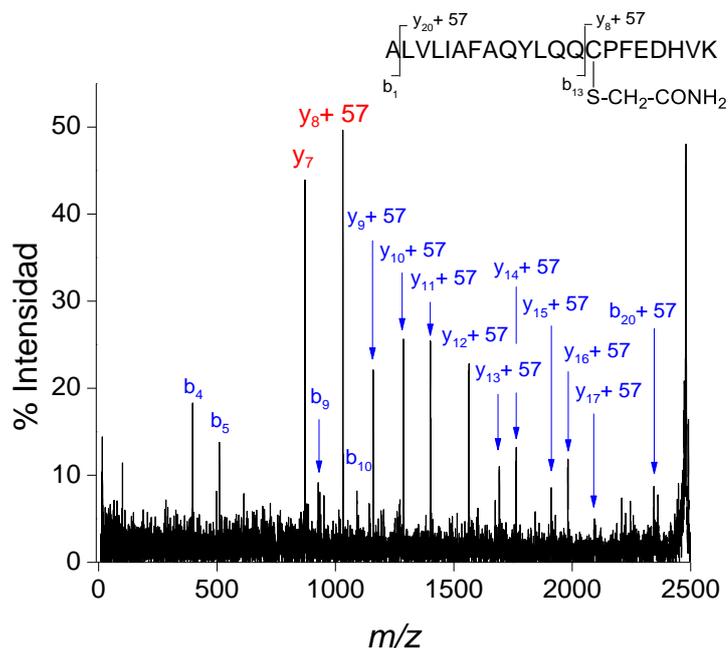
A

Figura 5.14. Marcado diferencial de cisteínas del DomI_{MS} y análisis por espectrometría de masa de MALDI-TOF. (A) Distribución isotópica del péptido de la Cys34 modificado por iodoacetamida. (B) MS/MS del péptido de la Cys34 con iones *b* e *y* asignados. Se destacan en rojo iones claves para determinar la posición de la modificación por iodoacetamida.

B

Dado que la relación SH/DomI_{MS} obtenida mediante la reducción con 2-mercaptoetanol (en iguales condiciones que en este experimento) fue de 0.14, se esperaba encontrar en el MS, al péptido de la Cys34 en otros estados de oxidación. Como se comentó en la introducción, la cisteína en general, puede presentar diferentes modificaciones que generan cambios de masa característicos por los que se los puede identificar por espectrometría de masa. En la Tabla 5.3 se detallan dichas modificaciones.

Tabla 5.3. Posibles modificaciones oxidativas de la cisteína. Se muestra para cada modificación, el cambio de masa y el $m/z_{teórico}$ calculado en base al $m/z_{teórico}$ del péptido de la Cys34 con el tiol reducido ($m/z_{teórico} = 2433.26$).

Nombre	Modificación	Δ masa (Da)	$m/z_{teórico}$
Ácido sulfénico	+ O	+ 16.00	2449.26
Ácido sulfínico	+ 2O	+ 32.00	2465.26
Ácido sulfónico	+ 3O	+ 48.00	2481.26
Sulfenamida	- 2H	- 2.01	2431.25
Sulfinamida	+ 2O, - 2H	+ 13.98	2447.24
Sulfonamida	+ 3O, - 2H	+ 29.98	2463.24
Dehidroalanina	- S, - 2H	- 34.08	2399.18
Disulfuro con 2-mercaptoetanol	+ 4H, + S, + 2C, + O	+ 76.12	2509.38

Sin embargo se constató la ausencia de cualquiera de estas modificaciones tanto en este experimento como en el anterior (“Alquilación reductiva, tripsinización y análisis por espectrometría de masas de MALDI-TOF”), lo cual resulta intrigante. Se consideró incluso la posibilidad de que se hubiese formado un disulfuro mixto entre la Cys34 y el 2-mercaptoetanol durante el tiempo de reducción, pero tampoco se evidenció dicha modificación en el MS. El hecho de no haber encontrado estas señales, sugiere que la Cys34 puede estar modificada covalentemente por otros compuestos de identidad desconocida. Esta modificación además, no sería reducible por 2-mercaptoetanol y DTT, que son los reductores utilizados en este experimento.

En lo que respecta a la modificación de otras cisteínas, se observaron varios péptidos carboximetilados (+ 58.03 Da) (Figura 5.13). Si bien no se cuenta con un MS/MS de cada uno para confirmar la posición de la modificación dentro del péptido, es de esperar que la misma sea en residuos de cisteína que fueron previamente reducidos por el DTT. De todos los péptidos que aparecen modificados por iodoacético, solo uno se identificó como probablemente modificado por iodoacetamida. Se trata de una señal de $m/z = 2666.33$, que puede corresponder al péptido de la Cys124 ($m/z_{teórico} = 2593.24$) carbamidometilado (+ 57.05 Da) y con la metionina oxidada (+ 16 Da). En ese caso se trataría de una doble

modificación y por lo tanto para confirmarla se necesita el MS/MS del péptido correspondiente. Además, si la Cys124 se hubiese reducido con 2-mercaptoetanol y estuviera carbamidometilada, se esperaría encontrar a la cisteína con la que normalmente forma el disulfuro (Cys168) también carbamidometilada. Sin embargo dicha cisteína se observó únicamente caboximetilada, indicando su reducción por DTT y no por 2-mercaptoetanol.

Por último se buscaron nuevamente péptidos que pudieran indicar la presencia del prepéptido en la proteína. Estos péptidos buscados corresponden a los esperados para el pre-DomI tripsinizado, considerando que la enzima se saltee hasta 2 sitios de corte. Se trata de los mismos péptidos que se buscaron en el experimento de alquilación reductiva del DomI_{MS}. Los $m/z_{teórico}$ de los mismos son: 2332.20, 2591.33, 3011.54, 3270.67, 3286.70. Se confirmó la ausencia de dichas señales en el MS lo que apoya una vez más, que la levadura corta el prepéptido antes de la secreción del DomI.

En suma, los resultados obtenidos de los ensayos cinéticos de DomI_{MS} reducido y DTNB, y del presente experimento, apuntan a que tras el tratamiento del DomI_{MS} con 2-mercaptoetanol 10 mM durante toda la noche a 4 °C, se reduce únicamente la Cys34. Queda por dilucidar en qué forma se encuentra el resto de la Cys34 que no se redujo en dichas condiciones.

5.2.2 Dominio I de la secuencia de referencia (DomI_{SR})

Hasta ahora se presentaron resultados obtenidos con el DomI_{MS} cuya construcción se realizó a partir de la secuencia obtenida para la HSAr. Este constructo presentaba dos mutaciones sinónimas en la secuencia codificante del DomI (DomI_{MS}) y fue lo que se utilizó para poner a punto la purificación y reducción de la proteína. En la Tabla 5.4 se detalla la información de cada mutación.

Tabla 5.4. Mutaciones sinónimas presentes en el ADNc del DomI_{MS} y el uso de dichos codones en *P. pastoris*. Las frecuencias fueron tomadas de la página de GenScript®.

Mutación	Cambio en el codón	Frecuencia/1000	Aminoácido en el DomI maduro
T361C	TTG vs. CTG	0.33 vs. 0.16	Leu103
T577C	GCT vs. GCC	0.45 vs. 0.25	Ala175

En el marco de una conversación con una colega, surgió la duda de si esas mutaciones podrían influir de alguna manera en el plegamiento de la proteína. Intrigados por la importancia que pudiesen tener esas mutaciones para la velocidad de traducción y de

plegamiento, y por lo tanto para el plegamiento adoptado por la proteína (154), se decidió comenzar nuevamente con una secuencia sin mutaciones. En el caso del DomI en particular, un plegamiento incorrecto podría implicar una mayor o menor exposición de la Cys34, afectando la reactividad de la misma.

Transformación de GS115. Se obtuvo el plásmido pPICZA conteniendo la secuencia codificante para el pre-DomI_{SR} (GenScript®). Mediante secuenciación, se corroboró que no hubiesen mutaciones u otros errores en la secuencia codificante del DomI_{SR}. Para ello se utilizaron tres cebadores. Dos de ellos, uno directo y uno reverso, hibridan por fuera de la secuencia del DomI (AOX-5' y AOX-3'). El tercero, reverso, hibrida dentro de dicha secuencia (SqR1). Tanto con el cebador AOX-5' como con el AOX-3' se obtuvo la secuencia completa del DomI que coincidió con lo esperado. Luego se transformaron bacterias XL1 de *E. coli* para la propagación del mismo y se realizó la extracción del ADN plasmídico. Posteriormente se linealizó dicho ADN con la enzima de restricción PmeI que posee un solo sitio de corte en la región AOX y no corta en la secuencia codificante para el DomI_{SR}. La linealización se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5.15, panel A). El número de pares de bases esperado para el producto de digestión es de aprox. 3.9 kb si se considera que el tamaño del pPICZA y de la secuencia codificante del DomI_{SR} por separado, es de 3.3 kb y 642 pb, respectivamente. Se concluyó entonces que la migración del producto de linealización en el gel es consistente con el tamaño esperado. En siguiente lugar se purificó el ADN lineal y se obtuvo una concentración de 1075 ng/μL que corresponden a 8.6 μg de ADN.

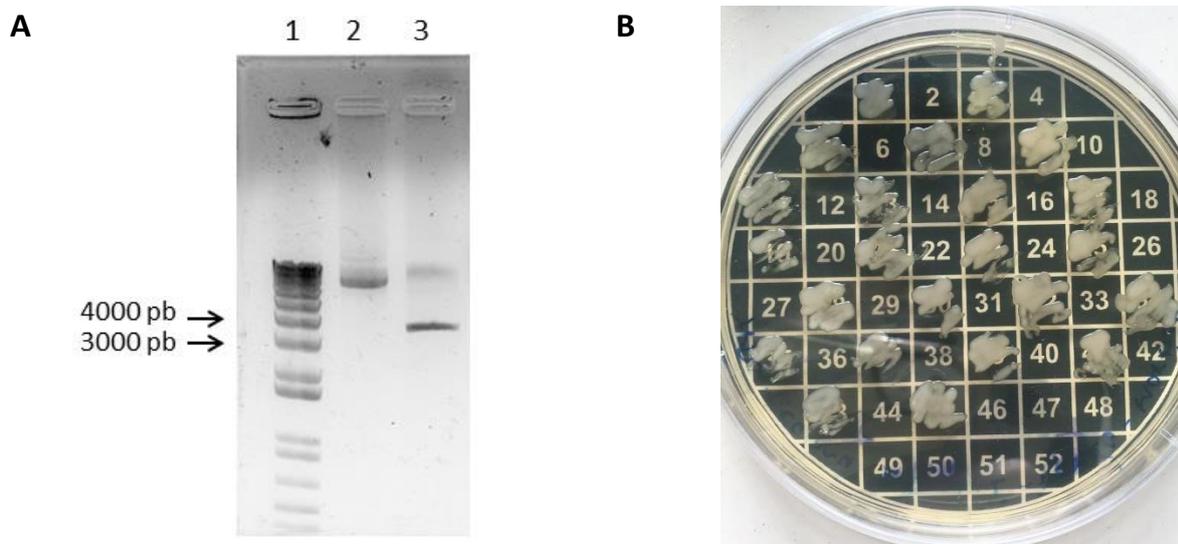


Figura 5.15. Linealización del plásmido y selección de transformantes multicopia (A) Gel de agarosa al 1%. **Carril 1:** MPM 1 kb plus DNA ladder; **2:** vector pPICZA-DomI_{SR} sin digerir; **3:** producto de digestión. (B) Selección de transformantes multicopia. Se plaquearon 23 colonias aisladas en YPDS agar con zeocina 700 μg/mL. Se seleccionaron 5 clones para la preparación de crioinóculos. Estos corresponden a las posiciones 1, 9, 28, 32 y 45.

La totalidad del ADN se utilizó para transformar células GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris* por electroporación. Luego de la transformación se plaquearon diferentes volúmenes de la mezcla en YPDS con zeocina 100 µg/mL, antibiótico al que confiere resistencia el plásmido utilizado. De las colonias que crecieron y que por lo tanto incorporaron el plásmido, se utilizaron 23 para estriar una placa de YPDS con zeocina 700 µg/mL. Como se comentó previamente, *P. pastoris* es capaz de integrar múltiples copias de plásmido a su ADN genómico mediante recombinación homóloga. Por lo tanto se espera que aquellas células que crezcan a altas concentraciones de antibiótico sean las que incorporaron más copias de plásmido. Todas las colonias plaqueadas crecieron en presencia de zeocina 700 µg/mL (Figura 5.15, panel B). Se seleccionaron las 5 que presentaron mayor crecimiento y se prepararon crioinóculos.

Expresión del nuevo DomI_{SR}. Para evaluar la expresión de los clones se crecieron precultivos en YPD a partir de colonias aisladas de cada uno, luego se escalaron los cultivos en medio BMGY y se realizó la inducción en el medio BMMY que posee metanol. Todo el procedimiento se realizó de la misma manera que para la expresión del DomI_{MS}. La expresión se evaluó por SDS-PAGE observándose en todos los casos una banda que aumenta en intensidad conforme transcurre el tiempo de inducción y que además presenta una migración consistente con el tamaño esperado para el DomI (22371.39 Da). En la Figura 5.16, se muestra el resultado para uno de los clones. Para cada clon se realizó espectrometría de masas a partir de la banda del gel y se confirmó que correspondía al DomI.

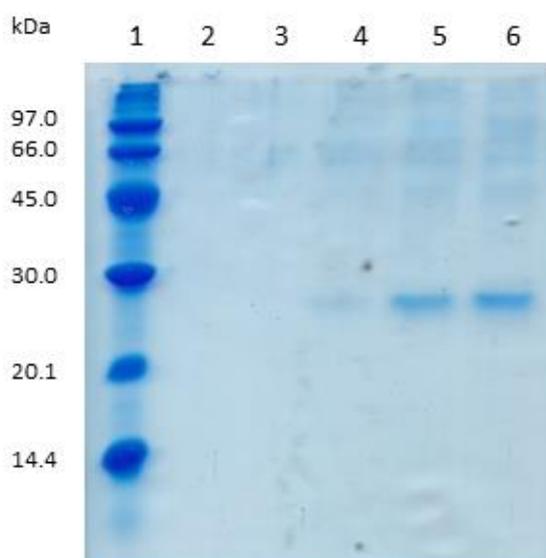


Figura 5.16. Expresión del DomI_{SR}. SDS-PAGE reductor de la expresión de uno de los clones, **carril 1:** MPM; **2-6:** sobrenadantes del medio de cultivo a t = 0, 24, 48, 72 y 96 h de inducción.

Durante la expresión de la proteína se evaluó la presencia de otros microorganismos contaminantes en el medio de cultivo como posibles responsables de la producción del pigmento marrón. Se constató a nivel macroscópico, la ausencia de contaminación por otros microorganismos (datos no mostrados). Esto sumado a que la presencia del pigmento ha sido sistemática y que ha sido reportada en la literatura (147–150), sugiere que *P. pastoris* es el microorganismo responsable de la producción del pigmento.

Purificación. Nuevamente el primer paso de purificación consistió en la centrifugación del cultivo y posterior precipitación del sobrenadante con sulfato de amonio, observándose nuevamente el pigmento marrón. Luego de removido el sulfato de amonio por diálisis, se recurrió a la cromatografía de intercambio catiónico puesta a punto anteriormente.

Cromatografía de intercambio catiónico

Al igual que con el DomI_{MS}, con esta cromatografía se logró eliminar la mayor parte del pigmento así como también proteínas contaminantes (Figura 5.17). Sin embargo, a diferencia de oportunidades anteriores, se observó la presencia de una proteína contaminante con peso molecular mayor a 66 kDa en la fracción purificada (Figura 5.17, panel B, carril 4). Su análisis por espectrometría de masas a partir de la banda del gel indicó que se trataba de una proteína de función desconocida, similar a una familia de proteínas de la cepa GS115 de *P. pastoris* especializada en la unión a esteroides. Para tratar de eliminar dicha contaminación se recurrió a una cromatografía de afinidad.

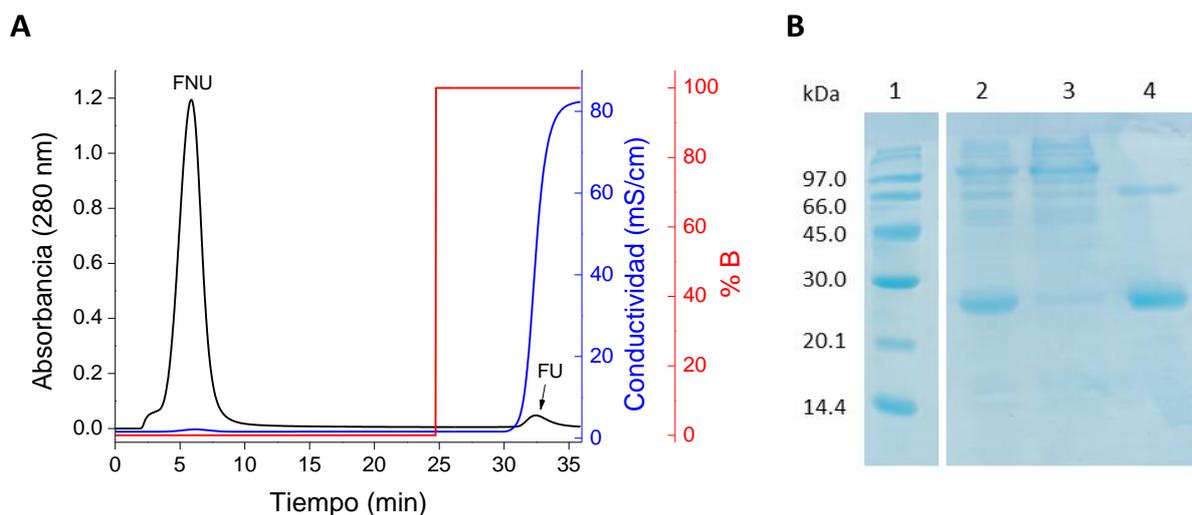


Figura 5.17. Purificación del DomI_{SR} por cromatografía de intercambio catiónico, CM sefarosa. (A) Cromatograma. Amortiguador de inicio acetato de sodio 20 mM pH 5.0; la elución se realizó con un salto en la concentración de NaCl de 0 a 1 M; flujo 3 mL/min. Se destacan la FNU y FU. (B) SDS-PAGE reductor del dializado, siembra y fracciones obtenidas en la cromatografía, **carril 1:** MPM; **2:** dializado; **3:** FNU; **4:** FU.

Cromatografía de afinidad

Para tratar de purificar al DomI_{SR} de la proteína contaminante, se utilizó una resina Blue sepharose derivatizada con grupos Cibacron blue F3G-A, que interaccionan con sitios específicos de la albúmina. Esta resina se utiliza normalmente como método de purificación de HSA plasmática y de HSAr (121, 123, 126). Según lo reportado, la interacción de los grupos cibacrón con la albúmina ocurre a nivel de los bolsillos hidrofóbicos ubicados el subdominio IIA y IIIA (17, 124). Aún así existe un reporte que muestra que el DomI aislado también es capaz de unirse a la resina (124). Dadas las características de los grupos Cibacron blue F3G-A, esta resina puede unir otras proteínas además de albúmina. Por ejemplo, interferón, factores de la coagulación, y enzimas que utilicen NAD⁺ y NADP⁺ como coenzimas.

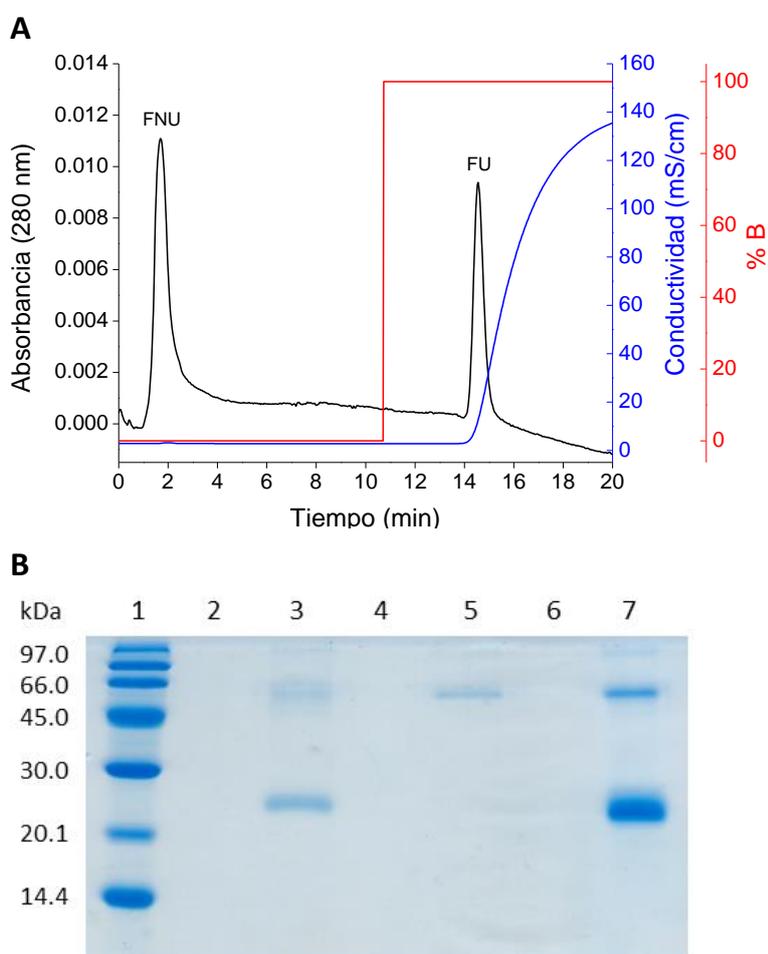


Figura 5.18. Cromatografía de afinidad con resina de Blue sepharose, del DomI_{SR}. (A) Cromatograma. Amortiguador fosfato de sodio 20 mM pH 7.0; la elución se realizó con un salto en la concentración de NaCl de 0 a 2 M; flujo 1 mL/min. Se destacan las fracciones obtenidas, FNU y FU. (B) SDS-PAGE reductor, **carril 1:** MPM; **2:** vacío; **3:** FNU; **4:** vacío; **5:** FU; **6:** vacío; **7:** dializado.

Para la cromatografía se utilizó DomI_{SR} purificado por intercambio catiónico, que además de presentar menos proteínas contaminantes, posee menor cantidad de pigmento. En el cromatograma se puede observar un pico correspondiente a la FNU y otro que eluye al aumentar la fuerza iónica, correspondiente a la FU (Figura 5.18, panel A). Mediante SDS-

PAGE se evidenció que el DomI_{SR} se encontraba principalmente en la FNU mientras que una parte de la proteína contaminante eluye en la FU y otra parte en la FNU (Figura 5.18, panel B). Esto indica que el DomI_{SR} no interacciona con los grupos cistacón, al menos en las condiciones utilizadas en la cromatografía. Si bien el resultado de la cromatografía fue opuesto al esperado, sirvió para aumentar la pureza de la muestra.

Reducción con 2-mercaptoetanol y cuantificación de tioles con DTNB. Para reducir al DomI_{SR} se tomaron como punto de partida los resultados obtenidos para el DomI_{MS}. Por este motivo, la condición de reducción utilizada fue aquella en la que se corroboró mediante registros cinéticos y por espectrometría de masa de MALDI-TOF, que se reducía únicamente la Cys34. Se incubó entonces, DomI_{SR} con 2-mercaptoetanol (10 mM), toda la noche a 4 °C. A continuación se eliminó el exceso de reductor mediante gel filtración. Para la cuantificación de tioles se mezcló DomI_{SR} reducido (16.5 μM) con DTNB (100 μM) y se siguió absorbancia a 412 nm.

Si se considera el cambio de absorbancia a lo largo de todo el registro temporal, se obtiene una relación SH/DomI_{SR} de 1.15, lo que podría indicar que se produjo la reducción de disulfuros internos o que no había logrado eliminarse todo el 2-mercaptoetanol. Por otro lado, el curso temporal de la reacción ajusta a una función doble exponencial más recta de la que se obtienen dos k_{obs} (k_{obs1} y k_{obs2}), dos amplitudes (amp_1 y amp_2) y una pendiente (Figura 5.19). La k_{obs1} corresponde al proceso más rápido y dividiendo entre la concentración de DTNB se obtiene una k_1 de $1097 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta fase tiene una amp_1 pequeña (0.047), de hecho se puede observar que no hay registro de los primeros segundos. En cambio, para el segundo proceso, del cual se tiene un registro más completo, se puede calcular una k_2 de $253 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Esta es similar a la observada para el DomI_{MS} en este mismo amortiguador lo que sugiere, teniendo en cuenta que se trata de una primera aproximación, que k_2 corresponde a la reacción de la Cys34 con DTNB. Además, si se calcula la relación SH/DomI_{SR} a partir de la amp_2 (0.14), se obtiene un valor de 0.45 que sería consistente con la reducción únicamente de dicha cisteína.

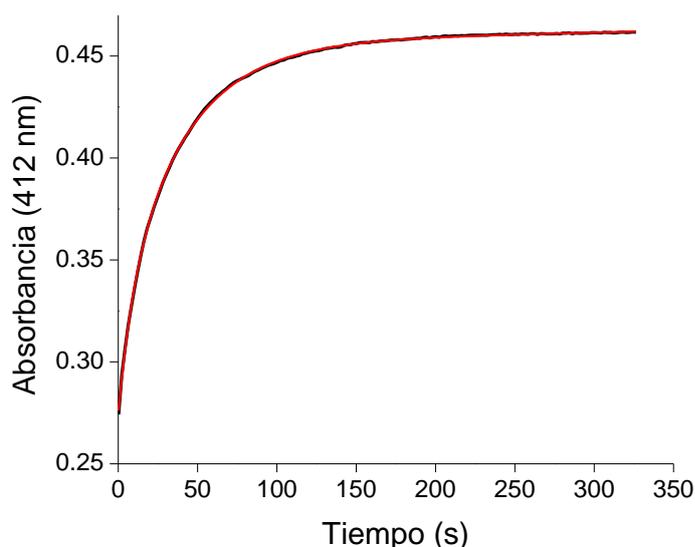


Figura 5.19. Cuantificación de tioles con DTNB. Se incubó DomI_{SR} (43 μ M) con 2-mercaptoetanol (10 mM), toda la noche a 4 °C. Luego se eliminó el exceso de reductor. Se mezcló DomI_{SR} reducido (21.5 μ M) con DTNB (100 μ M) en amortiguador fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 con DTPA 0.1 mM, y se registró la absorbancia a 412 nm. Se muestra el curso temporal de dicha reacción ajustado a una ecuación doble exponencial más recta. El ajuste se muestra en rojo.

Por otro lado, por su valor, la k_1 corresponde a un proceso ~ 4 veces más rápido que la reacción de la Cys34 con DTNB. El proceso asociado a esta k_1 podría corresponder a la reducción de disulfuros internos durante el tratamiento con 2-mercaptoetanol 10 mM y la posterior reacción de los tioles formados con DTNB. Alternativamente, la k_1 podría deberse a la reacción de 2-mercaptoetanol remanente con DTNB, pues a pesar que la proteína había sido gel filtrada luego del tratamiento, es posible que hubiera quedado reductor. De hecho, la constante de velocidad entre 2-mercaptoetanol y DTNB, independiente del pH (la que se determinaría si todo el 2-mercaptoetanol estuviera como tiolato), es de $1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (155). Teniendo en cuenta que el pK_a del 2-mercaptoetanol es de 9.6 (156), la constante aparente a pH 7.4 es de $1567 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es comparable al valor de $1097 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ obtenido a partir de nuestro experimento. Por lo tanto, se puede inferir que el reductor no fue eliminado correctamente de la muestra. De los valores de amplitud y de controles con DTNB o DomI_{SR} solos, la concentración de 2-mercaptoetanol remanente se estima en 14 μ M, o sea 0.14% del existente antes de la gel filtración.

En suma, este experimento sugiere que el DomI_{SR} reacciona de manera similar con DTNB y que por lo tanto no habría diferencias estructurales significativas en el entorno de la Cys34.

Reducción, marcado diferencial y análisis por espectrometría de masa de MALDI-TOF. El objetivo de este ensayo de reducción y marcado diferencial de cisteínas era evidenciar qué cisteínas se reducían mediante el tratamiento con 2-mercaptoetanol 10 mM durante toda la noche a 4 °C. Para ello, el procedimiento fue el mismo que el utilizado con el DomI_{MS}. Luego de reducir con 2-mercaptoetanol se trató con iodoacetamida para alquilar los tioles, se incubó con DTT para reducir todos los disulfuros que no se hubiesen reducido

anteriormente y se trató con ácido iodoacético. Finalmente se tripsinizó la proteína y se analizó por espectrometría de masa de MALDI-TOF.

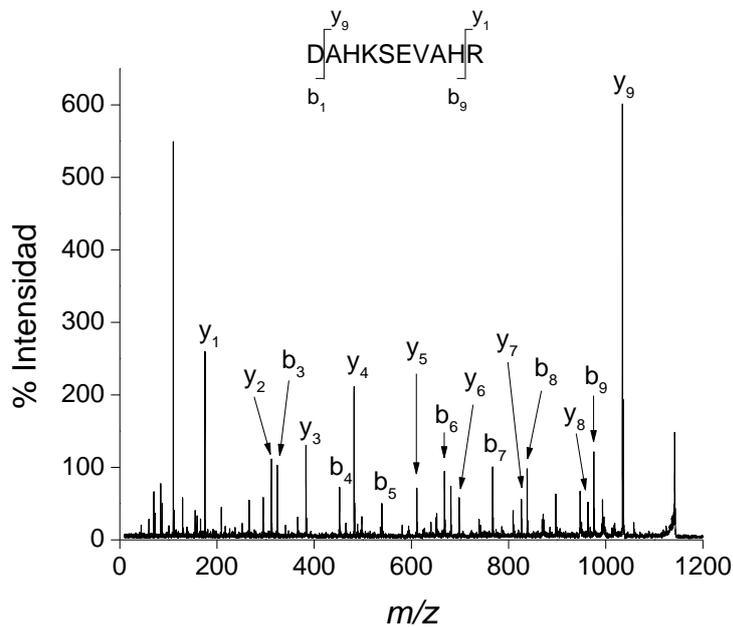


Figura 5.20. Espectrometría de masa del DomI_{SR}. Se muestra el MS/MS del péptido de m/z 1149.57 correspondiente a los 10 primeros aminoácidos de la proteína. Se destacan en el espectro todos los iones **b** e **y** observados.

Algunas dificultades técnicas que incluyeron la poca cantidad de proteína utilizada no permitieron obtener un buen espectro de masa. No obstante, en los espectros obtenidos se destaca la presencia de una señal de m/z 1149.57 cuyo MS/MS corresponde al patrón de fragmentación del péptido amino terminal (Figura 5.20). Se trata de los primeros 10 aminoácidos de la proteína y muestra claramente la ausencia del prepéptido.

Como conclusión de esta parte, se destaca la confirmación de péptido amino terminal del DomI maduro, indicando una vez más la ausencia del prepéptido. En lo que respecta a la evaluación de la reducción de las cisteínas del DomI_{SR} mediante incubación con 2-mercaptoetanol (toda la noche a 4 °C), se debe repetir el experimento ya que debido a distintas complicaciones no se logró obtener un buen MS. Una posible mejora consistiría en aumentar la cantidad de proteína de manera de obtener señales menos ruidosas y más intensas.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Dentro de los objetivos propuestos en este trabajo, se han logrado avances a nivel del análisis de muestras por cromatoenfoco así como también de la expresión, purificación y caracterización del DomI.

Se analizó plasma de donantes sanos por cromatoenfoco. Para ello se establecieron las condiciones de preparación de la muestra y luego se puso a punto la cantidad de HSA a inyectar para tener una buena separación de picos. El siguiente paso será el análisis de muestras de plasma de personas sépticas y su comparación con muestras de personas sanas. Debido a varias dificultades que se presentaron en el desarrollo de esta parte del trabajo, que incluyeron la rotura del detector de fluorescencia, se decidió no continuar este análisis en el marco de esta maestría y avanzar por lo tanto con la expresión, purificación y caracterización del DomI. Actualmente nos encontramos en condiciones de retomar el cromatoenfoco para abordar dicho análisis de plasma de personas con sepsis. En este sentido, evaluaremos la posibilidad de realizar un tratamiento de plasma con HgCl_2 , previo a la inyección en la columna, para poder cuantificar más isoformas.

En cuanto al segundo objetivo, se logró expresar el DomI en *P. pastoris* a partir de la secuencia del DomI con dos mutaciones sinónimas (DomI_{MS}). También se expresó el DomI utilizando una secuencia codificante sin mutaciones, generada a partir de la secuencia de referencia de la HSA (DomI_{SR}). Ambos DomI se expresaron y secretaron correctamente hacia el medio de cultivo, y mostraron la presencia de un pigmento marrón.

Respecto a la purificación se evaluaron varias condiciones. En todos los casos el primer paso implicó la precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante del cultivo. A continuación se evaluaron varias cromatografías, obteniéndose resultados satisfactorios con una cromatografía de intercambio catiónico a pH 5.0 y elución con NaCl 1M. La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Se realizó además un control de calidad del DomI_{MS} purificado, por espectrometría de masa, obteniéndose una buena cobertura de secuencia y confirmando en primera instancia la capacidad de la Cys34 de reducirse en condiciones de alquilación reductiva. El hecho de que el tiol no estuviese irreversiblemente oxidado fue un hallazgo importante para este trabajo. Se logró reducir la Cys34 utilizando 2-mercaptoetanol 10 mM y se determinó la constante de reacción con DTNB. Por espectrometría de masa se confirmó que la Cys34 fuera la única cisteína reducida en dichas condiciones.

En lo que respecta al trabajo con el DomI_{SR}, se transformaron con éxito células de la cepa GS115 His⁻ Mut⁺ de *P. pastoris*. Se seleccionaron los transformantes multicopia y se logró expresar el DomI_{SR} en más de un clon. La proteína se purificó y se cuantificó según lo puesto a punto con el DomI_{MS}, incluyendo un paso de purificación adicional por cromatografía de afinidad. A futuro se evaluará la necesidad de realizar esta cromatografía de afinidad o de incluir un paso de exclusión molecular como etapa final de la purificación. Finalmente, se realizó el primer ensayo de reducción con 2-mercaptoetanol, buscando reducir selectivamente a la Cys34. El resultado del mismo sugiere que la Cys34 del DomI_{SR} se reduce en dichas condiciones (2-mercaptoetanol 10 mM, toda la noche a 4 °C) y reacciona con DTNB de manera similar a la de DomI_{MS}, lo cual indicaría que no hay diferencias estructurales significativas en el entorno de la Cys34 entre el DomI_{MS} y el DomI_{SR}. Próximamente se repetirá el ensayo de reducción y el de espectrometría de masa del DomI_{SR} para tener resultados más robustos respecto a la selectividad de la reducción con 2-mercaptoetanol y en cuanto a la reactividad de la Cys34 con DTNB.

Los valores obtenidos para la constante de reacción con DTNB ($229 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el DomI_{MS} y $253 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para el DomI_{SR}) resultaron ~ 15 veces mayores que el obtenido para la HSA en esas mismas condiciones ($15.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Esto sugiere una mayor reactividad de la Cys34 en el contexto del DomI que en el contexto de la proteína entera. Resta evaluar mediante estudios estructurales como dicroísmo circular, la conformación de la proteína y compararla con la del DomI en la HSA. Incluso se prevé hacer un análisis del estado oligomérico del DomI producido mediante, por ejemplo, cromatografía de exclusión molecular analítica.

En suma, se ha avanzado respecto a los objetivos propuestos para el presente trabajo si bien se han presentado en el camino, distintas complicaciones. Esperamos poder seguir trabajando, tanto en el análisis de muestras de plasma como en la caracterización del DomI de la HSA y sus derivados oxidados, para así continuar caracterizando las propiedades estructurales y la reactividad de este tiol, que es el más abundante en el plasma.

7 REFERENCIAS

1. Hansen, J. M., Go, Y.-M., and Jones, D. P. (2006) Nuclear and Mitochondrial Compartmentation of Oxidative Stress and Redox Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **46**, 215–234
2. Sies, H. (1985) *Oxidative Stress*, Academic Press
3. Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286
4. Parvez, S., Long, M. J. C., Poganik, J. R., and Aye, Y. (2018) Redox Signaling by Reactive Electrophiles and Oxidants. *Chem. Rev.* **118**, 8798–8888
5. Gupta, V., and Carroll, K. S. (2014) Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta*. **1840**, 847–875
6. Roos, G., and Messens, J. (2011) Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 314–326
7. Keire, D. A., Strauss, E., Guo, W., Noszal, B., and Rabenstein, D. L. (1992) Kinetics and equilibria of thiol/disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione. *J. Org. Chem.* **57**, 123–127
8. Go, Y.-M., Chandler, J. D., and Jones, D. P. (2015) The cysteine proteome. *Free Radic. Biol. Med.* **84**, 227–245
9. Marino, S. M., and Gladyshev, V. N. (2010) Cysteine function governs its conservation and degeneration and restricts its utilization on protein surfaces. *J. Mol. Biol.* **404**, 902–916
10. Fomenko, D. E., Marino, S. M., and Gladyshev, V. N. (2008) Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. *Mol. Cells*. **26**, 228–235
11. Miseta, A., and Csutora, P. (2000) Relationship Between the Occurrence of Cysteine in Proteins and the Complexity of Organisms. *Mol Biol Evol.* **17**, 1232–1239
12. Trujillo, M., Alvarez, B., and Radi, R. (2016) One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. *Free Radic. Res.* **50**, 150–171
13. Turell, L., Radi, R., and Alvarez, B. (2013) The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 244–253
14. Devarie-Baez, N. O., Silva Lopez, E. I., and Furdui, C. M. (2016) Biological chemistry and functionality of protein sulfenic acids and related thiol modifications. *Free Radic. Res.* **50**, 172–194

15. Ashby, M. T., and Nagy, P. (2007) Revisiting a proposed kinetic model for the reaction of cysteine and hydrogen peroxide via cysteine sulfenic acid. *International Journal of Chemical Kinetics*. **39**, 32–38
16. Luo, D., Smith, S. W., and Anderson, B. D. (2005) Kinetics and Mechanism of the Reaction of Cysteine and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **94**, 304–316
17. T. Peters (1995) *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press
18. Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., and Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **12**, 439–446
19. Ascenzi, P., and Fasano, M. (2010) Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys. Chem.* **148**, 16–22
20. Torres, M. J., Turell, L., Botti, H., Antmann, L., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Radi, R., and Alvarez, B. (2012) Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **521**, 102–110
21. Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Méndez, E., Alvarez, B., and Coitiño, E. L. (2017) The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. **108**, 952–962
22. Ballmer, P. E., McNurlan, M. A., Milne, E., Heys, S. D., Buchan, V., Calder, A. G., and Garlick, P. J. (1990) Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes. *Am. J. Physiol.* **259**, E797-803
23. Schnitzer, J. E., and Oh, P. (1994) Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* **269**, 6072–6082
24. Iwao, Y., Anraku, M., Yamasaki, K., Kragh-Hansen, U., Kawai, K., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2006) Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1764**, 743–749
25. Bito, R., Hino, S., Baba, A., Tanaka, M., Watabe, H., and Kawabata, H. (2005) Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **289**, C531-542
26. Schnitzer, J. E., Sung, A., Horvat, R., and Bravo, J. (1992) Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. *J. Biol. Chem.* **267**, 24544–24553
27. Simard, J. R., Zunszain, P. A., Ha, C.-E., Yang, J. S., Bhagavan, N. V., Petitpas, I., Curry, S., and Hamilton, J. A. (2005) Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 17958–17963

28. Spector, A. A. (1986) [17] Structure and lipid binding properties of serum albumin. in *Methods in Enzymology*, pp. 320–339, Plasma Lipoproteins Part A: Preparation, Structure, and Molecular Biology, Academic Press, **128**, 320–339
29. Ashbrook, J. D., Spector, A. A., Santos, E. C., and Fletcher, J. E. (1975) Long chain fatty acid binding to human plasma albumin. *J. Biol. Chem.* **250**, 2333–2338
30. Curry, S., Brick, P., and Franks, N. P. (1999) Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* **1441**, 131–140
31. Bhattacharya, A. A., Grüne, T., and Curry, S. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin¹¹Edited by R. Huber. *Journal of Molecular Biology.* **303**, 721–732
32. Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., and Ascenzi, P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol. Aspects Med.* **33**, 209–290
33. Coverdale, J. P. C., Katundu, K. G. H., Sobczak, A. I. S., Arya, S., Blindauer, C. A., and Stewart, A. J. (2018) Ischemia-modified albumin: Crosstalk between fatty acid and cobalt binding. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **135**, 147–157
34. Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., and Curry, S. (2005) Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52
35. Gundry, R. L., Fu, Q., Jelinek, C. A., Van Eyk, J. E., and Cotter, R. J. (2007) Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl.* **1**, 73–88
36. Liu, Z., Li, S., Wang, H., Tang, M., Zhou, M., Yu, J., Bai, S., Li, P., Zhou, J., and Xie, P. (2017) Proteomic and network analysis of human serum albuminome by integrated use of quick crosslinking and two-step precipitation. *Sci Rep.* 10.1038/s41598-017-09563-w
37. Taverna, M., Marie, A.-L., Mira, J.-P., and Guidet, B. (2013) Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* **3**, 4
38. Haynes, G. R., Navickis, R. J., and Wilkes, M. M. (2003) Albumin administration--what is the evidence of clinical benefit? A systematic review of randomized controlled trials. *Eur J Anaesthesiol.* **20**, 771–793
39. Mendez, C. M., McClain, C. J., and Marsano, L. S. (2005) Albumin Therapy in Clinical Practice. *Nutr Clin Pract.* **20**, 314–320
40. Caraceni, P., Domenicali, M., Tovoli, A., Napoli, L., Ricci, C. S., Tufoni, M., and Bernardi, M. (2013) Clinical indications for the albumin use: Still a controversial issue. *European Journal of Internal Medicine.* **24**, 721–728
41. Sleep, D. (2015) Albumin and its application in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* **12**, 793–812

42. Elsadek, B., and Kratz, F. (2012) Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release*. **157**, 4–28
43. Merlot, A. M., Sahni, S., Lane, D. J. R., Fordham, A. M., Pantarat, N., Hibbs, D. E., Richardson, V., Doddareddy, M. R., Ong, J. A., Huang, M. L. H., Richardson, D. R., and Kalinowski, D. S. (2015) Potentiating the cellular targeting and anti-tumor activity of Dp44mT via binding to human serum albumin: two saturable mechanisms of Dp44mT uptake by cells. *Oncotarget*
44. Langiu, M., Dadparvar, M., Kreuter, J., and Ruonala, M. O. (2014) Human serum albumin-based nanoparticle-mediated in vitro gene delivery. *PLoS ONE*. **9**, e107603
45. Sepehri, N., Rouhani, H., Ghanbarpour, A. R., Gharghabi, M., Tavassolian, F., Amini, M., Ostad, S. N., Ghahremani, M. H., and Dinarvand, R. (2014) Human serum albumin conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38) for cancer treatment. *Biomed Res Int*. **2014**, 963507
46. Nicolì, E., Syga, M. I., Bosetti, M., and Shastri, V. P. (2015) Enhanced Gene Silencing through Human Serum Albumin-Mediated Delivery of Polyethylenimine-siRNA Polyplexes. *PLoS ONE*. **10**, e0122581
47. Bar-Or, D., Lau, E., and Winkler, J. V. (2000) A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med*. **19**, 311–315
48. Stewart, A. J., Blindauer, C. A., Berezenko, S., Sleep, D., Tooth, D., and Sadler, P. J. (2005) Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J*. **272**, 353–362
49. Lewis, S. D., Misra, D. C., and Shafer, J. A. (1980) Determination of interactive thiol ionizations in bovine serum albumin, glutathione, and other thiols by potentiometric difference titration. *Biochemistry*. **19**, 6129–6137
50. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem*. **274**, 842–848
51. Spiga, O., Summa, D., Cirri, S., Bernini, A., Venditti, V., Chiara, M. D., Priora, R., Frosali, S., Margaritis, A., Giuseppe, D. D., Simplicio, P. D., and Niccolai, N. (2011) A structurally driven analysis of thiol reactivity in mammalian albumins. *Biopolymers*. **95**, 278–285
52. Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med*. **27**, 322–328
53. 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
54. Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., and Alvarez, B. (2003) Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*. **42**, 9906–9914
55. Steglich, M. (2015) Puesta a punto de técnicas para la detección de ácido sulfénico en albúmina de plasma. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

56. Turell, L. (2012) Ácido sulfénico en albúmina sérica humana. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Química, PEDECIBA Química, Universidad de la República
57. Oliveira, P. V. S., and Laurindo, F. R. M. (2018) Implications of plasma thiol redox in disease. *Clinical Science*. **132**, 1257–1280
58. Schwenk, J. M., Omenn, G. S., Sun, Z., Campbell, D. S., Baker, M. S., Overall, C. M., Aebersold, R., Moritz, R. L., and Deutsch, E. W. (2017) The Human Plasma Proteome Draft of 2017: Building on the Human Plasma PeptideAtlas from Mass Spectrometry and Complementary Assays. *J Proteome Res*. **16**, 4299–4310
59. Sun, B. B., Maranville, J. C., Peters, J. E., Stacey, D., Staley, J. R., Blackshaw, J., Burgess, S., Jiang, T., Paige, E., Surendran, P., Oliver-Williams, C., Kamat, M. A., Prins, B. P., Wilcox, S. K., Zimmerman, E. S., Chi, A., Bansal, N., Spain, S. L., Wood, A. M., Morrell, N. W., Bradley, J. R., Janjic, N., Roberts, D. J., Ouwehand, W. H., Todd, J. A., Soranzo, N., Suhre, K., Paul, D. S., Fox, C. S., Plenge, R. M., Danesh, J., Runz, H., and Butterworth, A. S. (2018) Genomic atlas of the human plasma proteome. *Nature*. **558**, 73–79
60. Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T. C. S., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B. E., Kelm, M., and Cortese-Krott, M. M. (2017) Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxid. Redox Signal*. **26**, 718–742
61. Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys*. **484**, 146–154
62. Orrico, F., Möller, M. N., Cassina, A., Denicola, A., and Thomson, L. (2018) Kinetic and stoichiometric constraints determine the pathway of H₂O₂ consumption by red blood cells. *Free Radic. Biol. Med*. **121**, 231–239
63. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R., and Alvarez, B. (2009) Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. **877**, 3384–3392
64. Bocedi, A., Cattani, G., Stella, L., Massoud, R., and Ricci, G. (2018) Thiol disulfide exchange reactions in human serum albumin: the apparent paradox of the redox transitions of Cys34. *FEBS J*. **285**, 3225–3237
65. 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
66. Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., and Dalle-Donne, I. (2012) Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases. *Antioxid. Redox Signal*. **17**, 1515–1527
67. Watanabe, H., Imafuku, T., Otagiri, M., and Maruyama, T. (2017) Clinical Implications Associated With the Posttranslational Modification–Induced Functional Impairment of Albumin in Oxidative Stress–Related Diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **106**, 2195–2203

68. Oettl, K., Birner-Gruenberger, R., Spindelboeck, W., Stueger, H. P., Dorn, L., Stadlbauer, V., Putz-Bankuti, C., Krisper, P., Graziadei, I., Vogel, W., Lackner, C., and Stauber, R. E. (2013) Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J. Hepatol.* **59**, 978–983
69. Regazzoni, L., Del Vecchio, L., Altomare, A., Yeum, K.-J., Cusi, D., Locatelli, F., Carini, M., and Aldini, G. (2013) Human serum albumin cysteinylolation is increased in end stage renal disease patients and reduced by hemodialysis: mass spectrometry studies. *Free Radic. Res.* **47**, 172–180
70. Nagumo, K., Tanaka, M., Chuang, V. T. G., Setoyama, H., Watanabe, H., Yamada, N., Kubota, K., Tanaka, M., Matsushita, K., Yoshida, A., Jinnouchi, H., Anraku, M., Kadowaki, D., Ishima, Y., Sasaki, Y., Otagiri, M., and Maruyama, T. (2014) Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS ONE.* **9**, e85216
71. Rosas-Díaz, M., Camarillo-Cadena, M., Hernández-Arana, A., Ramón-Gallegos, E., and Medina-Navarro, R. (2015) Antioxidant capacity and structural changes of human serum albumin from patients in advanced stages of diabetic nephropathy and the effect of the dialysis. *Mol. Cell. Biochem.* **404**, 193–201
72. Naldi, M., Baldassarre, M., Domenicali, M., Giannone, F. A., Bossi, M., Montomoli, J., Sandahl, T. D., Glavind, E., Vilstrup, H., Caraceni, P., and Bertucci, C. (2016) Mass spectrometry characterization of circulating human serum albumin microheterogeneity in patients with alcoholic hepatitis. *J Pharm Biomed Anal.* **122**, 141–147
73. Era, S., Kuwata, K., Imai, H., Nakamura, K., Hayashi, T., and Sogami, M. (1995) Age-related change in redox state of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1247**, 12–16
74. Leto, S., Yiengst, M. J., and Barrows, C. H. (1970) The effect of age and protein deprivation on the sulfhydryl content of serum albumin. *J Gerontol.* **25**, 4–8
75. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Lorenzini, S., Milzani, A., and Rossi, R. (2006) Age-related influence on thiol, disulfide, and protein-mixed disulfide levels in human plasma. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **61**, 1030–1038
76. Musante, L., Bruschi, M., Candiano, G., Petretto, A., Dimasi, N., Del Boccio, P., Urbani, A., Rialdi, G., and Ghiggeri, G. M. (2006) Characterization of oxidation end product of plasma albumin “in vivo.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 668–673
77. Musante, L., Candiano, G., Petretto, A., Bruschi, M., Dimasi, N., Caridi, G., Pavone, B., Del Boccio, P., Galliano, M., Urbani, A., Scolari, F., Vincenti, F., and Ghiggeri, G. M. (2007) Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 799–810
78. Terawaki, H., Yoshimura, K., Hasegawa, T., Matsuyama, Y., Negawa, T., Yamada, K., Matsushima, M., Nakayama, M., Hosoya, T., and Era, S. (2004) Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney Int.* **66**, 1988–1993

79. Suzuki, E., Yasuda, K., Takeda, N., Sakata, S., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., and Miura, K. (1992) Increased oxidized form of human serum albumin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **18**, 153–158
80. Tomida, M., Ishimaru, J. I., Murayama, K., Kajimoto, T., Kurachi, M., Era, S., and Shibata, T. (2004) Intra-articular oxidative state correlated with the pathogenesis of disorders of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg.* **42**, 405–409
81. Hayashi, T., Era, S., Kawai, K., Imai, H., Nakamura, K., Onda, E., and Yoh, M. (2000) Observation for redox state of human serum and aqueous humor albumin from patients with senile cataract. *Pathophysiology.* **6**, 237–243
82. Oettl, K., Stadlbauer, V., Petter, F., Greilberger, J., Putz-Bankuti, C., Hallström, S., Lackner, C., and Stauber, R. E. (2008) Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1782**, 469–473
83. Domenicali, M., Baldassarre, M., Giannone, F. A., Naldi, M., Mastroberto, M., Biselli, M., Laggetta, M., Patrono, D., Bertucci, C., Bernardi, M., and Caraceni, P. (2014) Posttranscriptional changes of serum albumin: clinical and prognostic significance in hospitalized patients with cirrhosis. *Hepatology.* **60**, 1851–1860
84. Imai, H., Hayashi, T., Negawa, T., Nakamura, K., Tomida, M., Koda, K., Tajima, T., Koda, Y., Suda, K., and Era, S. (2002) Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Jpn. J. Physiol.* **52**, 135–140
85. Bar-Or, D., Heyborne, K. D., Bar-Or, R., Rael, L. T., Winkler, J. V., and Navot, D. (2005) Cysteinylolation of maternal plasma albumin and its association with intrauterine growth restriction. *Prenat. Diagn.* **25**, 245–249
86. Mera, K., Anraku, M., Kitamura, K., Nakajou, K., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2005) The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1322–1328
87. Hayakawa, A., Kuwata, K., Era, S., Sogami, M., Shimonaka, H., Yamamoto, M., Dohi, S., and Hirose, H. (1997) Alteration of redox state of human serum albumin in patients under anesthesia and invasive surgery. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **698**, 27–33
88. Sogami, M., Nagoka, S., Era, S., Honda, M., and Noguchi, K. (1984) Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pept. Protein Res.* **24**, 96–103
89. Sogami, M., Era, S., Nagaoka, S., Kuwata, K., Kida, K., Miura, K., Inouye, H., Suzuki, E., Hayano, S., and Sawada, S. (1985) HPLC-studies on nonmercapt-mercapt conversion of human serum albumin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **25**, 398–402
90. Era, S., Hamaguchi, T., Sogami, M., Kuwata, K., Suzuki, E., Miura, K., Kawai, K., Kitazawa, Y., Okabe, H., and Noma, A. (1988) Further studies on the resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pept. Protein Res.* **31**, 435–442

91. Soejima, A., Matsuzawa, N., Hayashi, T., Kimura, R., Ootsuka, T., Fukuoka, K., Yamada, A., Nagasawa, T., and Era, S. (2004) Alteration of redox state of human serum albumin before and after hemodialysis. *Blood Purif.* **22**, 525–529
92. Kice, J. L. (1981) Mechanisms and Reactivity in Reactions of Organic Oxyacids of Sulfur and their Anhydrides. in *Advances in Physical Organic Chemistry* (Bethell, V. G. and D. ed), pp. 65–181, Academic Press, **17**, 65–181
93. Deambrosi, M (2015) Puesta a punto de una técnica de cromatoenfoco para el análisis por HPLC de albúmina oxidada. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
94. Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66
95. Juturu, V., and Wu, J. C. (2018) Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *Chembiochem.* **19**, 7–21
96. Schutter, K. D., Lin, Y.-C., Tiels, P., Hecke, A. V., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouzé, P., Peer, Y. V. de, and Callewaert, N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology.* **27**, 561–566
97. Küberl, A., Schneider, J., Thallinger, G. G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., Jaenicke, S., Brinkrolf, K., Goesmann, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Schwab, H., Glieder, A., and Pichler, H. (2011) High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal of Biotechnology.* **154**, 312–320
98. Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., Kleinheinz, M., Sauer, M., Altmann, F., and Gasser, B. (2009) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories.* **8**, 29
99. Couderc, R., and Baratti, J. (1980) Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agricultural and Biological Chemistry.* **44**, 2279–2289
100. Giuseppin, M. L., Van Eijk, H. M., and Bes, B. C. (1988) Molecular regulation of methanol oxidase activity in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 577–583
101. Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 23–52
102. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **98**, 5301–5317
103. Invitrogen. EasySelect *Pichia* Expression Kit. Product Information (2010)
104. Lee, C. C., Williams, T. G., Wong, D. W. S., and Robertson, G. H. (2005) An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. *Plasmid.* **54**, 80–85

105. Uchima, C. A., and Arioka, M. (2012) Expression and One-Step Purification of Recombinant Proteins Using an Alternative Episomal Vector for the Expression of N-Tagged Heterologous Proteins in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **76**, 368–371
106. Nakamura, Y., Nishi, T., Noguchi, R., Ito, Y., Watanabe, T., Nishiyama, T., Aikawa, S., Hasunuma, T., Ishii, J., Okubo, Y., and Kondo, A. (2018) A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pichia pastoris* Centromeric DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.02882-17
107. Camattari, A., Goh, A., Yip, L. Y., Tan, A. H. M., Ng, S. W., Tran, A., Liu, G., Liachko, I., Dunham, M. J., and Rancati, G. (2016) Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications. *Microb. Cell Fact.* **15**, 139
108. Erstad, B. L. (1996) Viral infectivity of albumin and plasma protein fraction. *Pharmacotherapy*. **16**, 996–1001
109. Chamberland, M. E., Alter, H. J., Busch, M. P., Nemo, G., and Ricketts, M. (2001) Emerging infectious disease issues in blood safety. *Emerging Infect. Dis.* **7**, 552–553
110. Lawn, R. M., Adelman, J., Bock, S. C., Franke, A. E., Houck, C. M., Najarian, R. C., Seeburg, P. H., and Wion, K. L. (1981) The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6103–6114
111. Latta, M., Knapp, M., Sarmientos, P., Bréfort, G., Becquart, J., Guerrier, L., Jung, G., and Mayaux, J.-F. (1987) Synthesis and Purification of Mature Human Serum Albumin from *E. Coli*. *Nature Biotechnology*. **5**, 1309–1314
112. Sharma, A., and Chaudhuri, T. K. (2017) Revisiting *Escherichia coli* as microbial factory for enhanced production of human serum albumin. *Microb. Cell Fact.* **16**, 173
113. He, Y., Ning, T., Xie, T., Qiu, Q., Zhang, L., Sun, Y., Jiang, D., Fu, K., Yin, F., Zhang, W., Shen, L., Wang, H., Li, J., Lin, Q., Sun, Y., Li, H., Zhu, Y., and Yang, D. (2011) Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 19078–19083
114. Sun, Q.-Y., Ding, L.-W., Lomonosoff, G. P., Sun, Y.-B., Luo, M., Li, C.-Q., Jiang, L., and Xu, Z.-F. (2011) Improved expression and purification of recombinant human serum albumin from transgenic tobacco suspension culture. *Journal of Biotechnology*. **155**, 164–172
115. Wu, X., Lin, Y., Xiong, F., Zhou, Y., Yu, F., Deng, J., Huang, P., and Chen, H. (2012) The extremely high level expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Res.* **21**, 1359–1366
116. Luo, Y., Wang, Y., Liu, J., Lan, H., Shao, M., Yu, Y., Quan, F., and Zhang, Y. (2015) Production of transgenic cattle highly expressing human serum albumin in milk by ϕ C31 integrase-mediated gene delivery. *Transgenic Res.* **24**, 875–883

117. Qian, Q., You, Z., Ye, L., Che, J., Wang, Y., Wang, S., and Zhong, B. (2018) High-efficiency production of human serum albumin in the posterior silk glands of transgenic silkworms, *Bombyx mori* L. *PLoS ONE*. **13**, e0191507
118. Sleep, D., Belfield, G. P., and Goodey, A. R. (1990) The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. *Biotechnology (N.Y.)*. **8**, 42–46
119. Kang, H.-A., Jung, M.-S., Hong, W.-K., Sohn, J.-H., Choi, E.-S., and Rhee, S.-K. (1998) Expression and Secretion of Human Serum Albumin in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **8**, 42–48
120. Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., and Ohmura, T. (2000) High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **89**, 55–61
121. Zhu, W., Gong, G., Pan, J., Han, S., Zhang, W., Hu, Y., and Xie, L. (2018) High level expression and purification of recombinant human serum albumin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. **147**, 61–68
122. Bobik, T. V., Vorob'ev, I. I., Ponomarenko, N. A., Gabibov, A. G., and Miroshnikov, A. I. (2008) Expression of human serum albumin in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its structural and functional analysis. *Russ J Bioorg Chem*. **34**, 49–55
123. Mallem, M., Warburton, S., Li, F., Shandil, I., Nysten, A., Kim, S., Jiang, Y., Meehl, M., d'Anjou, M., Stadheim, T. A., and Choi, B.-K. (2014) Maximizing recombinant human serum albumin production in a Muts *Pichia pastoris* strain. *Biotechnology Progress*. **30**, 1488–1496
124. Dockal, M., Carter, D. C., and Rüker, F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J. Biol. Chem*. **274**, 29303–29310
125. Ohtani, W., Nawa, Y., Takeshima, K., Kamuro, H., Kobayashi, K., and Ohmura, T. (1998) Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal. Biochem*. **256**, 56–62
126. Watanabe, H., Yamasaki, K., Kragh-Hansen, U., Tanase, S., Harada, K., Suenaga, A., and Otagiri, M. (2001) In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm. Res*. **18**, 1775–1781
127. Ikegaya, K., Hirose, M., Ohmura, T., and Nokihara, K. (1997) Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal. Chem*. **69**, 1986–1991
128. Kobayashi, K. (2006) Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals*. **34**, 55–59

129. Kasahara, A., Kita, K., Tomita, E., Toyota, J., Imai, Y., and Kumada, H. (2008) Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study. *J. Gastroenterol.* **43**, 464–472
130. Ohnishi, K., Kawaguchi, A., Nakajima, S., Mori, H., and Ueshima, T. (2008) A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis. *J Clin Pharmacol.* **48**, 203–208
131. Osborn, B. L., Sekut, L., Corcoran, M., Poortman, C., Sturm, B., Chen, G., Mather, D., Lin, H. L., and Parry, T. J. (2002) Albutropin: a growth hormone–albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *European Journal of Pharmacology.* **456**, 149–158
132. Yao, Z., Dai, W., Perry, J., Brechbiel, M. W., and Sung, C. (2004) Effect of albumin fusion on the biodistribution of interleukin-2. *Cancer Immunol. Immunother.* **53**, 404–410
133. Dou, W.-F., Lei, J.-Y., Zhang, L.-F., Xu, Z.-H., Chen, Y., and Jin, J. (2008) Expression, purification, and characterization of recombinant human serum albumin fusion protein with two human glucagon-like peptide-1 mutants in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification.* **61**, 45–49
134. Matsushita, S., Isima, Y., Chuang, V. T. G., Watanabe, H., Tanase, S., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2004) Functional Analysis of Recombinant Human Serum Albumin Domains for Pharmaceutical Applications. *Pharm Res.* **21**, 1924–1932
135. Lombide, R. (2014) Expresión de albúmina sérica humana recombinante en *Pichia pastoris*. Tesina de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República
136. Chen, R. F. (1967) Removal of Fatty Acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment. *J. Biol. Chem.* **242**, 173–181
137. Alvarez, B., Carballal, S., Turell, L., and Radi, R. (2010) Formation and reactions of sulfenic acid in human serum albumin. *Meth. Enzymol.* **473**, 117–136
138. Riener, C. K., Kada, G., and Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem.* **373**, 266–276
139. Pinnell, A. E., and Northam, B. E. (1978) New automated dye-binding method for serum albumin determination with bromocresol purple. *Clin. Chem.* **24**, 80–86
140. Joseph Sambrook, E F Fritsch, and Tom Maniatis (2003) *Molecular cloning : a laboratory manual*, [online] <http://b-ok.cc/book/2062441/821f0f> (Accessed November 28, 2018)
141. Cove, D. J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation.* **113**, 51–56
142. Anraku, M., Shintomo, R., Taguchi, K., Kragh-Hansen, U., Kai, T., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2015) Amino acids of importance for the antioxidant activity of human serum albumin as revealed by recombinant mutants and genetic variants. *Life Sciences.* **134**, 36–41

143. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. **150**, 76–85
144. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**, 248–254
145. Conference, A. C. o. C. P. S. o. C. C. M. C. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. **20**, 864–874
146. Levy, M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L., and Ramsay, G. (2003) International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. **31**, 1250–1256
147. Mantzaris, K., Tsolaki, V., and Zakyntinos, E. (2017) Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev*. 10.1155/2017/5985209
148. Moore, B. D., Deere, J., Edrada-Ebel, R., Ingram, A., and van der Walle, C. F. (2010) Isolation of recombinant proteins from culture broth by co-precipitation with an amino acid carrier to form stable dry powders. *Biotechnol. Bioeng*. **106**, 764–773
149. Belew, M., Li, Yan, M., Zhang, Wei, and Caldwell, K. (2008) Purification of Recombinant Human Serum Albumin (rHSA) Produced by Genetically Modified *Pichia Pastoris*. *Separation Science and Technology*. **43**, 3134–3153
150. Li, S., Li, L., Chen, Z., Xue, G., Jiang, L., Zheng, K., Chen, J., Li, R., Yuan, C., and Huang, M. (2018) A novel purification procedure for recombinant human serum albumin expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif*. **149**, 37–42
151. Azadi, S., Sadjady, S. K., Mortazavi, S. A., Naghdi, N., Mahboubi, A., and Solaimanian, R. (2018) Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Res Pharm Sci*. **13**, 222–238
152. Huang, Y.-S., Chen, Z., Chen, Y.-Q., Ma, G.-C., Shan, J.-F., Liu, W., and Zhou, L.-F. (2008) Preparation and characterization of a novel exendin-4 human serum albumin fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Peptide Science*. **14**, 588–595
153. Espenson, James H. (1995) *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, 2nd Ed.
154. Hanson, G., and Collier, J. (2018) Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **19**, 20–30
155. Singh, R., and Whitesides, G. M. (1993) Thiol-disulfide interchange. in *Sulphur-Containing Functional Groups (1993)* (Patai, S., and Rappoport, Z. eds), pp. 633–658, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, UK, 10.1002/9780470034408.ch13

156. Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry*. **53**, 6113–6125

8 ANEXO

Secuencia de ADN del DomI

La misma se diseñó a partir de la secuencia de referencia de la HSA (NM_000477.6 Homo sapiens albumin (ALB), mRNA). Se muestra en celeste la secuencia del prepéptido y en gris el codón de terminación de la transcripción. En verde se resaltan los codones que estaban mutados en la secuencia generada por retrotranscripción del ARN de células HepG2 (DomI_{MS}), y en rojo particularmente la base mutada dentro del codón. En amarillo se resalta el codón que codifica para la Cys34.

```
ATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTTTAGCTCGGCTTATCCGATGCACACAAGAGTGAGGTT
GCTCATCGGTTTAAAGATTTGGGAGAAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTTTGCTCAGTATCTTCA
GCAGTGTCCATTTGAAGATCATGTAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAAACATGTGTTGCTGAT
GAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAATCACTTCATACCCTTTTTGGAGACAAATTATGCACAGTTGCAACTCTTCG
TGAAACCTATGGTGAATGGCTGACTGCTGTGCAAAACAAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACA
CAAAGATGACAACCCAAACCTCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTTGATGTGATGTGCACTGCTTTTCATGAC
AATGAAGAGACATTTTTGAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCCTTACTTTTATGCCCCGGAAC
CCTTTCTTTGCTAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGATAAAGCTGCCTGCCTGT
TGCCAAAGCGATGAACTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAATAA
```

Secuencia de aminoácidos pre-DomI

Se resalta en celeste el prepéptido (18 aa al comienzo) y el amarillo la Cys34.

```
MKWVTFISLLFLFSSAYS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESA
ENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF
LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTGCCAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAK
```

9 AGRADECIMIENTOS

En especial a Lucía, por su dedicación y orientación que han sido fundamentales para realizar este trabajo. Por confiar más que yo en mi capacidad. Junto con Bea me han dado, desde el primer día, apoyo constante y un montón de oportunidades, y están siempre pendientes de que no me falte nada. Gracias a ambas!

A mis compañeros de FQB-ENZ que son lo más y es un placer trabajar con ellos todos los días. Nunca falta quien te ayude o te enseñe algo, o con quien discutir un resultado. En particular a mis amigas que están en todo y me aguantan siempre, a Matías Moller por la ayuda con la purificación del pigmento y a Mariana Bonilla por su colaboración con la obtención del vector de expresión del DomI_{SR}.

A los “vecinos de BMV” por permitirme usar el flujo constantemente para la expresión del DomI. En particular a Lu por su apoyo y compartir conmigo días de escritura. A Madelón Portela y Rosario Durán por permitirme participar de los análisis por espectrometría de masa y por la buena disposición para el trabajo. También a Horacio Botti por su ayuda con los experimentos de HPLC.

En particular le quiero agradecer a mi familia, mi madre, mis hermanos y mi abuela, por participar de todo el proceso siempre dándome su apoyo incondicional aunque no entendieran mucho. También gracias a Agus, que es un gran motivador y me bancó este último año, al igual que mis amigas de facultad que están siempre.

Finalmente, agradecerle a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por la Beca de Maestría, a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por financiar el proyecto de grupos dentro del que se enmarca este trabajo y a PEDECIBA-Química.