

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Subárea Bioquímica
PEDECIBA

**INTERACCIONES ENTRE LA ENZIMA
CISTATIONINA β -SINTASA Y EL
PEROXINITRITO**

Laura Celano Jorcín

Orientadora: Dra. Beatriz Alvarez
Co-orientadora: Dra. Ana Denicola

Laboratorio de Enzimología
Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Montevideo, octubre de 2007

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AZUFRADOS EN MAMÍFEROS	4
1.2	CISTATIONINA β -SINTASA	6
1.2.1	La CBS es una enzima dependiente de PLP	11
1.2.2	La CBS posee un grupo hemo de función no definida	13
1.3	FORMACIÓN Y REACTIVIDAD GENERAL DEL PEROXINITRITO	17
1.3.1	Formación en sistemas biológicos	17
1.3.2	Difusión y blancos biológicos del peroxinitrito	18
1.3.3	Reactividad general del peroxinitrito	19
1.3.4	Reactividad del peroxinitrito con aldehídos	23
1.3.5	Reactividad del peroxinitrito con hemotiolatos proteicos	23
1.3.6	Herramientas para el estudio de la reactividad del peroxinitrito	25
2	OBJETIVOS	29
3	MÉTODOS	30
3.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CBS Δ 143	30
3.1.1	Expresión	30
3.1.2	Extracción	30
3.1.3	Cromatografía de intercambio aniónico	31
3.1.4	Cromatografía de afinidad con glutatión	31
3.1.5	Proteólisis limitada con trombina	31
3.1.6	Segunda cromatografía de intercambio aniónico	32
3.1.7	Segunda cromatografía de afinidad	32
3.1.8	Concentración de la enzima obtenida	32
3.1.9	Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	32
3.2	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	33
3.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA	34
3.4	DETERMINACIÓN DE TIOLES REDUCIDOS EN LA ENZIMA	34
3.5	OBTENCIÓN DE LA ENZIMA REDUCIDA	35
3.6	PREPARACIÓN DE PEROXINITRITO	35
3.7	EXPOSICIÓN DE LA ENZIMA A PEROXINITRITO	36
3.7.1	Exposición a peroxinitrito en presencia de bicarbonato	37
3.7.2	Exposición a peroxinitrito en presencia de atrapadores	37
3.8	EFFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA BANDA DE TRANSFERENCIA DE CARGA LIGANDO-METAL DE LA ENZIMA	38
3.9	CUANTIFICACIÓN DEL COFACTOR PLP LIBERADO DE LA ENZIMA EXPUESTA A PEROXINITRITO	38
3.10	EXPOSICIÓN DE PLP NO ENZIMÁTICO A PEROXINITRITO	39
3.11	ESTUDIO DE LA CINÉTICA RÁPIDA DE REACCIÓN	39
3.12	EFFECTO DE LA CBS SOBRE LA NITRACIÓN DE TIROSINA LIBRE	40

3.13	ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CBS Δ 143	42
4.2	CARACTERIZACIÓN DE LA CBS Δ 143 PURIFICADA	43
4.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	44
4.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TIPOLES REDUCIDOS EN LA CBS OXIDADA	47
4.5	INACTIVACIÓN Y ANÁLISIS ESPECTRAL DE LA CBS Δ 143 EXPUESTA A PEROXINITRITO	48
4.5.1	Inactivación por peroxinitrito de la Fe(III)CBS Δ 143	48
4.5.2	Análisis espectral de Fe(III)CBS Δ 143 expuesta a peroxinitrito	49
4.5.3	Análisis espectral de CBS Δ 143 expuesta a peroxinitrito y reducida	53
4.6	EFFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA BANDA DE TRANSFERENCIA DE CARGA ENTRE METAL Y LIGANDO EN LA CBS Δ 143	54
4.7	ACTIVIDAD CBS Δ 143 EXPUESTA A PEROXINITRITO A DIFERENTES PH	56
4.8	EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE PLP A PEROXINITRITO	58
4.8.1	Modificación de PLP libre por exposición a peroxinitrito	58
4.8.2	Estudio cinético de la reacción entre PLP y peroxinitrito	61
4.8.3	Liberación del cofactor PLP de la CBS tratada con peroxinitrito	65
4.8.4	Efecto de peroxinitrito sobre la fluorescencia de CBS Δ 143	66
4.9	ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN CON PEROXINITRITO	69
4.9.1	Determinación directa de la velocidad de reacción por espectroscopia de flujo detenido	69
4.9.2	Determinación indirecta de la velocidad de reacción por competencia con citocromo c reducido	73
4.10	EFFECTO SOBRE LA INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE ATRAPADORES DE RADICALES DE PEROXINITRITO	75
4.11	ESTUDIO DE LA NITRACIÓN DE TIROSINA EN PRESENCIA DEL GRUPO HEMO DE LA CBS	76
4.12	EFFECTO DEL BICARBONATO SOBRE LA NITRACIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LA CBS EXPUESTA A PEROXINITRITO	78
4.12.1	Efecto del bicarbonato sobre la nitración e la CBS expuesta a peroxinitrito	78
4.12.2	Efecto del bicarbonato sobre la actividad de la CBS expuesta a peroxinitrito	80
5	CONCLUSIONES	82
6	BIBLIOGRAFÍA	84

1 INTRODUCCIÓN

La homocisteína fue descubierta en 1932 por du Vigneaud [1] pero fue recién 30 años más tarde que adquirió interés desde el punto de vista clínico. En 1962 dos grupos independientes en Irlanda y Estados Unidos observaron elevadas concentraciones de homocisteína en la orina de niños con retardo mental [2, 3]. En 1969 se realizaron las primeras observaciones donde se relacionaba en forma directa la presencia de niveles elevados de homocisteína plasmática con el desarrollo de aterosclerosis [4] lo que produjo un resurgimiento del interés por el estudio de este aminoácido azufrado.

Desde ese momento numerosas evidencias han demostrado que la presencia de Hcy plasmática en niveles elevados, condición conocida como hiperhomocisteinemia, se correlaciona con enfermedades complejas y multifactoriales de tipo cardiovascular y neurodegenerativo [5-10].

La hiperhomocisteinemia puede deberse a una conjunción de factores genéticos y adquiridos que afectan en mayor o menor grado el funcionamiento normal de las enzimas que participan en su metabolismo, principalmente la cistationina β sintasa (CBS) y la metilentetrahidrofolato reductasa, ya sea por mutaciones en sus genes o por carencia de alguno de sus cofactores: cobalamina (vitamina B₁₂), folato o piridoxal fosfato (vitamina B₆) [11-15].

Se ha propuesto que las enfermedades cardiovasculares de origen aterotrombótico asociadas con la hiperhomocisteinemia podrían ser el resultado, en parte, de un incremento del estrés oxidativo vascular donde se forman diferentes especies reactivas entre las que se encuentra el peroxinitrito. En este contexto podría existir interacción entre la CBS, una de las enzimas del metabolismo de la homocisteína, y el peroxinitrito.

1.1 METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AZUFRADOS EN MAMÍFEROS

El aminoácido azufrado cisteína (Cys) es utilizado en una amplia variedad de funciones celulares incluyendo la síntesis del antioxidante celular más abundante, el glutatión (GSH), quien a su vez constituye una reserva fundamental de Cys para el organismo [16]. La Cys es el reactivo limitante en esta biosíntesis y por lo tanto su propia síntesis y utilización está finamente regulada. Su formación es además la única ruta catabólica para la remoción de aminoácidos azufrados en exceso, oxidándose a sulfato (SO_4^{2-}), dióxido de carbono (CO_2) y piruvato [17].

En los mamíferos el átomo de azufre (S) de la Cys proviene de otro aminoácido azufrado, la metionina (Met), residuo esencial que debe ser ingerido en la dieta; mientras que el esqueleto carbonado es aportado por el aminoácido serina (Ser)[18]. El intermediario en esta síntesis es la homocisteína (Hcy), un metabolito tóxico que se genera por hidrólisis de S-adenosilhomocisteína, producto remanente de la acción metilante de S-adenosilmetionina (SAM) [19].

Existen dos vías principales de detoxificación de la Hcy: la transmetilación y la transulfuración (figura 1). Aproximadamente el 50 % de la Hcy formada es transmetilada a Met en el llamado "ciclo de la metionina" como forma de recuperar este aminoácido esencial. En esta vía participan las enzimas metionina sintasa, betaína-Hcy metiltransferasa (activas sólo en hígado y páncreas) y la metilentetrahidrofolato reductasa [18, 20]. El otro 50 % condensa en forma irreversible con un residuo Ser para formar Cys mediante una transulfuración en la que participan en forma secuencial las enzimas cistationina β – sintasa (E.C. 4.2.1.22, CBS) y la cistationina γ -liasa (también llamada γ cistationasa) [12, 21-25]. La Hcy se relaciona por esta vía metabólica con la producción de GSH, principal amortiguador redox en mamíferos, y es por ello que varias de las enzimas participantes son reguladas por cambios en el estado redox celular [26]. Ambas vías están reguladas por la concentración de SAM que actúa como inhibidor alostérico de la metilentetrahidrofolato reductasa y como activador de la CBS [27].

La Hcy es producida a nivel celular y exportada hacia el plasma donde es inmediatamente oxidada en un 99 % a homocistina o disulfuros mixtos. Posteriormente es capturada a nivel celular por transportadores, canales o receptores de membrana que reconocen diferentes tipos de disulfuros (principalmente en hígado y páncreas) donde éstos son reducidos y la Hcy es metabolizada a través de las vías antes mencionadas [28].

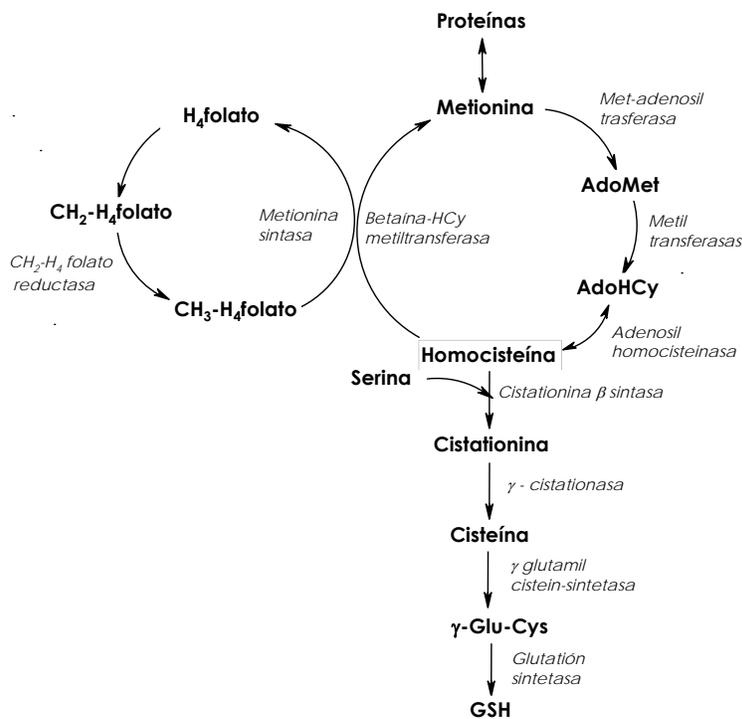


Figura 1. Metabolismo intracelular de la homocisteína. La homocisteína posee dos destinos principales. Por un lado puede transmetilarse a metionina con el aporte de metilo (-CH₃) proveniente del metiltetrahidro-folato para recuperar ese aminoácido esencial y garantizar la producción de SAM, principal agente metilante a nivel celular. Por otro lado puede condensarse con un residuo Ser, generando en último término el aminoácido Cys, cuyo destino principal es la síntesis de glutatión. Figura adaptada de [26]

La concentración de Hcy total plasmática en condiciones normales se encuentra en un rango entre 5 y 15 μM . Niveles por encima de estos valores se asocian al desarrollo de diferentes patologías de gravedad variable, siendo moderadas cuando la concentración plasmática no excede 50 μM de Hcy total circulante y severas para valores superiores a 100 μM [20, 29-32]. En 1969 se realizaron las primeras observaciones que relacionaron niveles elevados de Hcy plasmática (hiperhomocisteinemia) con la aterosclerosis [4].

Actualmente es considerada un factor de riesgo independiente en patologías de la vasculatura periférica, cerebral y coronaria entre las que prevalece la aterosclerosis. Se estima que más de un 40 % de la población con este tipo de patologías posee niveles elevados de homocisteína [5-10].

El mecanismo por el cual la Hcy en si misma es capaz de dañar las paredes de los vasos no ha sido bien definida hasta el momento y ha demostrado ser multifactorial [33, 34].

En relación al desarrollo de aterosclerosis se han planteado mecanismos mediados por daño oxidativo [35, 36] donde la homocisteína actuaría como molécula

pro oxidante ya que su propia oxidación en plasma produciría especies reactivas del oxígeno como $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo estas moléculas finalmente causantes de la citotoxicidad endotelial de la homocisteína. Sin embargo estos efectos se han observado en experimentos *in vitro* y con dosis de 1 mM muy por encima de las esperadas en condiciones fisiológicas aún en las situaciones más severas (100 μM).

Otro mecanismo propone que el estrés oxidativo promovido por la homocisteína elevada altera las propiedades vasodilatadoras de un endotelio normal afectando la producción por parte de la eNOS del relajante endotelial óxido nítrico ($\bullet NO$) [37] redireccionando la síntesis hacia la formación de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) mediante la reducción en la disponibilidad del cofactor tetrahidrobiopterina, que funciona además como atrapador de radicales [38]. La disminución en la concentración efectiva de $\bullet NO$ promueve además la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos a las paredes del endotelio, eventos iniciales en la generación de la placa de ateroma [39].

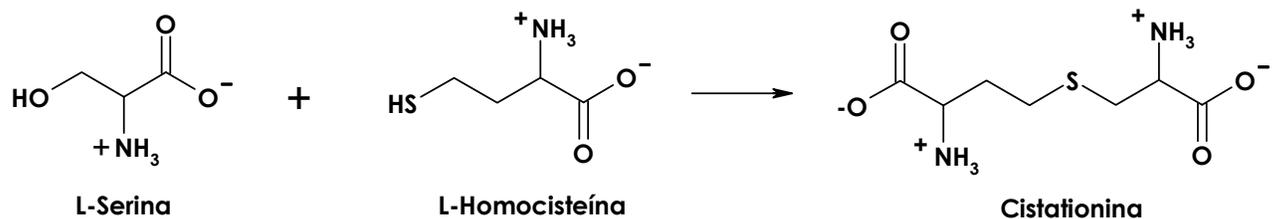
La hiperhomocisteinemia también se asocia a múltiples desórdenes neurológicos, como enfermedad de Alzheimer, demencia senil, deficiencias de tubo neural así como a deficiencias a nivel de la visión, osteoporosis y otras deficiencias a nivel del sistema óseo. Estas manifestaciones clínicas incluyen un amplio rango de edades que va desde la niñez hasta la vejez [20, 40].

A efectos de este trabajo nos centraremos en la enzimología de la cistationina β -sintasa, cuyas deficiencias genéticas y funcionales llevan a la acumulación de Hcy a nivel plasmático y al desarrollo de las patologías antes mencionadas.

1.2 CISTATIONINA β -SINTASA

La cistationina β -sintasa (E.C.4.2.1.22, CBS o L-serinsulfhidrasa) es una enzima clave que cataliza el paso irreversible en la transulfuración hacia la formación de Cys y en último término de GSH, principal regulador del estado redox a nivel celular [22].

Esta enzima participa en la sustitución del grupo OH en el carbono β de la L-Ser por el tiol (SH) de la L-Hcy con la eliminación de una molécula de H_2O , condensando ambos residuos para formar cistationina, precursor de la Cys [24] de acuerdo a la siguiente reacción:



La CBS humana tiene localización citosólica; en adultos se expresa en mayor proporción en hígado, páncreas y riñón y en menor porcentaje en cerebro, mientras que en la etapa fetal la mayor expresión ocurre a nivel del corazón [41, 42].

Es un homotetrámero compuesto por subunidades idénticas de 63 kDa y su actividad es promovida y regulada alostéricamente por SAM mediante la presencia de un dominio autoinhibitorio en el extremo C-terminal. Este dominio se pierde por proteólisis parcial dando como resultado una enzima dimérica que no responde a SAM y presenta una actividad enzimática incrementada con relación a la nativa en ausencia de SAM. Además el cambio estructural a la disposición de dímero evita la agregación proteica exhibida por la CBS tetramérica. La forma dimérica de la enzima, con un PM de 48 kDa y una actividad catalítica incrementada en ausencia de SAM, fue inicialmente purificada a partir de extractos de hígado humano por acción de las proteasas hepáticas [43, 44].

En 1998 dos grupos independientes obtuvieron por distintos procedimientos la enzima dimérica con un comportamiento similar a la aislada de hígado y con un PM similar de 45 kDa. El primero fue el grupo de J.P.Kraus [45] que luego de someter a la enzima nativa recombinante a proteólisis limitada con tripsina obtuvo un dímero estable con subunidades de 45 kDa. Su secuencia aminoacídica se extendía desde el residuo 40 en el extremo N-terminal hasta el residuo 413 en el extremo C-terminal, región que contiene el centro catalítico que va desde la Glu37 hasta la Arg 413, y está altamente conservada en las enzimas evolutivamente relacionadas de plantas y bacterias [46, 47]. El segundo grupo liderado por W.D. Kruger obtuvo una CBS dimérica con un PM de 45 kDa por introducción de una mutación en el residuo 409 (W409OPA) en el marco de lectura abierta del plásmido de la enzima nativa (pGEXCBS) que resultó en una CBS cuya secuencia se extendía desde el residuo 1 hasta el 408 incluyendo también en este caso el centro catalítico [48]. Ese nuevo plásmido (pGEXCBSN) codifica el centro catalítico de la enzima, carece del extremo regulatorio C-terminal, y al igual que el plásmido para la enzima nativa, se expresa en un sistema recombinante (*E.coli* BL 21) como proteína de fusión con glutatión-S-transferasa y codifica para la enzima CBS Δ 143 [49]. Tanto la enzima obtenida a partir de extractos de hígado como la recombinante muestran propiedades cinéticas que las hacen indistinguibles entre sí [24].

Posteriormente se aisló una mutación natural similar a la CBS Δ 143 que predice una terminación prematura a nivel del residuo 420 [50] y que también posee una disposición dimérica y constitutivamente activada.

Si bien la forma dimérica se obtuvo *in vitro* y como producto de ciertas mutaciones en humanos, su relevancia fisiológica no era clara. En 2003 se realizaron estudios relacionados con el modo de acción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que mostraron que éste era capaz de

inducir la activación postraduccional de la CBS mediante una proteólisis dirigida que generaba un producto de 45 kDa con disposición dimérica y actividad incrementada con respecto a la enzima nativa. De este modo se promovería el flujo de homocisteína hacia la síntesis de GSH, lo que aumenta la capacidad antioxidante de la célula cuando existe sobreproducción de especies reactivas del oxígeno durante, por ejemplo, un proceso inflamatorio [51].

La enzima tetramérica posee una alta tendencia a producir agregados lo que hace muy difícil realizar estudios físicos sobre ella [52], sin embargo la forma dimérica de la enzima recombinante ha podido ser cristalizada y se muestra en la figura 2 [52-55].

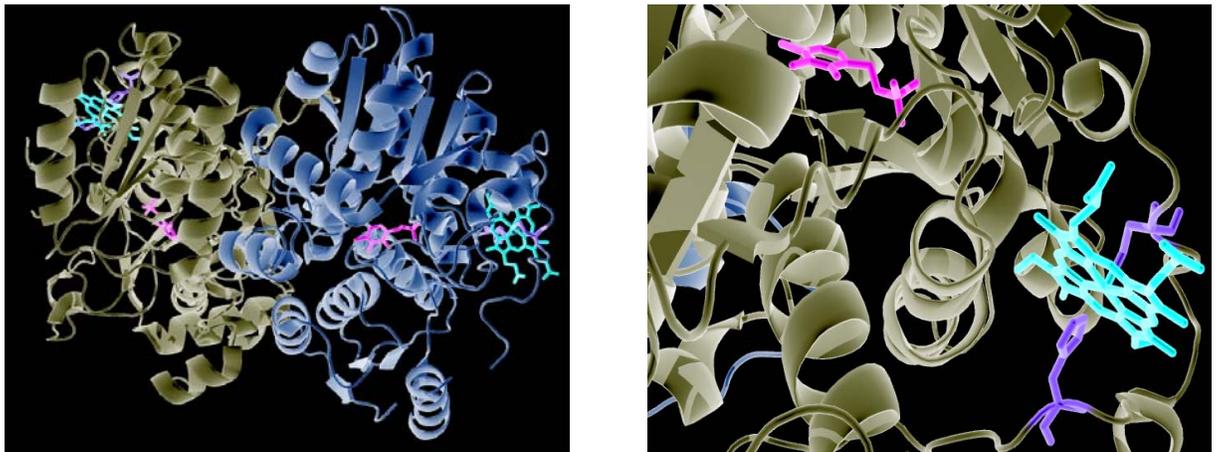


Figura 2. Estructura tridimensional de la CBS Δ 143. Izquierda: Dímero representado con cintas, cada monómero se muestra en color marrón y azul respectivamente. El grupo hemo se representa con el modelo de bolas y barras en celeste al igual que el cofactor PLP en fucsia y los ligandos del hemo, Cys52 e His65, en violeta. La CBS adopta un plegamiento general similar a la familia de la triptofano sintasa [55]. Derecha: acercamiento que muestra la disposición entre el hemo y el cofactor PLP que conservan una distancia de 20 Å entre sí dentro de cada monómero. Se observa además la disposición del hemo unido a sus ligandos axiales mediante un loop de 15 residuos en el extremo N-terminal [55]. La figura fue generada por el programa PyMOL v0.99 (DeLano, W. L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific*, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>.) a partir de la secuencia 1JBQ [52] obtenida en el Protein Data Bank.

La CBS presenta una organización modular con un dominio de unión al grupo hemo en el extremo N-terminal, seguido por un dominio catalítico donde se encuentra el cofactor PLP y el dominio regulatorio al que se une el efector alostérico SAM en el extremo C-terminal (figura 3) [45, 49].

Cada monómero tanto en la enzima completa (551 residuos por monómero) como en la dimérica (408 residuos por monómero) se une a ambos sustratos (Hcy y Ser) siguiendo un mecanismo de reacción tipo ping-pong, posee una molécula de piridoxal 5'-fosfato (PLP) y un grupo hemo hexacoordinado siendo la única hemoproteína dependiente de PLP caracterizada hasta el momento [24, 56].

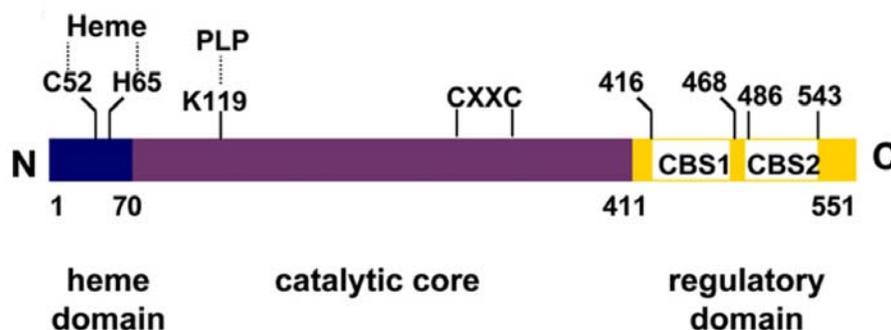


Figura 3. Organización modular de cistationina β-sintasa. El extremo N-terminal posee el sitio de unión al hemo cuyos ligandos axiales son los residuos Cys52 e Hys65. En el dominio catalítico se ubica la Lys119 formando una base de Schiff con el cofactor PLP y un motivo oxidorreductasa de tipo CXXC entre la Cys272 y la Cys275. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio regulatorio de respuesta a SAM con dos secuencias repetidas en tandem (CBS₁ y CBS₂) y una estructura secundaria de tipo β-α-β-β-α característica de unión a derivados de adenosina. La CBS Δ143 carece del fragmento C-terminal a partir del residuo 408 por lo que no posee el dominio regulatorio de unión a SAM. Esquema extraído de [25].

La CBS presenta además un motivo oxidorreductasa de disulfuros cercano al hemo de tipo CXXC del que participan la Cys272 y Cys275, con un plegamiento similar al de la glutarredoxina de *E. coli* con la secuencia CPGC, donde las cisteínas pueden estar reducidas como tiol u oxidadas formando disulfuro intramolecular [52]. Este dominio es de función aún desconocida.

La desnaturalización térmica produce cambios en la CBS a nivel de la absorción del grupo hemo en la región de la banda de Soret (428 nm) produciendo una disminución directamente proporcional al grado de desnaturalización. Los cambios espectrales a 428 nm muestran que la enzima tetramérica es más termoestable que la dimérica ya que presenta un punto de inflexión a los 60 °C mientras que en la dimérica se observa a los 56 °C y comienza a precipitar 10 °C antes que la enzima completa [45].

La enzima nativa posee valores de K_M menores para Ser (2 mM) y Hcy (5 mM) en relación a la dimérica (10 mM)[49]. En cambio en términos de actividad enzimática, aún en presencia del activador alostérico SAM, la actividad alcanzada por la CBS nativa es menor a la que presenta la CBS dimérica, mostrando esta última un estado superactivado [25]. En la tabla 1 se resumen las propiedades cinéticas y estructurales de ambas formas.

Parámetro	CBS nativa	CBS dimérica
Peso molecular (kDa)/ monómero	63	45
Estado oligomérico	Tetrámero	Dímero
PLP/subunidad	1	1
Hemo/subunidad	1	1
Respuesta a SAM	+	-
Act. Específica (- SAM) (μmol/h.mg.)	159	750
Act. Específica (+SAM) (μmol/h.mg.)	295	750
k_{cat} (- SAM) /mol de sitio activo (s⁻¹)	2.8	10
k_{cat} (+ SAM) (s⁻¹)	5.2	10
K_M Hcy (mM)	5 ± 0.9	18 ± 8
K_M Ser (mM)	2 ± 0.3	9.7 ± 4.3

Tabla 1. Propiedades cinéticas y estructurales de la CBS humana nativa y trunca dimérica. La concentración de SAM utilizada en estas determinaciones fue de 380 μM y la kcat fue calculada por mol de sitio activo para evitar asunciones sobre el estado de oligomerización de la enzima ya que se han observado oligómeros superiores al tetrámero. Extraída de [25]

El gen que codifica las diferentes isoformas del ARNm para la CBS humana se encuentra en el cromosoma 21, en la región 21q22.3 [43, 57], región donde también se encuentran asociados los genes que codifican para el fenotipo del síndrome de Down [58]. La homocisteinemia asociada a deficiencias en dicho gen es originada como un desorden genético recesivo de carácter hereditario [29]. De las más de 130 mutaciones patogénicas caracterizadas aproximadamente el 50% muestra respuesta positiva y variable frente a la administración de piridoxina (precursor del PLP, cofactor de la CBS), las más frecuentes son la I278T y la R266K [59-61]. Otros tipos de mutaciones puntuales se han observado en el dominio de unión a hemo y en el dominio regulatorio C-terminal. En este caso se observa la expresión de una enzima activa que no responden a SAM aunque conserve su sitio de unión en algunos casos (ej: S466L). Dentro de este grupo se subdividen de acuerdo a su actividad en aquellas que presentan una actividad constitutiva aumentada similar a la inducida por SAM en la enzima nativa (P422L y S466L) y las que presentan una actividad constitutiva aumentada pero en valores más cercanos a la de la CBS nativa en ausencia de SAM (I435T y D444N). Las mutantes son estructuralmente similares y se comportan en términos cinéticos de igual forma que la enzima dimérica lo que demuestra que tanto la proteólisis parcial del dominio regulatorio C-terminal como la unión de SAM causan un efecto similar en la CBS, suprimiendo la acción del dominio autoinhibitorio para aumentar su actividad enzimática [62].

1.2.1 La CBS es una enzima dependiente de PLP

El PLP (figura 4 A) es un cofactor muy versátil que participa en diferentes transformaciones químicas de aminoácidos tales como transaminación, β -eliminación, β y γ sustitución, descarboxilación y racemización [63-65]. La diversidad de reacciones catalizadas por el PLP involucra a más de 100 enzimas pertenecientes a 5 de los 6 grupos enzimáticos definidos por la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) [65]. Las enzimas dependientes de PLP se clasifican a su vez en 4 grupos según su estructura tridimensional, secuencia, estructura secundaria y perfiles de hidrofobicidad. Dentro de esta clasificación, la CBS pertenece al tipo II o familia β . Los miembros de este grupo presentan dos dominios de estructura mixta α/β con el PLP unido entre ellos [66], (Miles, E.W & Kraus, J.P., 2004).

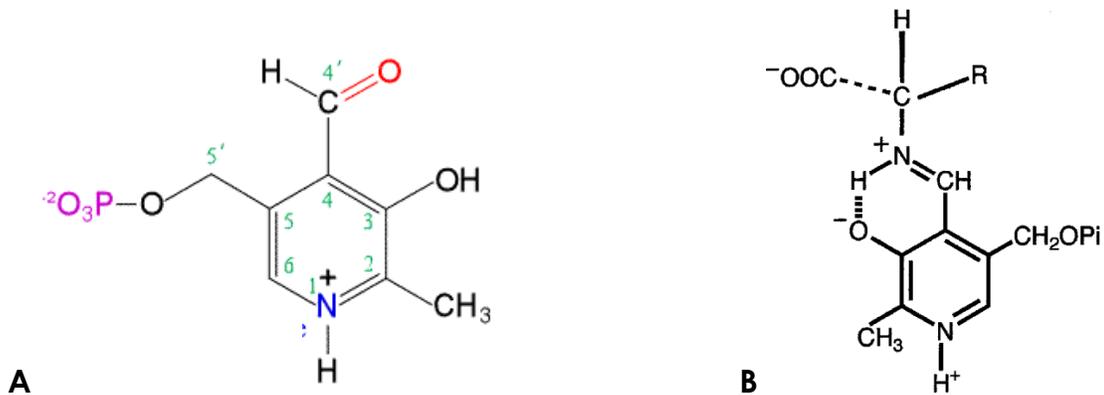


Figura 4. Estructura del piridoxal -5'-fosfato (PLP). (A) El PLP es un derivado de la piridoxina o vitamina B6. (B) La coenzima se une covalentemente a la enzima por medio de una base de Schiff (imina) formada por la condensación de su grupo aldehído con el grupo ϵ amino de un residuo Lys enzimático. Se muestra la forma tautomérica protonada, la forma aldimina desprotonada es una estructura resonante de la anterior.

Al igual que otras enzimas que poseen PLP, la CBS presenta cierta promiscuidad de sustrato ya que puede producir cistationina por el mecanismo de β -sustitución, pero también puede generar sulfuro de hidrógeno (H_2S) que funciona como neuromodulador cerebral por β -eliminación o β -sustitución dependiendo de los sustratos de partida [65, 67, 68].

En todas las enzimas dependientes de PLP el grupo carbonilo ($C=O$) del cofactor se encuentra formando una aldimina interna con el grupo amino ($-NH_2$) de un residuo de lisina (Lys) ubicado en el sitio activo (figura 4 B). En el caso de la CBS el residuo que participa es la Lys_{119} y la aldimina interna protonada (λ máx 420 nm) se encuentra en equilibrio con su forma tautomérica desprotonada (λ máx 330 nm). Durante la catálisis el PLP actúa como sumidero de electrones, extrayéndolos del sustrato, un residuo Ser en este caso [23]. El grupo amino del sustrato sustituye al amino de la Lys en la poco estable base de Schiff o aldimina interna que está formando con el

PLP, para formar entonces una aldimina externa. Esta aldimina externa, se transforma en un intermediario aminoacrilato que reacciona entonces con el segundo sustrato para liberar el producto de la reacción y volver a regenerar la aldimina interna entre el PLP y la enzima (figura 5).

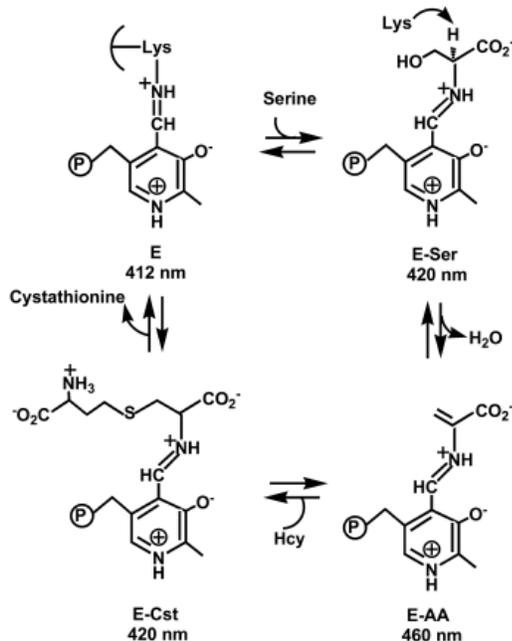


Figura 5. Estructuras postuladas para los intermediarios de PLP en la reacción catalizada por la CBS de levadura. Se muestran los intermediarios de la reacción que han sido identificados con sus respectivos máximos de absorción. El residuo Lys119 se encuentra formando una aldimina interna con el PLP (**E**). Cuando se une el primer sustrato de la enzima, un residuo de Ser, la Lys es desplazada y se forma una aldimina externa con el PLP (**E-Ser**). Esta aldimina pierde una molécula de H₂O y se forma el intermediario aminoacrilato (**E-AA**) que reacciona con el segundo sustrato, la Hcy para formar una aldimina externa pero ahora unida a cistationina (**E-Cst**), el producto final de la reacción, que es liberado dejando a la CBS pronta para comenzar otro ciclo catalítico. Extraído de [25].

La comparación de secuencia aminoacídica entre la CBS humana, de rata y otras enzimas relacionadas, por ejemplo la subunidad β de la triptofano sintasa bacteriana y treonina desaminasa, muestra un motivo SVK (Ser-Val-Lys) altamente conservado que incluye el residuo de Lys esencial para la formación de la base de Schiff correspondiente [21, 23, 25]. Una vez en contacto con los sustratos, el PLP enzimático cambia su espectro UV-Vis característico hacia el de los respectivos intermediarios de la reacción y esto hace posible su estudio [21].

La CBS tetramérica humana no presenta fluorescencia relacionada al PLP, mientras que la CBS dimérica posee una emisión débil a 388 nm y 508 nm cuando es excitada a 330 nm y 420 nm, longitudes de onda correspondientes a la aldimina interna desprotonada y protonada respectivamente. La escasa o nula fluorescencia de la enzima nativa quizá se deba tanto a un efecto de apagamiento de los aminoácidos que rodean al PLP como a un efecto de filtro interno

generado por el hemo. Probablemente la ausencia de los 143 residuos en el extremo C-terminal de la enzima dimérica elimina parcialmente ese efecto observándose entonces fluorescencia [21, 49].

1.2.2 La CBS posee un grupo hemo de función no definida

El grupo hemo en la CBS fue identificado 13 años atrás por J.P. Kraus y colaboradores [69] como un hemo tipo b de acuerdo al espectro obtenido y comparado con hemos a, b y c estándar por el método de piridina hemocromo [70].

Este hemo es de tipo ferriprotoporfirina IX [69] y hexacoordinado de bajo spin, disposición que fue determinada por EPR (resonancia electrónica paramagnética) y absorción de rayos X. El espectro de EPR para la CBS dimérica es rómbico con $g_z = 2.5$, $g_y = 2.3$ y $g_x = 1.86$, valores que coinciden con los de otras hemoproteínas con hemo hexacoordinado en disposición de bajo spin [71]. Estos resultados fueron confirmados luego por resonancia Raman [52, 55, 72].

La quinta y sexta posición en el hemo de la CBS se encuentran ocupadas por el grupo tiolato de la Cys52, lo que la incluye en el grupo de proteínas hemo-tiolato, y por un residuo histidina (His 65) respectivamente [55, 73].

En la CBS purificada el hemo se encuentra oxidado como Fe(III) pero puede ser reducido a Fe(II) con reductores como el citrato de titanio o ditionito de sodio [24]. Los estudios cristalográficos en la CBS dimérica muestran al hemo hexacoordinado y de bajo spin tanto en estado oxidado como reducido [52-54].

El espectro UV-Vis característico de la enzima es resultado de la presencia tanto del hemo como del PLP (figura 6). La CBS Fe(III) muestra un máximo característico a 429 nm correspondiente a la banda γ de Soret del hemo y al aporte de la aldimina interna protonada (λ máx 420 nm). A 550 nm se observa un máximo poco definido correspondiente a la banda $\alpha\beta$ del hemo y a 364 nm absorbe la banda δ del hemo [74] y parcialmente la aldimina interna desprotonada del PLP (λ máx 330 nm). La coordinación entre el tiolato de la Cys52 y el Fe(III) se observa en la región UV-Vis de baja energía por la presencia de dos bandas a 645 nm y 705 nm [74, 75].

Cuando el hemo se reduce a Fe(II) el máximo a 429 se desplaza hacia el rojo apareciendo un nuevo máximo a 449 nm y la banda a 550 nm se resuelve en dos bandas definidas a 571 nm (α) y 540 nm (β) [24].

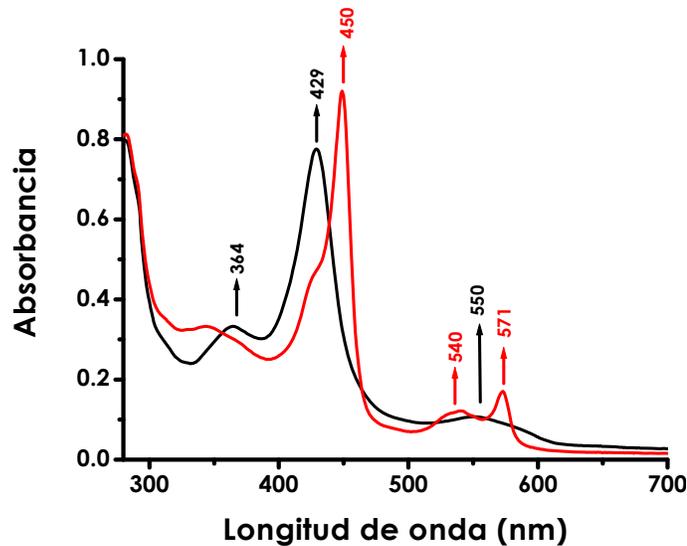


Figura 6. Espectros de CBS oxidada y reducida. La enzima oxidada (—) presenta un hombro a 550 nm, correspondiente a las bandas $\alpha\beta$ del hemo, a 429 nm se observa el máximo característico de la banda γ de Soret y por último la banda δ a 364 nm. Cuando la enzima se expone a un reductor como el ditionito de sodio el espectro del hemo cambia a su estado reducido (—). El máximo a 429 nm se corre hacia 450 nm y las bandas α y β se resuelven en máximos a 571 y 540 nm respectivamente.

Este hemo hexacoordinado en estado oxidado es relativamente inerte al intercambio de sus ligandos con moléculas exógenas, no mostrando afinidad por los ligandos férricos más comunes para hemoproteínas reportados como azida, cianuro (CN^-) o fluoruro (F^-) [23] y en particular para hemotiolatos como piridina, imidazol, histidina aún cuando se ensayan en altas concentraciones (10 mM) [76].

Sólo se han observado cambios espectrales frente a la adición de altas concentraciones (200 μM o superior) de cloruro de mercurio (HgCl_2), un agente quelante de tioles. En este caso ocurre un corrimiento del máximo a 429 nm hacia el azul (395 nm) [71, 72, 77], consistente con la conversión de un Fe(III) hexacoordinado de bajo spin a un Fe(III) pentacoordinado de alto spin, sugiriendo que hay una pérdida de coordinación con el tiolato de la Cys52 de acuerdo a resultados previos de EPR [71] y resonancia Raman [72]. A pesar de que el HgCl_2 es capaz de interactuar con todos los residuos Cys que posee la CBS dentro y fuera del bolsillo que contiene al hemo, los cambios en el espectro sugieren que existe una interacción directa con el ligando axial en el hemo (Cys52), sugiriendo que se encuentra accesible a ligandos externos [78]. Esto puede ser revertido por la adición de un tiol (ej: Cys, Hcy, ditiotreitól) que recupera la coordinación en la sexta posición [77]

La CBS en estado reducido y en presencia de concentraciones de HgCl_2 hasta 300 μM también muestra un espectro inalterado, pero a concentraciones mayores del quelante se produce un corrimiento del máximo a 450 nm hacia 425 nm. Resultados similares se han obtenido cuando la enzima reducida es sometida a temperaturas entre los 4 y los 55 $^\circ\text{C}$, donde se produce

una nueva especie con un máximo a 424 nm [79]. De acuerdo con reportes previos para otros hemos tipo b en estado reducido, este desplazamiento del máximo hacia el azul para la banda γ y de Soret estaría indicando la pérdida de coordinación con la Cys52 pero la retención de un sexto ligando diferente no determinado hasta el momento [71, 72, 74, 78-80].

En el caso de la exposición a HgCl_2 , tanto para la enzima oxidada como reducida los cambios espectrales se corresponden con la pérdida de actividad enzimática [77].

La CBS en estado reducido es un poco más reactiva siendo capaz de unirse a moléculas gaseosas como el monóxido de carbono (CO) y óxido nítrico (*NO) aunque su afinidad y modo de unión son diferentes.

El CO se une al hemo en su estado reducido Fe(II) desplazando a la Cys52 y forma un complejo hexacoordinado de bajo spin con un desplazamiento del pico de Soret que pasa a absorber a 422 nm e inactiva la enzima [23, 81]. La CBS en estado reducido y en ausencia de CO presenta un máximo a 450 nm, a diferencia de las hemoproteínas del tipo P_{450} que en estado reducido deben unirse a CO para pasar al máximo a 450 nm [82, 83]. En la CBS el CO actúa como inhibidor reversible y competitivo de la Hcy y su espectro es similar a complejos Fe(II)/CO observados en otras hemoproteínas (ej: indolamina 2,3 dioxigenasa, HRP, CooA) [23, 84-86]. La unión de CO al hemo de la enzima reducida produce cambios en el entorno del mismo que resultan en un desplazamiento del ligando Cys y en la incapacidad de unión de la homocisteína [23, 72]. A pesar de que el modo en que se une el hemo de la CBS al CO es similar a la de otro hemotiolato hexacoordinado, el sensor de CO bacteriano CooA, es difícil explicar esta función como sensor de CO para la CBS en el contexto metabólico en que se encuentra y por lo tanto se desconoce su relevancia fisiológica [23].

El *NO también se une en forma reversible al hemo en su estado reducido aunque con una afinidad 200 veces menor que el CO produciendo un corrimiento del máximo hacia el azul (390 nm) correspondiente a un estado pentacoordinado de alto spin con pérdida de los dos ligandos axiales y la formación de un ferroso nitrosil-CBS, similar a espectros reportados para complejos Fe(II)/ *NO en otras hemoproteínas [87] y también en este caso se acompaña de una inhibición de la actividad enzimática [24].

El cianuro (CN^-) es capaz de reaccionar con la CBS en su estado reducido generando un cambio espectral con corrimiento hacia el azul desde 450 nm a 435 nm, aunque la afinidad del hemo es menor que para el CO (milimolar vs micromolar). Si bien la enzima oxidada no une CN^- , se observó una inactivación similar tanto en la enzima oxidada como reducida debido a la conocida reactividad que presenta el CN^- con el PLP [23].

También varios isonitrilos con sustituyentes alifáticos diferentes (tert-butilCN, bencilCN, ciclohexilCN) han mostrado ser capaces de unirse al Fe(II) de la CBS produciendo un cambio

espectral de 450 nm a 432 - 435 nm variable según el sustituyente acompañado de un corrimiento hacia 563 nm y 534 nm en las bandas α y β respectivamente [88].

La CBS de mamíferos posee un grupo hemo que está ausente en levaduras sin embargo ambas enzimas presentan una secuencia similar y catalizan la misma reacción [89-91]. La presencia del grupo hemo en la CBS de mamíferos es reciente en términos evolutivos, costosa en términos bioquímicos y hasta el momento no ha sido determinada su función.

En relación con la posible función de este hemotiolato dentro de la CBS se han investigado roles de tipo catalítico, regulatorio o estructural [23].

La función catalítica del hemo fue descartada debido a que el mecanismo enzimático de la CBS en todas las especies se explicaba por la sola presencia de cofactor PLP [21]. Estudios posteriores confirmaron esta primera observación ya que por EPR y NMR se determinó que el hemo se encuentra a una distancia de 20 Å del PLP donde ocurre la β -sustitución [92], hecho que se confirmó por estructura cristalina [52, 55]. Sin embargo, si bien el grupo hemo en la CBS no es imprescindible para la catálisis, su presencia promueve una mayor actividad enzimática. El grupo hemo posee su sitio de unión dentro de los primeros 70 residuos en la región N-terminal, región ausente en CBS de levaduras y *T. cruzi* [24, 91]. Cuando se eliminan esos residuos la enzima es incapaz de unir hemo, sin afectar la unión a PLP pero se obtiene una disminución de 60 % en la actividad enzimática [89, 93, 94].

También se postuló para este hemo un rol regulatorio ya que la actividad catalítica ha mostrado ser influenciada por diversos factores relacionados al hemo como el estado redox del Fe o simplemente por un contenido de hemo correcto.

Se ha observado que cambios en el estado de oxidación del hemo son capaces de regular la actividad enzimática. La enzima reducida presenta una actividad enzimática disminuida a la mitad en relación con la actividad de la enzima oxidada, recuperándose completamente la actividad inicial cuando el hemo se reoxida [24]. El estado redox del hemo es además dependiente del pH favoreciéndose la reoxidación de Fe(II) a Fe(III) a valores de pH inferiores a 7.4 [74]. La relevancia fisiológica de este comportamiento es desconocida porque no existen evidencias que muestren el estado redox en que se encuentra la enzima dentro del entorno celular [81].

En relación a la modulación de la actividad enzimática con el PLP, se realizaron estudios de espectroscopia NMR sobre átomo de fósforo del PLP que mostraron modificaciones en su núcleo que se acompañan de cambios en el estado de oxidación del hemo de la forma paramagnética Fe(III) a la diamagnética Fe(II), indicando una transmisión de información entre ambos cofactores que permite una modulación de la actividad catalítica [95]. Para estudiar este efecto se construyeron mutantes a nivel de los ligandos axiales del hemo. Todos los mutantes

(C52S, C52A y H65R) presentaron un menor contenido de hemo con respecto a la enzima nativa aunque el nivel de saturación en PLP fue similar y sin embargo la actividad enzimática en todos los casos fue menor. Los espectros UV-Vis se vieron modificados para el caso de los mutantes donde se sustituyó la Cys52, observándose un desplazamiento del máximo característico a 429 hacia 415 nm (C52S) y 417 nm (C52A). Estos resultados confirman que los cambios estructurales del hemo son capaces de modular a distancia la actividad enzimática a nivel del PLP [95].

1.3 FORMACIÓN Y REACTIVIDAD GENERAL DEL PEROXINITRITO

1.3.1 Formación en sistemas biológicos

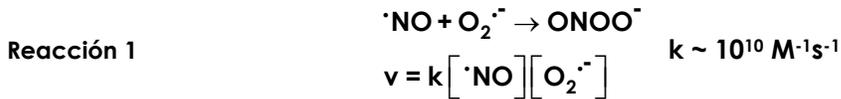
El peroxinitrito¹ es un poderoso agente oxidante y buen nitrante que puede ser generado por varios procesos biológicos. La vía principal de síntesis ocurre a partir de la reacción de dos especies radicalares: el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico ($\cdot NO$) (reacción 1) [96-98].

El $\cdot NO$ es producido *in vivo* por las isoformas endotelial, neuronal e inducible de la óxido nítrico sintasa (NOS) durante la conversión de arginina en citrulina en una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo macrófagos, células endoteliales, neutrófilos, hepatocitos y neuronas [99, 100]; posee una vida media del orden de segundos y puede difundir a través de las membranas [101, 102]. Cumple funciones de señalización importantes en el control de la presión y el flujo sanguíneo y tiene propiedades antiaterogénicas [99]. Su concentración intracelular dependiendo del estado fisiopatológico va desde 450 nM en células endoteliales luego de su estimulación [103] a 4 μM durante la oclusión de una arteria cerebral [104, 105].

El $O_2^{\cdot-}$ por su lado es producido por la reducción del oxígeno molecular (O_2) por un electrón en una amplia variedad de células como producto de la respiración y el metabolismo celular. Se forma principalmente en la mitocondria por la fuga de electrones de la cadena respiratoria y también a partir de las enzimas xantina oxidasa y NAD(P)H oxidasa [98, 106]. Es eliminado por acción de la superóxido dismutasa (SOD), posee una vida media menor a los milisegundos y sólo es capaz de atravesar las membranas por canales aniónicos [107]. Su reactividad preferencial con la SOD mantiene su concentración basal intracelular en rangos de nanomolar a picomolar [108], sin embargo la alta tasa de respiración de las células puede aumentar estas concentraciones ya que produce flujos intracelulares que pueden superar $\mu M s^{-1}$ [109].

¹ El término peroxinitrito utilizado en el texto se refiere tanto a la forma aniónica (ONOO⁻) como a su ácido conjugado (ONOOH). Según la IUPAC los nombres que corresponden son: para la especie ONOO⁻, oxoperoxonitrato (1-) y para el ácido peroxinitroso, ONOOH, oxoperoxonitrato de hidrógeno.

Considerando entonces la vida media de ambos radicales, la formación de peroxinitrito deberá ocurrir principalmente en sitios cercanos a la formación de $O_2^{\cdot-}$ [110].



La constante de segundo orden para la reacción entre ambos radicales tiene un valor aproximado de $10^{10} M^{-1}s^{-1}$ [111-113], lo que indica que es una reacción controlada por difusión [110].

En sitios de inflamación se observa la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que se activa en células musculares lisas y en macrófagos, generando un aumento en la concentración de óxido nítrico del orden de micromolar [114]. La concentración de $O_2^{\cdot-}$ también se ve aumentada en procesos inflamatorios durante la estimulación de neutrófilos y macrófagos [115-117]. En estas condiciones entonces, ocurre una competencia por el $O_2^{\cdot-}$ entre la SOD ($k = 2 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) [118] y el $\cdot NO$.

El peroxinitrito existe en un equilibrio de protonación con un $pK_a = 6.8$ [97], por lo que la relación entre la forma protonada (ONOOH) y desprotonada (ONOO⁻) depende del pH local, en condiciones fisiológicas (pH 7.4) un 80 % se encuentra en forma aniónica [109].

1.3.2 Difusión y blancos biológicos del peroxinitrito

Las especies oxidantes que se generan dentro de un sistema biológico son altamente reactivas por lo que su difusión queda limitada a corta distancia a partir del compartimiento en el que fueron generados. Debido a las diferentes moléculas blanco con las que puede reaccionar a nivel celular, el peroxinitrito tiene una vida media menor a los 100 ms que le permite un potencial traslado intra o extracelular no mayor a los 20 μm [119, 120]. Los efectos biológicos y su detección dependen de la habilidad para atravesar membranas celulares. En ese sentido se ha comprobado que tanto la especie aniónica (ONOO⁻) mediante canales aniónicos, como la forma protonada (ONOOH) mediante difusión pasiva son capaces de hacerlo y ambos procesos coexisten a pH fisiológico [121, 122].

Debido a que la velocidad de reacción con diversas moléculas blanco es similar a la velocidad de difusión del peroxinitrito, el hecho de que ocurra reacción o difusión va a depender de factores como la concentración de los blancos potenciales, el sitio de formación y concentración del peroxinitrito, la cinética con los blancos presentes y la difusión [120].

En condiciones *in vivo* el peroxinitrito reacciona con un número limitado de moléculas, en parte debido a la gran variación en los valores de constantes cinéticas (10^8 - 10^2 M⁻¹s⁻¹) que posee con diferentes blancos y a la concentración celular efectiva de los mismos. A eso se debe agregar que la formación y cantidad de peroxinitrito producido varía con los distintos tipos celulares y los estados fisiopatológicos [119].

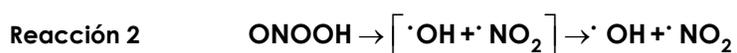
Dentro de las proteínas, numerosas enzimas son inactivadas por peroxinitrito [123, 124] aunque no siempre ésto es reproducido a nivel celular o subcelular donde existen otras reacciones compitiendo [125, 126]. En general el mecanismo de inactivación enzimática ocurre por oxidación o nitración irreversible de algún residuo crítico de la enzima como una cisteína importante para la catálisis, en el grupo hemo o en un cluster [Fe-S] [109], sin embargo existen casos en los que la oxidación de la enzima por peroxinitrito promueve la actividad catalítica como es el caso de la prostaglandina endoperoxidasa sintasa [127] y otras peroxidasa [128-130].

El efecto del peroxinitrito sobre la enzima se determina mediante su influencia en la actividad enzimática utilizando el parámetro IC₅₀ que se define como la concentración de oxidante capaz de inhibir en un 50 % la actividad enzimática inicial [123]. Sin embargo este valor no es absoluto ya que varía con la concentración enzimática, la estequiometría de la reacción con peroxinitrito y las constantes cinéticas de éste con los residuos críticos y no críticos en la enzima, sumado a que la especie inactivante puede ser uno de los radicales proveniente de la homólisis del peroxinitrito [109, 131].

1.3.3 Reactividad general del peroxinitrito

El peroxinitrito es estable en soluciones alcalinas en valores de pH por encima de 10, donde se encuentra en su forma aniónica (ONOO⁻). Cuando el pH se vuelve neutro o ácido se descompone rápidamente en forma exponencial, con una constante cinética de 0.9 s⁻¹ (pH 7.4, 37 °C) que aumenta con la temperatura y disminuye con el pH [115, 132].

En presencia de moléculas blanco, el peroxinitrito puede reaccionar en forma directa o en forma indirecta a través de los productos derivados de su descomposición (reacción 2) y de esta manera promover diferentes efectos a nivel biológico [110].



Reactividad directa

La reacción directa entre el peroxinitrito y una molécula blanco puede ocurrir mediante la oxidación por uno o dos electrones. Cuando la oxidación ocurre por dos electrones la molécula de peroxinitrito (ONOO^- o ONOOH) reacciona con una cinética de segundo orden que depende de la concentración de la molécula blanco, de modo que la constante aparente de descomposición de peroxinitrito aumenta en forma lineal con la concentración de ésta (figura 7, reacciones I y II) [109, 110]. Este tipo de reacciones ocurren con centros metálicos como los que presentan las porfirinas de manganeso sintéticas [133], centros metal-sulfurados (Fe-S o Zn-S) [123, 134] y los grupos hemo en diferentes peroxidasa [128] con constantes cinéticas de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o superior.

También reacciona en forma directa con tioles presentes en el sitio activo de ciertas peroxirredoxinas (ej: triparredoxina peroxidasa) en el orden $10^5 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ([135], y en aminoácidos libres, albúmina y glutatión, entre otros, con constantes cinéticas que se encuentran en el orden de $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [97, 136].

Muestra además reactividad directa con compuesto de selenio como los residuos selenocisteína, selenometionina, glutatión peroxidasa en un rango entre 10^3 y $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [137-139].

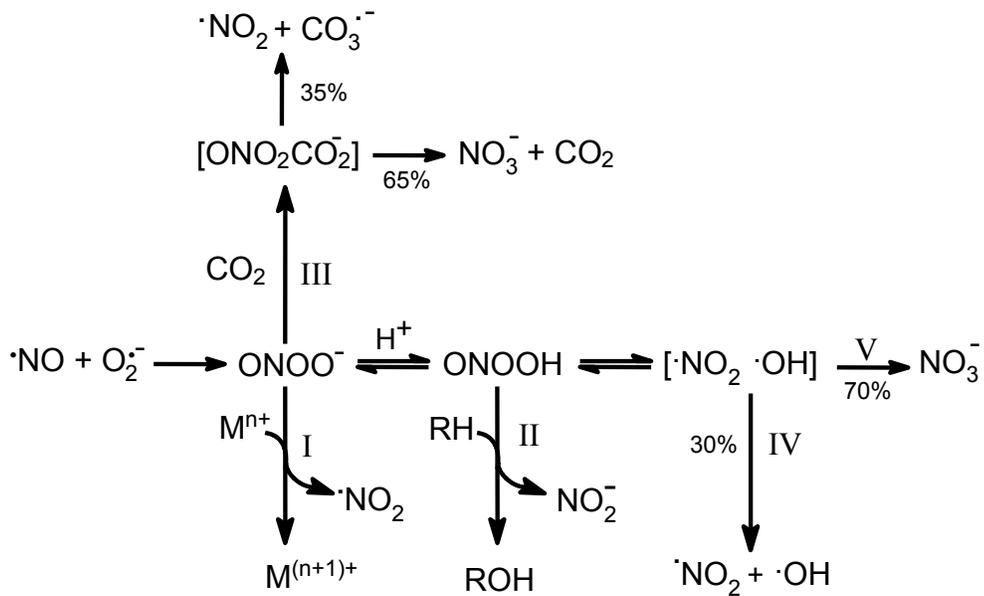
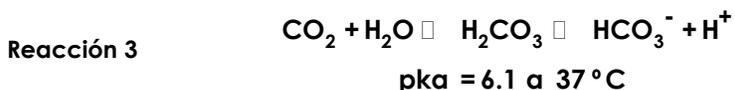


Figura 7. Reactividad directa e indirecta del peroxinitrito. El peroxinitrito en sistemas biológicos se produce principalmente a partir de la reacción entre $\cdot\text{NO}$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Una vez formado puede reaccionar directamente con centros metálicos por un electrón (reacción I) o mediante oxidación por dos electrones con metales u otros blancos moleculares (reacción II), o puede reaccionar con CO_2 (Ruta III). Una fracción del peroxinitrito (~30%) se homoliza generando $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ promoviendo oxidaciones por un electrón vía radicalar (Ruta IV). Esquema extraído de [110].

Reactividad mediada por dióxido de carbono

El peroxinitrito también es capaz de reaccionar directamente con el dióxido de carbono (CO₂) con una constante de segundo orden de 5.7 x 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ [140-142] a través de la formación de un aducto ONOOCO₂⁻ (1-carboxilato-2-nitrosodioxiانو o nitrosoperoxycarbonato) que se descompone rápidamente (<1 μs) para formar •NO₂ y radical carbonato (CO₃•⁻) con un 35 % de rendimiento [143], mientras el 65 % restante de los radicales formados se reorganiza para formar CO₂ y NO₃⁻ (figura 7, reacción III) [96, 144, 145]. Sin embargo el CO₂ no puede ser considerado un atrapador de peroxinitrito porque el aducto que forma no es una especie inerte ya que sus productos de homólisis, •NO₂ y CO₃•⁻, son mejores especies nitrantes capaces de aumentar los rendimientos de nitración de compuestos aromático en relación a las producidas por la homólisis de peroxinitrito [140, 142, 146-149].

El radical CO₃•⁻ además es capaz de oxidar biomoléculas con constantes cinéticas del orden de 10⁵-10⁸ M⁻¹ s⁻¹ [150, 151] redireccionando la reactividad del peroxinitrito. La reacción entre el peroxinitrito y el CO₂ es posible fisiológicamente ya que la concentración de éste en plasma es elevada (1.3 mM) y se encuentra en equilibrio con la concentración de bicarbonato (HCO₃⁻, 25 mM) formando un amortiguador cuyo pka es igual a 6.1 a 37 °C (reacción 3)[152].



Reactividad indirecta mediada por radicales

En ausencia de blancos directos, el peroxinitrito se isomeriza en un 70 % a NO₃⁻ y el 30 % restante se homoliza en las especies radicalares hidroxilo (•OH) y dióxido de nitrógeno (•NO₂) (figura 7, reacción IV) (Beckman, 1990). En este caso la reacción es de primer orden para el peroxinitrito e independiente de la concentración de la molécula blanco ya que el paso limitante es la formación de los radicales, aunque a veces esta relación es más compleja [132, 153, 154].

El radical •OH es un oxidante más potente pero menos selectivo que el •NO₂ y el CO₃•⁻, sin embargo dentro de un sistema biológico complejo existen múltiples blancos que pueden reaccionar directamente con el peroxinitrito, por lo que, en relación, la reactividad mediada por •OH es lenta y del peroxinitrito total formado *in vivo*, más del 95 % es capaz de reaccionar directamente con diferentes biomoléculas, mientras que menos del 5 % reacciona como •OH y •NO₂ [110, 119].

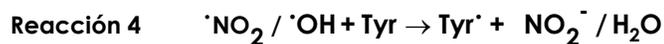
Nitración proteica mediada por peroxinitrito

El peroxinitrito es capaz de promover la nitración de residuos aromáticos, incorporación de un grupo nitro ($-\text{NO}_2$), principalmente tirosina y triptofano presentes en las proteínas, así como residuos de guanina en el ADN y de cadenas alifáticas en ácidos grasos [119]. A 25°C el rendimiento de la nitración, cuantificada como 3-nitrotirosina en relación al peroxinitrito presente es de 6-8 % [155]. La nitración de tirosina no afecta la velocidad de descomposición del peroxinitrito y rinde además ditirosina e hidroxitirosina y todos son resultado de un mecanismo radicalar [156, 157].

El mecanismo consiste en la oxidación por un electrón del aromático (ej: Tyr) por parte del $\cdot\text{OH}$ o el $\cdot\text{NO}_2$ generando el radical tirosilo ($\text{Tyr}\cdot$) y una molécula de agua o NO_2^- respectivamente (reacción 4).

El radical tirosilo formado es capaz de reaccionar con el $\cdot\text{NO}_2$ para dar el producto final 3-nitrotirosina (reacción 5) con una constante cinética de $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [158]. A su vez dos radicales $\text{Tyr}\cdot$ pueden reaccionar entre sí para dar la 3,3'-ditirosina (reacción 6) con una constante de $4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [159].

Debido a que el $\cdot\text{OH}$ prefiere adicionarse al anillo aromático en lugar de extraer un electrón el rendimiento de radical tirosilo por su reacción con $\cdot\text{OH}$ es inicialmente del 5 %, siendo el radical hidroxitirosilo ($\text{TyrOH}\cdot$) el producto mayoritario. Sin embargo éste puede rearrreglarse en un radical tirosilo y una molécula de agua aumentando el rendimiento de tirosilo o puede unirse a otro hidroxitirosilo y formar hidroxitirosina. La reacción con la Tyr para formar el radical tirosilo de todos modos es muy rápida ($1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [160]



A pesar de que el peroxinitrito es un mal agente nitrante, su rendimiento de nitración aumenta por su reacción con CO_2 o por la presencia de centros metálicos de proteínas [119] como se explicará más adelante.

Si bien la nitración proteica en un sistema biológico no es un proceso exclusivo de la presencia de peroxinitrito [161, 162] el uso de ciertos compuestos que modulan la producción de óxido nítrico (inhibidores de la NOS o atrapadores de $\cdot\text{NO}$) o superóxido (miméticos de SOD o atrapadores de $\text{O}_2\cdot^-$) o atrapadores de peroxinitrito, ha permitido concluir que la formación *in vivo* de peroxinitrito aporta a la nitración proteica [163-165].

1.3.4 Reactividad del peroxinitrito con aldehídos

Conociendo la reactividad que posee el peroxinitrito con el CO_2 , mediante la formación del aducto ONOOCO_2 , se postuló que el carbono carbonílico de un aldehído podría formar un aducto similar, el 1-hidroxialquilperoxinitrito (ONOOC(OH)R) [166]. Dentro de los sistemas biológicos los grupos aldehídos tienen localización ubicua formando parte de intermediarios metabólicos clave o de enzimas (ej: gliceraldehído-3-fosfato, piridoxal-5'-fosfato, retinal, acetaldehído) [167] o como productos del metabolismo de xenobióticos y lipoperoxidaciones lipídicas [168-170].

Los aldehídos de cadena corta, así como los hidroxí y cetoaldehídos son capaces de reaccionar directamente con el peroxinitrito, acelerando su descomposición con constantes cinéticas en rangos entre $10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (a 25°C y pH 7.4) [166], siendo la especie reaccionante el peroxinitrito anión (ONOO^-). Si bien el producto mayoritario de esta isomerización asistida por aldehídos es el NO_3^- , cierto porcentaje del aducto ($\sim 29\%$) se descompone en especies radicalares como los radicales metilo, formiato y acetato [171].

El aducto 1-hidroxialquilperoxinitrito en concentraciones saturantes de aldehído es un mal mediador de la nitración de aromáticos, obteniéndose un porcentaje menor al 1% de aromáticos nitrados, a diferencia del aducto formado con CO_2 donde el porcentaje de nitración es del 20% [142].

Es posible que en condiciones biológicas los aldehídos no compitan bien por el peroxinitrito con el CO_2 , ya que éste se encuentra en mayor concentración (1.3 mM o superior) y su constante cinética es de 40 a 300 veces superior ($k \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [140, 141] a la determinada para la formación del aducto con diferentes aldehídos.

1.3.5 Reactividad del peroxinitrito con hemotiolatos proteicos

Las proteínas hemo-tiolato constituyen un grupo de hemoproteínas cuyo grupo prostético es un protohemo que posee como ligando axial el anión tiolato de un residuo de cisteína. Un grupo grande y representativo de este tipo de proteínas son los denominados citocromo P_{450} (CyP_{450}) entre las que se encuentra la óxido nítrico sintasa y la cloroperoxidasa de *Caldaryomyces fumago*, y en otro grupo la CBS, el factor transcripcional *CooA* de *Rhodospirillum rubrum* y la $\text{IF}_2\alpha$ -kinasa. Entre sus funciones se encuentran la de sensores de CO y NO (*CooA* y $\text{IF}_2\alpha$ -kinasa) y la monooxigenación o halogenación de sustrato (CyP_{450} y cloroperoxidasa), no siendo tan clara aún la función en el caso de la CBS [172].

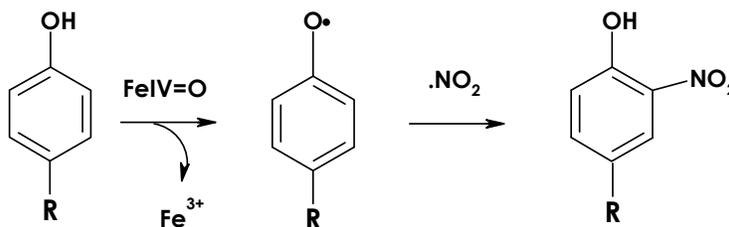
Como se mencionó anteriormente el peroxinitrito es capaz de reaccionar con tioles proteicos [136], siendo el residuo cisteína de un hemotiolato un blanco potencial. Por otro lado los metales de transición dentro de grupos prostéticos (ej: hemo) también son capaces de reaccionar rápidamente con el peroxinitrito, directamente o mediante la formación de radicales que a su vez tienen preferencia por residuos azufrados (Cys y Met) y aromáticos (Tyr y Trp). La interacción entre el peroxinitrito y los metales de transición sin embargo es compleja y depende de la constitución del grupo prostético y del entorno generado por los aminoácidos proteicos [173].

En forma directa el peroxinitrito reacciona mediante la formación de un aducto con el metal de transición de tipo $M^{n+}-ONOO^-$, que se homoliza para dar $\cdot NO_2$ y el correspondiente oxiradical ($M^{n+}-O\cdot$), que a su vez puede rearrreglarse en el oxocompuesto $M^{(n+1)+}=O$ (reacción 7). Este oxocompuesto puede ser reducida por algún reductor fisiológico como el glutatión o el ascorbato, o puede reaccionar con un residuo crítico conduciendo, por ejemplo, a la pérdida de la actividad enzimática (Alvarez, 2003).



Estos oxidantes secundarios formados a nivel del centro metálico pueden oxidar o nitrar preferentemente residuos aromáticos. El anillo fenólico de estos residuos es oxidado fácilmente por un complejo tipo ferrilo ($Fe^{IV}=O$) generando un radical que es rápidamente atacado por el $\cdot NO_2$ en la posición 3 (reacción 8) [174].

Reacción 8



Esto fue inicialmente observado en la enzima prostaciclina sintasa, una proteína hemotiolato, que luego de exponerse a peroxinitrito presentaba reacción positiva con anticuerpos antinitrotirosina [175, 176]. La nitración observada era acompañada por una inhibición de la actividad enzimática cuyo IC_{50} era del orden submicromolar. Para explicar la alta selectividad por la nitración de esta enzima, se usaron modelos químicos que sugerían la nitración de una Tyr

en el sitio activo luego de la formación del ferrilo correspondiente a la descomposición homolítica del peroxinitrito [177, 178]. Estos oxocompuestos fueron posteriormente detectados mediante espectros UV-Vis en la hemoproteína cloroperoxidasa ya que presentaban un máximo a 435 nm [179].

La nitración promovida por centros metálicos ha sido comprobada además en otras proteínas de tipo hemotiolato como citocromo P450_{BM-3} (monooxigenasa-3-bacteriana), citocromo P450_{CAM} (camfor-5-monooxigenasa) y citocromo P450_{NOR} (NADH-NO reductasa) [174, 180].

El ácido peroxinitroso (ONOOH) oxida por un electrón y en forma reversible al citocromo c, un hemo hexacoordinado, en estado reducido (cit c²⁺), mientras que en estado oxidado (cit c³⁺) no reacciona. La reversibilidad de la oxidación por reductores como el ascorbato muestra que el hemo permanece íntegro. Esto no se observa cuando se expone el citocromo c reducido a otro tipo de oxidantes, ni cuando se expone aconitasa a peroxinitrito, ya que la oxidación en este caso produce la destrucción del hemo y del centro ferrosulfurado respectivamente [123, 181]. Sin embargo, en términos de nitración mediada por peroxinitrito ocurre lo contrario ya que en este caso es el citocromo oxidado más extensamente nitrado en un residuo de tirosina próxima al hemo [181, 182].

En el caso de la iNOS, una proteína hemotiolato pentacoordinada, se observa que el peroxinitrito anión (ONOO⁻) es capaz de oxidar a la enzima por un electrón produciendo su inactivación. Esta pérdida de actividad ocurre tanto por la nitración de residuos críticos de Tyr, que también se ha observado en otras hemoproteínas [174, 180], como por la oxidación de ciertos residuos claves (Cys, Met). En este caso al igual que con el citocromo c, no se observa destrucción del grupo hemo aunque su entorno se modifica [183]. El peroxinitrito también puede oxidar por dos electrones un centro metálico reducido, produciendo un oxo-radical u oxo-compuesto, acompañado por la formación en este caso de nitrito (NO₂⁻) en lugar de *NO₂ como es el caso de la porfirina de manganeso reducida MnTE-2-PyP [184].

1.3.6 Herramientas para el estudio de la reactividad del peroxinitrito

El estudio de la cinética de reacción entre el peroxinitrito y una molécula de interés se puede abordar en forma directa o indirecta.

Dada la breve vida media del peroxinitrito de 0.77 s (pH 7.4 y 37 °C), el estudio cinético directo debe realizarse con técnicas especiales. El método más utilizado es la espectrofotometría anexada a un dispositivo de flujo detenido que sigue las variaciones en la absorbancia a una determinada longitud de onda donde los cambios se deban únicamente a una de las especies

que participan de la reacción. En general se trabaja a 302 nm donde se sigue la descomposición de peroxinitrito. El análisis posterior de los datos obtenidos se realiza mediante ajustes aplicando el método de velocidades iniciales o el método integral según corresponda [97, 128, 185].

En forma indirecta se pueden realizar estudios de competencia para determinar la cinética de una reacción en la que participa el peroxinitrito. Estos estudios se basan en el principio de que en reacciones paralelas donde participa el peroxinitrito, se generan productos diferentes cuya relación de concentraciones es igual a la relación entre sus constantes cinéticas. Para ello se requiere conocer la reactividad del atrapador que compite con nuestra molécula de interés por el peroxinitrito, el o los productos formados deben ser cuantificables, el atrapador no debe reaccionar con la molécula de interés y la concentración de ésta debe estar en el mismo orden que la del atrapador y en exceso con relación a la concentración de peroxinitrito para minimizar la homólisis y fuga de radicales [123, 186].

HIPÓTESIS

El aumento en la concentración plasmática de la homocisteína constituye un factor de riesgo independiente en enfermedades cardiovasculares en general y aterosclerosis en particular. En este sentido, las alteraciones en el metabolismo de la homocisteína se encuentran parcialmente asociadas a deficiencias en el normal funcionamiento de la CBS. Estas deficiencias pueden ser de origen genético o de origen funcional.

La teoría oxidativa de la aterosclerosis postula la existencia de un desbalance entre la formación de especies reactivas del nitrógeno y oxígeno, y las defensas antioxidantes. En particular, se ha establecido que durante la aterogénesis la disminución en la concentración de $\cdot\text{NO}$ se debe en parte a su reacción con $\text{O}_2^{\cdot-}$, cuya concentración está aumentada en esta patología así como en diabetes mellitus e hipertensión [39], de lo que resulta la formación local de peroxinitrito [187, 188].

La formación *in vivo* de peroxinitrito en diferentes tejidos y en particular en endotelio vascular ha sido comprobada por la presencia de biomarcadores estables como la 3-nitrotirosina mediante el uso de los anticuerpos correspondientes [189].

La CBS posee un centro ferroporfirínico que podría reaccionar rápidamente con el peroxinitrito de acuerdo a datos reportados anteriormente para otras hemoproteínas [128, 182, 190]. Otro blanco posible podría ser el PLP, ya que ha sido demostrado que el peroxinitrito es capaz de reaccionar directamente con carbonilos [166, 191]. Conocer su reactividad en esta enzima es relevante en términos generales dada la abundancia de enzimas dependientes de PLP y la diversidad de procesos en los que participan. Además en la estructura tridimensional de la CBS, un residuo tirosina (Tyr 233) y un triptofano (Trp 54) muy próximos al hemo podrían ser potencialmente nitrables por el peroxinitrito.

Cuando el organismo se enfrenta a algún tipo de estrés oxidativo, como el que se postula para la aterogénesis ocurre un desbalance de las especies reactivas del nitrógeno y el oxígeno donde entre otras especies, se origina un exceso de radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ principalmente a nivel mitocondrial que supera las defensas antioxidantes celulares. Además es estimulada la síntesis de $\cdot\text{NO}$ por acción de la NOS inducible (iNOS) en distintos tipos celulares como hepatocitos, macrófagos y neutrófilos. Es entonces altamente probable que ocurra formación de peroxinitrito en el hígado, principal tejido donde se expresa la CBS. En esas condiciones fisiopatológicas la concentración plasmática de homocisteína en niveles elevados ha mostrado una correlación directa e independiente con la existencia de aterosclerosis, aunque hasta el momento ese aumento no ha podido ser explicado en forma clara.

Estudios preliminares realizados en el laboratorio de la Dra. R. Banerjee (Universidad de Nebraska, Lincoln, Nebraska, E.E.U.U.) con CBS expuesta a peroxinitrito mostraron cambios espectrales a nivel del hemo en la enzima oxidada y reducida así como inactivación enzimática dependiente en ambos casos de la concentración de peroxinitrito.

Por lo expuesto anteriormente es posible entonces que existan interacciones entre las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno y las enzimas del metabolismo de la homocisteína durante el proceso de aterogénesis.

En el siguiente trabajo se caracterizará la interacción entre la CBS y el peroxinitrito mediante experimentos *in vitro* como forma de contribuir al entendimiento de los procesos que podrían causar el aumento en la concentración de homocisteína observado en etapas tempranas del desarrollo de la aterosclerosis.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender la reactividad del peroxinitrito con la cistationina β -sintasa en el marco de las potenciales interacciones entre las especies reactivas y el metabolismo de la homocisteína.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CBS DIMÉRICA

- Se expresará y purificará la enzima recombinante humana (CBS Δ 143) en *E. coli*, se determinará la actividad enzimática, el contenido de tioles accesibles y piridoxal-5'-fosfato presente en la enzima purificada.

CARACTERIZACIÓN DE LA INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POR PEROXINITRITO

- Se estudiarán las modificaciones en la CBS por su interacción con el peroxinitrito, particularmente a nivel del PLP y el grupo hemo mediante medidas de actividad enzimática, electroforesis en geles SDS-PAGE, western blot, el registro de espectros UV-Vis y de fluorescencia.
- Se determinará la cinética de reacción entre la CBS y el peroxinitrito mediante la técnica de flujo detenido y experimentos de competencia.

3 MÉTODOS

3.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CBS Δ 143

La CBS Δ 143 humana se purificó a partir de un sistema de expresión recombinante que genera una proteína de fusión con glutatión *S*-transferasa [48]. La cepa de *E. coli* BL-21 (DE3) conteniendo el plásmido pGEXCBSN que codifica para la enzima dimérica carente de 143 aminoácidos en el extremo C-terminal fue donado por la Dra. R. Banerjee (Universidad de Nebraska, Lincoln, Nebraska, E.E.U.U.). La purificación se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente [24] con algunas modificaciones.

3.1.1 Expresión

Las cepas de *E. coli* transformadas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) conteniendo 75 μ g/mL de ampicilina con agitación moderada a 37 °C hasta obtener una Abs₆₀₀ de 0.8-1. Una vez alcanzado ese valor se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG (0.1 mM) en presencia de δ -ALA (75 mg/L) en condiciones de baja agitación a 25 °C durante 16–18 h para favorecer su correcta expresión.

3.1.2 Extracción

El cultivo obtenido se centrifugó y las células se resuspendieron en una solución amortiguadora (solución A) conteniendo Tris (50 mM, pH 8), β -mercaptoetanol (14 mM), EDTA (10 mM), benzamidina (200 mg/L), TLCK (20 mg/L), aprotinina (1 mg/L), leupeptina (1 mg/L) y pepstatina (1 mg/L). Las células se lisaron por sonicación en 30 ciclos de 20 s a máxima potencia con 20 s de descanso entre ciclos para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. El procedimiento se realizó por duplicado con un paso intermedio de congelamiento a -80 °C para mejorar la lisis celular. Posteriormente se agregó lisozima (0.3 mg/mL), DNAsa (0.15 mg/mL), CHAPS (0.2 %), PLP (0.1 mg/mL) y MgCl₂ (20 mM), se agitó durante 90 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante con una coloración rojiza propia del grupo hemo de la CBS, por centrifugación a 10000 g durante 30 min a 4 °C. Para mejorar la extracción y recuperación de la enzima, en algunas preparaciones se agregó un 0.05 % de polietilenimina, polímero catiónico que se une al ADN facilitando su separación por centrifugación [134].

3.1.3 Cromatografía de intercambio aniónico

En esta etapa se utilizó una columna de Q-Sepharose (Amersham) de flujo rápido como fase estacionaria con un volumen de lecho de 30 mL, se equilibró con amortiguador Tris (10 mM, pH 8), se sembró la muestra y se lavó la columna con solución A.

Tanto en esta cromatografía como en las siguientes se controló que la conductividad de la muestra a sembrar fuera igual o menor a la de la solución con la que se equilibró cada columna para optimizar su retención. En los casos necesarios se disminuyó la conductividad de la muestra por dilución con agua milliQ.

La elución se realizó generando un gradiente de fuerza iónica creciente (0 a 0.5 M de NaCl) con una velocidad de flujo de 4-6 mL/min. La solución contenía además Tris (10 mM, pH 8), PLP (25 mg/L), EDTA (2 mM) y β -mercaptoetanol (14 mM). Se recolectaron las fracciones con coloración rojiza y aquellas en las que se confirmó la presencia de la enzima por absorbancia a 429 nm fueron conservadas para el siguiente paso de purificación.

3.1.4 Cromatografía de afinidad con glutatión

La CBS Δ 143 expresada como proteína de fusión con glutatión *S*-transferasa (GST) brinda una buena herramienta para su purificación mediante una cromatografía de afinidad muy eficiente donde el dominio GST de la enzima recombinante reconoce el glutatión unido a la resina.

Se utilizaron dos columnas con un volumen de lecho de 8.3 mL cada una, conectadas en serie y conteniendo la resina de afinidad GSH-Sepharose 4B (Amersham). Las columnas se equilibraron con PBS 1X (buffer fosfato salino) y luego de sembrar la muestra se lavaron con una solución conteniendo PBS 1X, β -mercaptoetanol (1mM) y EDTA (2 mM). La elución se realizó con GSH (10 mM) en Tris (50 mM, pH 8), β -mercaptoetanol (1mM) y EDTA (2 mM).

3.1.5 Proteólisis limitada con trombina

La proteólisis limitada con trombina (proteasa de serina endolítica) permite escindir el dominio GST de la proteína de fusión, obteniendo de esta forma la CBS Δ 143 por un lado y el dominio GST por otro. La muestra con una concentración proteica entre 1-2 mg /mL se expuso a trombina a 25 °C y pH 8.3, en agitación continua durante toda la noche. En todas las purificaciones fue necesario concentrar previamente en un ultrafiltrador (Amicon, Millipore) y

cuantificar el contenido proteico. La proteólisis se realizó en presencia de DTT (2 mM) y PLP (30 μ M) agregando 3 U de trombina (Amersham o Sigma) por mg de proteína. Al finalizar la incubación se realizó una electroforesis para controlar la eficiencia del corte.

3.1.6 Segunda cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó una columna conteniendo DEAE (dietilaminoetil) Sepharose CL6B de flujo rápido, intercambiador aniónico débil que permite detener la proteólisis con trombina mediante su separación de la enzima así como eliminar el dominio GST y el GSH de la muestra.

La columna se equilibró con amortiguador fosfato (15 mM, pH 7.2) y después de sembrar la muestra se lavó con el mismo amortiguador conteniendo además DTT (2 mM) y EDTA (1 mM). La elución se realizó mediante un gradiente de fuerza iónica creciente entre 15 y 300 mM de amortiguador fosfato (pH 7.2) conteniendo DTT (1 mM) y EDTA (2 mM).

3.1.7 Segunda cromatografía de afinidad

Nuevamente la muestra se sembró en la columna GSH-Sepharose en iguales condiciones que en el punto 1.1.4. ahora para eliminar la proteína de fusión CBS-GST sin digerir que pudiera permanecer en la muestra. En este caso se recogió el eluido conteniendo la CBS Δ 143 escindida del dominio GST.

3.1.8 Concentración de la enzima obtenida

La enzima obtenida se lavó exhaustivamente con amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.2) para eliminar tioles presentes (principalmente DTT), se concentró en ultrafiltrador y se conservó a -80°C .

3.1.9 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Al finalizar cada etapa de la purificación se tomaron alícuotas para realizar una electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida (10 %) en condiciones desnaturizantes y reductoras (4 % SDS y 10 % β -mercaptoetanol) para visualizar la eficacia de la inducción y el avance de la purificación.

La electroforesis se realizó siguiendo el método de Laemmli [192] utilizando un dispositivo Hoefer Mighty Small SE245 y Hoefer Mighty Small II para geles de 8-7 cm (Amersham Pharmacia Biotech). Como marcador de peso molecular se utilizó una solución conteniendo glucosa oxidasa

(PM 80 kDa, 6.8 mg/mL), BSA (PM 66.4 kDa, 3.4 mg/mL), HRP (PM 44 kDa, 6.8 mg/mL) y lisozima (PM 14.6 kDa, 6.8 mg/mL). Los geles se corrieron a intensidad constante (30 mA por gel) y las proteínas fueron reveladas mediante tinción con colorante azul de Coomassie (Blue G-250). La decoloración se realizó con una solución conteniendo 10 % de ácido acético, 45 % metanol y 45 % de agua.

3.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El método colorimétrico utilizado se basa en la formación de un producto coloreado entre la cistationina y la ninhidrina que posee una absorción máxima a 453 nm [193]. La reacción enzimática se realizó a pH 8.6 donde la enzima presenta actividad máxima [24, 193, 194].

A una mezcla de reacción conteniendo Tris (100 mM, pH 8.6), PLP (0.25 mM), BSA (0.5 mg/mL), L-Ser (30 mM) y CBS (entre 0.4 y 0.7 μ M) en un volumen final de 200 μ L, se agregó D,L-Hcy (30 mM) para iniciar la reacción. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y la reacción se detuvo con el agregado de 25 μ L de TCA 45 %. Las proteínas fueron removidas por centrifugación a 5590 g y 4 °C durante 10 min. A 50 μ L del sobrenadante se agregaron 950 μ L del reactivo de ninhidrina. La mezcla se calentó 5 min a 100 °C y se enfrió en baño de hielo durante 2 min. La lectura a 453 nm se realizó luego de 20 min a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color. Se realizaron además dos controles, uno con el reactivo de ninhidrina y amortiguador (blanco #1) y otro con todos los reactivos en ausencia de enzima, para considerar su contribución a 453 nm (blanco #2). Para el cálculo de cistationina producida en presencia de la enzima se restó la absorbancia obtenida a la del blanco #2.

La cistationina formada se cuantificó previa realización de una curva de calibración en un rango de concentraciones entre 0 y 0.4 mM de cistationina, en un volumen total de 1 mL conteniendo 950 μ L de ninhidrina, que se realizó en el día y previo al ensayo de actividad con la enzima.

Una unidad (U) de actividad enzimática de CBS se define como la cantidad de enzima necesaria para la formación de 1 μ mol de cistationina por hora a 37 °C, y la actividad específica de la enzima se expresó en U mg⁻¹ de proteína.

Preparación del reactivo de ninhidrina

El reactivo de ninhidrina se preparó disolviendo 1g de ninhidrina en 100 mL de ácido acético glacial al que se agregó 1/3 del volumen anterior (33.3 mL) de H₃PO₄ 85% [193].

Preparación de homocisteína

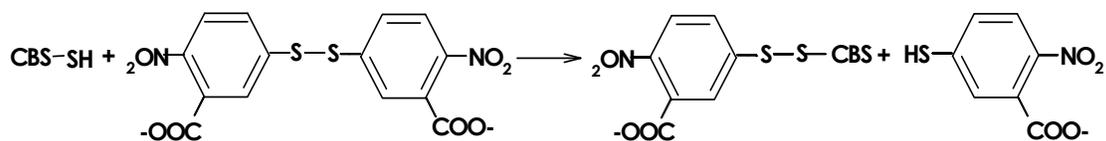
Para preparar 1 mL de D,L-homocisteína 200 mM, se disolvieron 0.2 mmoles de D,L-HCy tiolactona en 0.2 mL de NaOH 5 M, se incubó 5 min a 37 °C y el pH se ajustó a un valor de 8.6 con HCl 2 M. Luego se agregó Tris-HCl (100 mM, pH 8.6), DTT (20 mM) y agua hasta completar volumen [195].

3.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA

La concentración proteica se determinó por el método de Bradford, midiendo la absorbancia a 595 nm y utilizando albúmina bovina (BSA) como estándar [196]. La curva de calibración se realizó dentro de un rango lineal de concentraciones entre 0 y 10 µg/mL de BSA y en simultáneo con la determinación de las muestras.

3.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TIOLES REDUCIDOS EN LA ENZIMA

El contenido de cisteínas reducidas presentes en la enzima se cuantificó mediante el método de Ellman con modificaciones utilizando DTNB [197]. La reacción entre tioles reducidos y DTNB libera TNB que absorbe a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) siguiendo el esquema:



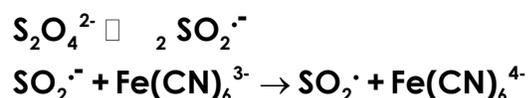
El stock de DTNB 2 mM se preparó en amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.2) inmediatamente antes de su uso, ya que su hidrólisis espontánea genera TNB que interfiere en la cuantificación. En el tubo de reacción se colocó CBS (5 µM), DTNB (200 µM) y amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.2). Se preparó además un tubo control sin enzima en iguales condiciones y ambos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras fueron ultrafiltradas en centricones Biomax 5K (Millipore) a 4 °C durante 10 min a 5590 g para eliminar la interferencia de la absorbancia característica de la CBS en la medida a 412 nm. El TNB liberado se cuantificó en la fracción de menor peso molecular restando la absorbancia obtenida para el tubo en ausencia de enzima.

El punto final de la reacción entre la CBS y el DTNB fue previamente determinado a partir de un seguimiento temporal registrando la absorbancia a 412 nm a intervalos regulares de 10 min durante 1 hora, en este caso sin ultrafiltrar la enzima.

3.5 OBTENCIÓN DE LA ENZIMA REDUCIDA

La enzima obtenida luego de la purificación posee su grupo hemo oxidado como Fe (III) con un máximo de absorción típico a 429 nm y su reducción a Fe(II) produce un corrimiento del máximo hacia el rojo (449 nm).

La reducción del hemo se realizó con ditionito de sodio [56] en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4) con DTPA (0.2 mM) previamente desoxigenado con N₂. El ditionito de sodio (200 mM) se preparó en NaOH 0.1 N degaseada y se cuantificó con ferricianuro de potasio (K₃Fe(CN)₆) a 420 nm ($\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) {Schellenberg, 1958 #8) de acuerdo a la siguiente reacción:

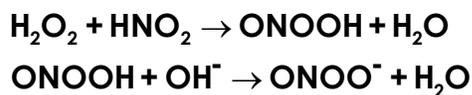


En la reacción se asume una estequiometría 1:2 considerando que el reductor es la especie dióxidosulfato (-1) (SO₂^{·-}), producto de la disociación del ditionito de sodio {Balahura RJ, 1987 #10}. Debido a su rápida autooxidación la concentración de ditionito se controló al inicio y al final de experimento.

El reductor se agregó en una concentración conocida (1 mM) y en exceso con relación a la enzima para asegurar su reducción total, comprobada en el espectro de absorción UV-Vis por el corrimiento del máximo correspondiente a la banda γ de Soret de 428 a 449 nm.

3.6 PREPARACIÓN DE PEROXINITRITO

El peroxinitrito fue sintetizado por la Dra. B. Alvarez en el Laboratorio del Dr. R. Radi (Facultad de Medicina) según metodología descrita anteriormente [97, 198, 199]. Brevemente, el peroxinitrito se preparó a partir de NaNO₂ y H₂O₂ en HCl mediante un sistema simple de flujo constituido por jeringas conteniendo los reactivos. Por movimiento de un émbolo en forma mecánica se mezclaron cantidades equivalentes de H₂O₂ con NaNO₂ en un mezclador eficiente de acuerdo a la siguiente reacción:



El ácido peroxinitroso formado (ONOOH) es muy inestable por lo que debió ser estabilizado con NaOH para su conservación como anión peroxinitrito (ONOO⁻). Este método genera un producto de alta fuerza iónica con H₂O₂, NO₂⁻ y NO₃⁻ como contaminantes. El contenido de NO₂⁻ fue cuantificado y resultó menor a 0.25 moles de NO₂⁻/mol de peroxinitrito y el exceso de H₂O₂ fue removido con MnO₂. Se obtuvo un stock de peroxinitrito con una concentración superior a 100 mM determinada por espectrofotometría a 302 nm en NaOH 0.1 M ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [200, 201]. El total del volumen obtenido se conservó alicuotado (500 μL) a -80°C .

Antes de cada uso se descongeló la cantidad necesaria de peroxinitrito, se cuantificó, utilizó y descartó el remanente.

3.7 EXPOSICIÓN DE LA ENZIMA A PEROXINITRITO

En todos los experimentos en los que se utilizó CBS $\Delta 143$ tratada con peroxinitrito se procedió como se describe a continuación. La enzima se colocó en la concentración deseada con amortiguador fosfato del pH y concentración apropiada según el diseño experimental y conteniendo DTPA (0.1 mM). La mezcla se termostatóizó durante 2 min a 37°C , se agregó el peroxinitrito manteniendo una agitación continua en vortex para asegurar un buen contacto con la enzima antes de su descomposición ($k = 0.9 \text{ s}^{-1}$)[132] y luego la muestra se incubó 2 min adicionales a 37°C previo a la realización de cada experimento.

El agregado de peroxinitrito se realizó de dos formas diferentes según el diseño del experimento: en bolos o en alícuotas. El agregado en bolos se realizó en tubos independientes donde la enzima se expuso a una única concentración de peroxinitrito. El agregado en alícuotas se realizó sobre una misma muestra de enzima que se expuso a volúmenes pequeños y sucesivos de concentración conocida, logrando que una misma muestra de enzima viera concentraciones crecientes de peroxinitrito y no una única concentración en cada caso.

Para minimizar el efecto del NaOH en el que se encuentra peroxinitrito sobre el pH final de la mezcla de reacción en todos los casos se consideró que el volumen agregado fuera igual o menor al 5 % del volumen final.

El amortiguador fosfato utilizado en los experimentos con peroxinitrito fue preparado a partir de sus sales (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻) evitando la utilización de NaOH en el ajuste del pH. Se minimiza de esta forma el aporte de carbonatos presentes en el NaOH y por lo tanto de CO₂ que reacciona con peroxinitrito acelerando su descomposición [149, 202].

Control de adición reversa

El ensayo de adición reversa consiste en agregar en orden inverso los reactivos a la mezcla de reacción. Este control permite descartar la contribución de contaminantes y productos de descomposición (principalmente NO_2^- y H_2O_2) presentes en preparaciones de peroxinitrito. Para ello se preincubó el peroxinitrito en la máxima concentración ensayada en amortiguador a 37 °C durante 2 min para asegurar su descomposición. Luego se agregó la enzima en agitación continua con vortex y se incubó la mezcla por 2 min adicionales.

3.7.1 Exposición a peroxinitrito en presencia de bicarbonato

La enzima se expuso a peroxinitrito en amortiguador fosfato (0.1 M) con DTPA (0.1 mM) en presencia de 25 mM de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Debido a que el agregado de NaHCO_3 a un amortiguador produce un aumento del valor de pH [203], se preparó un amortiguador fosfato (0.1M) con un pH inicial de 6.9 que considera el cambio de pH al introducir 25 mM de NaHCO_3 de modo que el pH final sea igual al de las muestras en ausencia de NaHCO_3 (pH 7.4). Luego del agregado de NaHCO_3 se controló el valor del pH final para asegurar que la enzima se encuentre a un mismo pH en todas las condiciones del ensayo.

3.7.2 Exposición a peroxinitrito en presencia de atrapadores

Existen numerosos compuestos capaces de reaccionar tanto *in vivo* como *in vitro* con el peroxinitrito o sus productos de descomposición. Su eficacia depende de su concentración y de la constante cinética de segundo orden con la especie con la que reacciona [204].

Para estudiar el efecto de los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ generados a partir de la descomposición de peroxinitrito sobre la actividad de la CBS en un volumen final de 1 mL se expuso CBS (5 μM) a 400 μM de peroxinitrito en presencia de diferentes atrapadores de estos radicales: manitol (100 mM), p-HPA (90.9 mM) y trolox (30.3 mM). Las soluciones concentradas de manitol y p-HPA fueron preparadas en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM). El trolox se disolvió inicialmente en fosfato dibásico y luego se ajustó el pH a 7.4 con el agregado de DTPA (0.1 mM) para prevenir su autooxidación.

3.8 EFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA BANDA DE TRANSFERENCIA DE CARGA LIGANDO-METAL DE LA ENZIMA

La coordinación entre el Fe(III) del grupo hemo y el ligando axial Cys₅₂ se evidencia mediante la presencia de dos máximos a 645 nm y 703 nm que se visualizan a altas concentraciones de enzima (80 µM o mayor). Para estudiar el efecto del peroxinitrito en esta región espectral la enzima disponible debió ser previamente concentrada en centricones Biomax 5K a 4 °C y 5590 g durante 10 min.

Se colocaron 200 µL de CBS concentrada (123 µM) en la celda y se registró el espectro entre 270 y 750 nm. Posteriormente a la misma muestra se agregaron pequeñas alícuotas de peroxinitrito en concentraciones crecientes hasta 8000 µM en la celda, minimizando los efectos por dilución de la muestra. El volumen agregado al finalizar el experimento fue de 34 µL (14 % de dilución).

3.9 CUANTIFICACIÓN DEL COFACTOR PLP LIBERADO DE LA ENZIMA EXPUESTA A PEROXINITRITO

La cuantificación del PLP liberado de la enzima se realizó por fluorescencia de la oxima correspondiente formada a partir de la reacción entre PLP enzimático e hidroxilamina (NH₂OH). La hidroxilamina induce la disociación reversible del PLP de la CBS y de otras enzimas dependientes de PLP [205]. En un volumen final de 1.5 mL se colocaron 0.5 mg de CBS (7.4 µM) tratada y sin tratar con peroxinitrito en amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) conteniendo 5 mM NH₂OH. La enzima se expuso en tubos independientes a 200, 500 y 800 µM de peroxinitrito y se incubó durante 70 h a 4 °C con agitación continua [23, 24, 49]. Luego las muestras se ultrafiltraron para eliminar la interferencia de la enzima en la medida de fluorescencia y la oxima se cuantificó en la fracción filtrada mediante espectros de emisión entre 380 y 600 nm con λ excitación de 353 nm (ancho de rendija 4 nm) a temperatura ambiente en un fluorímetro AMINCO-Bowman Series 2. La oxima presenta un único máximo de emisión a 442 nm por lo que se realizaron espectros de excitación a esa λ de emisión (ancho de rendija 8 nm) para descartar la posible formación de otras especies.

Para determinar la concentración de PLP liberado se realizó previamente una curva de calibración de oxima producida para un rango entre 0 y 10 µM PLP en amortiguador fosfato (0.1M, pH 7.4) tratado con 5 mM de NH₂OH.

3.10 EXPOSICIÓN DE PLP NO ENZIMÁTICO A PEROXINITRITO

Debido a que el PLP dentro de la enzima es clave para su actividad, se estudió la posible interacción entre PLP libre y peroxinitrito para luego comparar estos resultados con el PLP presente en la enzima. En la celda se colocó PLP 200 μM en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4) con DTPA (0.2 mM), se registró el espectro UV-Vis y agregaron alícuotas de peroxinitrito hasta una concentración final de 2 mM, minimizando la dilución de la muestra. Se realizó además otro experimento donde se expuso PLP 200 μM en tubos independientes a distintas concentraciones de peroxinitrito en bolos de concentraciones crecientes de 0 hasta 1 mM. El agregado de peroxinitrito al PLP en ambos casos se realizó en iguales condiciones que para la enzima como se describió en el punto 1.7.

3.11 ESTUDIO DE LA CINÉTICA RÁPIDA DE REACCIÓN

Los experimentos de cinética rápida se realizaron en un espectrofotómetro de flujo detenido con un tiempo de mezclado simétrico en dos jeringas menor a 2 ms y con una presión de 90 – 120 psi (Applied Photophysics, Leatherhead, England, SF.17 MV). En todos los casos se utilizó amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) y se midió el pH de la mezcla al inicio y al final de cada reacción para descartar posibles cambios por el NaOH presente en la solución de peroxinitrito. El ajuste de los registros cinéticos se realizó con el software provisto por el instrumento y la temperatura en la celda de reacción se mantuvo a 37.0 ± 0.1 °C.

La cinética de reacción entre el peroxinitrito y la enzima se siguió a 290 nm donde los cambios en la absorbancia se deben únicamente a la descomposición del peroxinitrito, ya que los cambios espectrales de la CBS a 290 nm por agregado de peroxinitrito son mínimos. Se trabajó con una concentración única de peroxinitrito (50 μM) y con concentraciones de enzima de 5, 10 y 15 μM .

Estudios preliminares de cinética rápida con concentraciones de 10 μM CBS y 260 μM peroxinitrito mostraron en el análisis espectral una disminución de la absorbancia a 429 nm correspondiente al hemo enzimático. Se siguieron entonces los cambios en la absorbancia a 429 nm para dos concentraciones de peroxinitrito (100 y 200 μM) y 5 μM de CBS para visualizar posibles cambios en el grupo hemo de la enzima por su reacción con el peroxinitrito.

Como método indirecto para determinar la constante cinética entre el peroxinitrito y la CBS se realizó un ensayo de competencia entre la enzima y cit c^{2+} reducido quien reacciona en forma directa con peroxinitrito [182]. El citocromo c^{3+} fue reducido con ditionito de sodio inmediatamente antes de su uso y el exceso de reductor fue eliminado por cromatografía en

Sephadex G-25 usando amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) para su elución. La concentración de cit c^{2+} fue determinada espectrofotométricamente a 550 nm en el mismo amortiguador ($\epsilon_{550 \text{ nm}} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se expuso cit c^{2+} (200 μM) a 100 μM de peroxinitrito en presencia y ausencia de CBS (167 μM) y se cuantificó el cit c^{+3} producido por disminución de la absorbancia a 550 nm del cit c reducido.

Para el estudio de la cinética de reacción entre el PLP y el peroxinitrito se siguieron los cambios de la absorbancia a 450 nm. Se eligió esta longitud de onda porque en los espectros UV-Vis correspondientes, el PLP presenta variaciones en su absorbancia a 450 nm por el agregado de peroxinitrito mientras que la absorción del peroxinitrito allí es nula.

Se realizó además un ensayo de competencia con cit c^{2+} siguiendo el mismo procedimiento que para la CBS, como se explicó en el punto 1.7.2. En este caso se expuso 400 μM de cit c^{2+} a peroxinitrito (100 μM) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de PLP (200, 400, 600 y 800 μM).

3.12 EFECTO DE LA CBS SOBRE LA NITRACIÓN DE TIROSINA LIBRE

Para estudiar el efecto del Fe(III) del hemo enzimático sobre la nitración de compuestos aromáticos se expuso Tyr libre (0.5 mM) a peroxinitrito (0.5 mM) en presencia y ausencia de CBS (10 μM).

La solución de Tyr se preparó en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) y su exposición a peroxinitrito se realizó como en el punto 1.7.

Las muestras se ultrafiltraron para eliminar la interferencia de la absorbancia característica de la CBS y se registraron los espectros UV-Vis de Tyr para cada muestra a pH 7.4, 5.5 y 10.5, siendo estos últimos ajustados con el menor volumen posible de HCl y NaOH respectivamente.

La nitrotirosina se cuantificó por su absorción a 430 nm en solución alcalina (pH 10-10.5) donde posee un máximo ($\epsilon_{430 \text{ nm}} = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [206].

Además se tomó una alícuota para la cuantificación por HPLC de la nitrotirosina formada a pH 7.4. La muestra se inyectó en una columna C18 de fase reversa con 6.5 % acetonitrilo, 0.1% TFA y 93.4 % H_2O como fase móvil en un sistema isocrático. La detección se realizó a 210 y 280 nm y a temperatura ambiente. El tiempo de elución para el estándar de tirosina fue de 6 min y para la nitrotirosina fue de 16 min.

3.13 ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

La CBS (5 μM) fue tratada con 10, 100 y 1000 μM peroxinitrito en presencia y ausencia de 25 mM NaHCO_3 como se describió en el punto 3.7 y fue analizada en geles de poliacrilamida al 10 % con SDS en presencia de β -mercaptoetanol (condiciones desnaturalizantes y reductoras) La corrida se realizó a 30 Volts por gel y las proteínas se revelaron con Coomassie. El marcador de peso molecular preparado contiene glucosa oxidasa, BSA, HRP y lisozima que migró con el frente.

Para la electrotransferencia se utilizó a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL en una cuba de transferencia Hoefer, TE22 (Amersham Pharmacia Biotech) a 150 mV durante 3 h 30 min. Posteriormente la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau (0.5 % de Ponceau S en 5 % de ácido acético) para verificar la transferencia efectiva de las proteínas y se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con anticuerpo primario antinitrotirosina de conejo producido por la Dra. M. Naviliat de acuerdo al protocolo descrito [207, 208]. Este anticuerpo se utilizó en una concentración 1/1000 y como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo conjugada a HRP (Amersham) en una concentración 1/5000 [199]. La membrana se reveló utilizando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech) que produce emisión de luz por un método no radioactivo. Este sistema detecta antígenos específicos inmovilizados en la membrana que se conjugan con anticuerpos unidos a HRP generando un producto luminiscente. El tiempo de exposición en ECL mini-cámara RPN 2069 fue de 45 min.

Para la preparación de albúmina nitrada como control positivo de la inmunodetección, se expuso BSA (150 μM , 98 % Sigma) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) a peroxinitrito (1000 μM).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA CBS Δ 143

La etapa inicial de la purificación, consistente en la inducción del plásmido pGEXCBSN que codifica la proteína de fusión CBS Δ 143-GST, se realizó de un modo eficiente como se muestra en el carril #3 (figura 8), donde se observa predominantemente una banda engrosada que migra con un peso similar al esperable para la proteína de fusión (68 kDa).

Si bien el pasaje por distintas columnas fue enriqueciendo la muestra en la proteína de interés, el pasaje del extracto por la columna de afinidad con glutatión fue la etapa donde se eliminaron la mayor cantidad de impurezas y se obtuvo una buena cantidad de la proteína de fusión (carril #6).

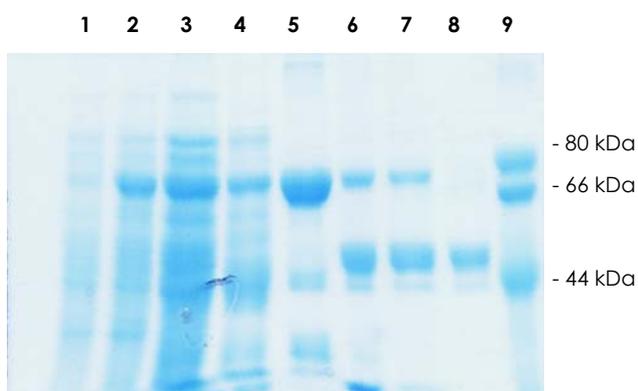


Figura 8. Análisis en SDS-Page de las distintas etapas de la purificación. La electroforesis se realizó en geles con 10 % de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Carril 1) preinducción, 2) posinducción, 3) extracción, 4) QSFF, 5) afinidad GSH, 6) digestión con trombina, 7) DEAE-CL6B, 8) 2º pasaje por afinidad GSH, 9) marcador PM.

La proteólisis con trombina para eliminar el dominio GST permitió obtener una banda abundante que migra con un peso molecular de 45 kDa y que corresponde al monómero de CBS dimérica escindida del dominio GST (carril #7). Se observa además una banda de mayor PM correspondiente a CBS Δ 143-GST aún sin digerir (68 kDa) y una tercera banda de menor PM (23 kDa) que corresponde al dominio GST escindido. Un segundo pasaje por la columna de afinidad con glutatión permitió obtener una banda altamente predominante correspondiente al monómero de CBS dimérica. De este modo se logró purificar exitosamente la CBS dimérica a partir del plásmido pGEXCBSN, obteniendo una enzima funcional con alto grado de pureza.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CBS Δ 143 PURIFICADA

Al finalizar las diferentes purificaciones se realizó un espectro UV-Vis a la CBS Δ 143 obtenida y se determinó el coeficiente de absorptividad ($\epsilon_{429\text{ nm}}$) correspondiente a la banda γ de Soret para el grupo hemo oxidado, a partir del valor de concentración proteica obtenido por el método de Bradford y considerando un peso molecular por monómero de 45 kDa (figura 9). El valor obtenido fue de $63000 \pm 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($n = 8$) y es menor en un 23 % al de $82000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ reportado con anterioridad [21, 88].

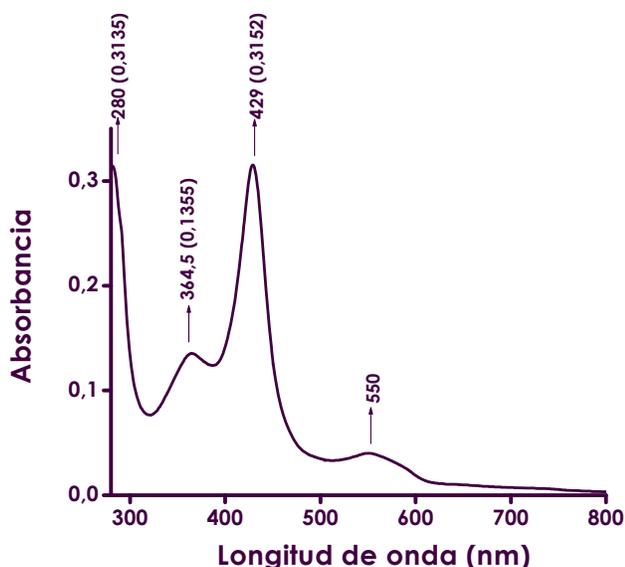


Figura 9. Espectro típico de la Fe(III)CBS Δ 143. El espectro de CBS Δ 143 ($5.5 \mu\text{M}$) se registró a pH 7.4 en amortiguador fosfato (0.1 M) con DTPA (0.1 mM) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 a temperatura ambiente.

Esta diferencia con los valores reportados pudo deberse ya sea a impurezas presentes en el extracto enzimático por lo que la concentración de enzima resulta sobrestimada, a la presencia de una fracción de enzima que no incorporó el grupo hemo o a la utilización de diferentes métodos de cuantificación proteica en los datos reportados. Sin embargo la presencia de una banda mayoritaria luego del segundo pasaje por la columna de afinidad a glutatión permite descartar el aporte de impurezas proteicas.

La presencia del máximo a 429 nm correspondiente a la banda γ de Soret junto con la banda ancha $\alpha\beta$ en el entorno de los 550 nm indica la presencia de un hemo férrico

hexacoordinado y de bajo spin [49]. La enzima presenta además un tercer máximo correspondiente a la banda δ del hemo a 364 nm.

El cofactor PLP que se encuentra formando una base de Schiff con la Lys 119 de la enzima, a pH 7.4 posee sus formas tautoméricas protonada y desprotonada en equilibrio. Estos estados de protonación poseen máximos de absorción característicos, a 420 nm absorbe la base de Schiff protonada y a 350 nm la base de Schiff desprotonada [21, 44], aportando entre 15 a 20 % a la absorbancia en los máximos a 429 nm y 364 nm respectivamente en el espectro de la enzima [22, 56].

A partir de los espectros realizados se calculó además un parámetro que define la pureza de la enzima: la relación Abs_{280}/Abs_{428} , obteniéndose un valor promedio de 1.1 ($n = 17$) comparable con el valor de 1.03 determinado anteriormente [21, 23, 24, 82]. De acuerdo a este parámetro la pureza de nuestra enzima fue $\sim 93\%$.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad CBS se determinó mediante la cuantificación del cromóforo naranja formado entre la cistationina, producto de reacción de la CBS Δ 143, y la ninhidrina a 453 nm.

El calentamiento de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrido) en medio ácido y en presencia de grupos amino de aminoácidos y péptidos produce la desaminación oxidativa de éstos asociada a la reducción de una molécula de ninhidrina. Esta molécula reducida reacciona con otra molécula de ninhidrina oxidada, se estabiliza por resonancia y genera un compuesto coloreado que puede ir desde el azul al violeta intenso. El compuesto se denomina "púrpura de Ruhemann" y permite cuantificar α -aminoácidos primarios mediante su absorbancia a 540 nm. Los aminoácidos secundarios (ej. prolina) forman productos en tonos del amarillo y su absorbancia máxima se ubica en los 440 nm.

Para la determinación de la actividad enzimática la reacción se realizó a pH 8.6 y la absorbancia de la cistationina formada se midió en medio ácido luego de su reacción con ninhidrina. La figura 10 muestra los espectros control de los productos coloreados por reacción con la ninhidrina de los aminoácidos cistationina (0.3 mM), Ser (30 mM) y Hcy (30 mM) para evaluar su contribución a 453 nm.

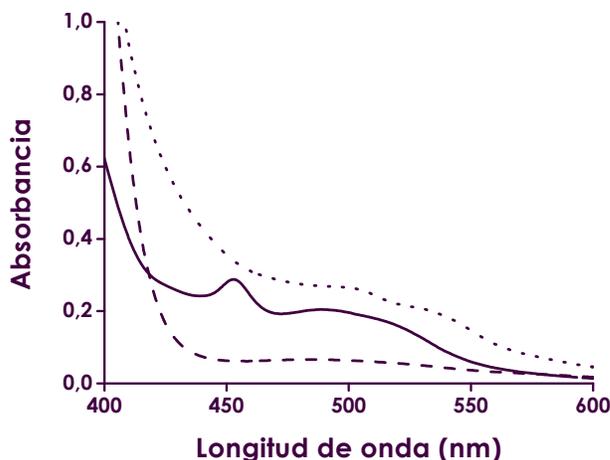


Figura 10. Espectros de los productos coloreados para los aminoácidos Ser, Hcy y cistationina. En un volumen final de 1 mL se mezclaron en cada caso 950 μ L de reactivo de ninhidrina y 50 μ L de cada aminoácido en las siguientes concentraciones finales: Ser 30 mM (.....), Hcy 30 mM (- - -) y cistationina 0.3 mM(____). Se incubó 5 min a 100 $^{\circ}$ C, 2 min en baño de hielo y se realizó la lectura a los 20 min. Los espectros se registraron entre 400 y 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Si bien no se observó la presencia de ningún máximo a 453 nm para los productos coloreados de Ser y Hcy en las concentraciones ensayadas correspondientes a las usadas para la mezcla de reacción, dado que la concentración final cuando se agrega al reactivo de ninhidrina es de 1.5 mM en cada aminoácido, su aporte a la absorbancia a 453 nm es menor al observado en este control. De todos modos para el cálculo de actividad enzimática en todos los casos se restó a cada absorbancia el valor correspondiente al blanco (#2) preparado con todos los reactivos menos la enzima, como se explicó en la sección 3.2.

Un método alternativo para medir actividad CBS es el método radioactivo que consiste en la cuantificación de cistationina partir de la incorporación de [14 C]-Ser [24, 209]. Este método tiene como inconveniente la utilización de equipamiento y reactivos especiales y costosos además de requerir un área de laboratorio y manipulación adecuada para el trabajo con radioisótopos.

El método colorimétrico en cambio, se realiza con reactivos y equipamiento comunes a un laboratorio correctamente equipado, sin necesidad de otras medidas de seguridad que las requeridas para cualquier ensayo de rutina. La sensibilidad de este método considerando un Δ Abs mínimo de 0.05 corresponde a la formación de 0.45 μ moles h^{-1} de cistationina en la cubeta de reacción (vf. 200 μ L) y la formación del producto coloreado mantiene una correlación lineal con la absorbancia para un amplio intervalo de concentraciones de cistationina (figura 11).

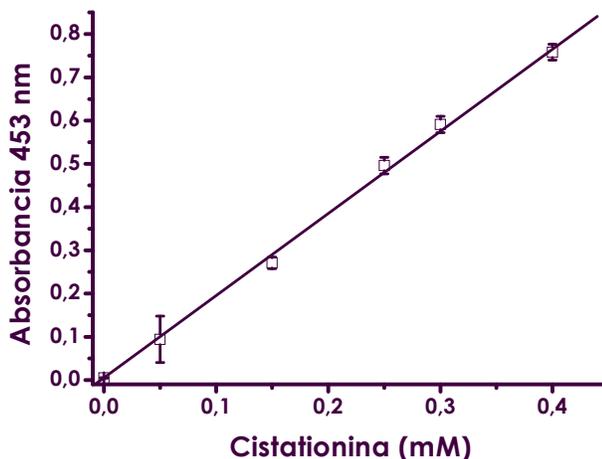


Figura 11. Curva de calibración de cistationina basada en el método colorimétrico. En un volumen final de 1 mL se colocaron 950 μL de reactivo de ninhidrina y 50 μL conteniendo cistationina (10 mM) y agua en proporciones variables, para obtener un rango entre 0 y 0,4 mM de concentración final de cistationina en 1 mL. Los tubos fueron incubados 5 min a 100 $^{\circ}\text{C}$, enfriados en hielo durante 2 min y la lectura se realizó luego de 20 min.

La relación directa que se observa en la figura 12. entre producto formado y concentración de enzima permite concluir que en el rango ensayado y para la concentración de enzima elegida en este trabajo (0,375 μM en cubeta de reacción), cuando se detiene la reacción a los 30 min, el sistema aún se encuentra en condiciones de velocidad inicial.

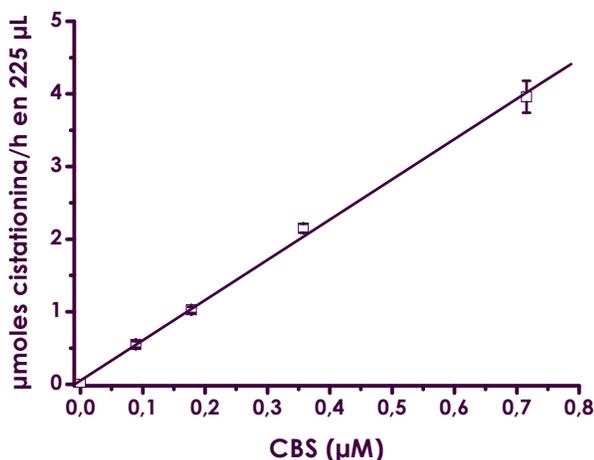


Figura 12. Relación entre concentración de CBS $\Delta 143$ presente en la mezcla de reacción y cistationina producida. El ensayo de actividad enzimática se realizó con concentraciones crecientes de CBS (0,089, 0,178, 0,358 y 0,716 μM), la reacción se detuvo a los 30 min con TCA y la cantidad de cistationina formada se determinó por su reacción con ninhidrina a 453 nm.

La actividad promedio para la CBS $\Delta 143$ purificada fue de $590 \pm 150 \text{ U mg}^{-1}$ ($n = 37$), similar a otros valores reportados [25, 45, 74, 87].

4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TIOLES REDUCIDOS EN LA CBS OXIDADA

La CBS humana tipo salvaje posee 11 residuos de cisteína que se encuentran altamente conservados dentro de los mamíferos y para el caso de la enzima dimérica, el número de cisteínas totales es de 10. Previo al ensayo de cuantificación de tioles reducidos en la enzima purificada mediante el método de Ellman, se realizó un curso temporal de la reacción para determinar el tiempo óptimo de incubación de la CBS con DTNB (figura 13).

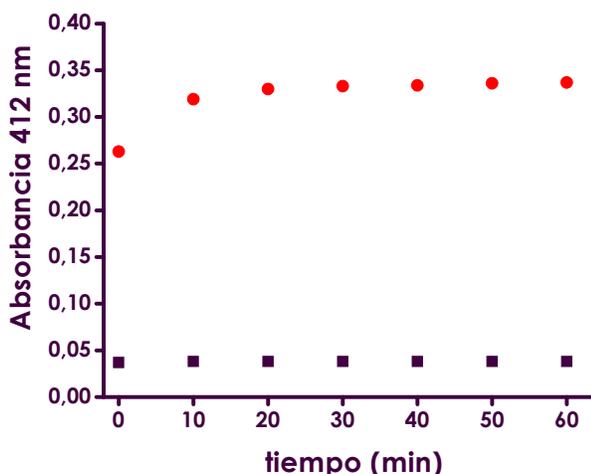


Figura 13. Curso temporal de la reacción de CBS con DTNB. Se colocó CBS ($5 \mu\text{M}$) y DTNB ($200 \mu\text{M}$) en amortiguador fosfato (pH 7,2, 0,1M) (●) y se preparó un tubo control sin enzima en iguales condiciones (■). Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min y el TNB se cuantificó siguiendo la absorbancia a 412 nm cada 10 min sin ultrafiltrar la muestra.

Luego de 20 min de incubación la $Abs_{412\text{nm}}$ para el tubo conteniendo enzima permaneció constante y el contenido de TNB inicialmente presente en el tubo control permaneció invariable durante el período de incubación. A partir de este resultado entonces la cuantificación de tioles reducidos en la CBS purificada se realizó luego de una incubación de 30 min con DTNB a temperatura ambiente y posterior ultrafiltrado para eliminar el aporte de la enzima a la absorbancia a 412 nm como se describió en el punto 3.4. En todos los casos el valor de absorbancia a 412 nm del tubo control fue restada al obtenido para el tubo con enzima.

El valor determinado fue de $1.0 \pm 0.4 \text{ SH mol}^{-1}$ de CBS ($n = 2$) y se corresponde con el valor reportado por Frank y colaboradores [210] para la CBS humana trunca dimérica donde se demostró que la Cys15 es quien se encuentra expuesta con accesibilidad al solvente. Este residuo está formando parte del dominio N-terminal donde se encuentra el sitio de unión al hemo, sin embargo no participa de éste (Cys52) ni del dominio glutaredoxina (Cys272 y 275). Su

visualización estructural no es posible porque todas las estructuras cristalográficas disponibles comienzan en el residuo #40.

4.5 INACTIVACIÓN Y ANÁLISIS ESPECTRAL DE LA CBS Δ 143 EXPUESTA A PEROXINITRITO

4.5.1 Inactivación por peroxinitrito de la Fe(III)CBS Δ 143

La exposición de CBS a peroxinitrito en concentraciones crecientes se realizó como se indicó en el punto 3.7. Se midió la actividad enzimática por el método colorimétrico para cada muestra, previa realización de una curva de calibración para cistationina y el experimento se realizó por cuadruplicado en días diferentes (figura 14).

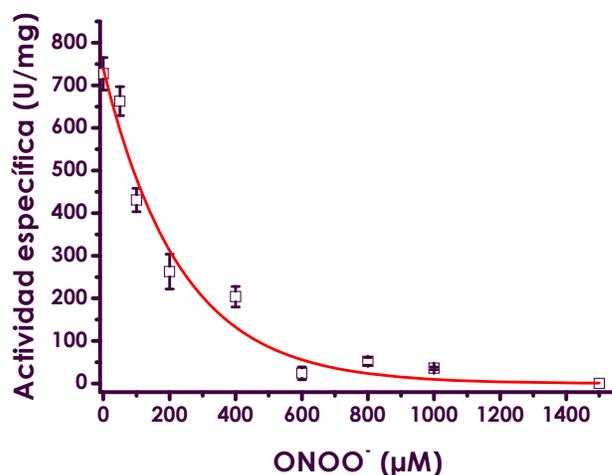


Figura 14. Inactivación de la CBS Δ 143 con el peroxinitrito. Se expuso CBS 5 μ M a concentraciones crecientes entre 0 y 1.5 mM de peroxinitrito en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) y se determinó la actividad enzimática remanente. La figura muestra un experimento típico con el valor promedio y el desvío estándar para los triplicados en cada punto. La recta muestra el mejor ajuste a la función $y = P_1 * (\exp(-P_2x)) + P_3$, donde P_1 = amplitud o actividad máxima en ausencia de ONOO⁻, $IC_{50} = \ln 2 / P_2$, $P_3 = 0$ y $x = [\text{ONOO}^-]$

Se observó una disminución exponencial de la actividad CBS Δ 143 expuesta a concentraciones crecientes de peroxinitrito que ajustó en todos los casos a una función de tipo: $y = P_1 * (\exp(-P_2x)) + P_3$, siendo P_3 igual a 0, ya que la inactivación de la enzima a concentraciones superiores a 1 mM de peroxinitrito fue total. En todos los casos el control de adición reversa mostró valores de actividad similares a los de la enzima en ausencia de peroxinitrito, descartándose la inactivación por productos de su descomposición o la presencia de algún contaminante. El IC_{50} indica la concentración de peroxinitrito capaz de reducir a la mitad el valor de actividad enzimática obtenido en ausencia de peroxinitrito y varía con la concentración de enzima [123]. Cuando el parámetro $P_3 = 0$, el $IC_{50} = \ln 2 / P_2$, donde el valor de P_2 se obtiene a partir del ajuste exponencial planteado. En este caso se trabajó sólo con una concentración de CBS de 5 μ M y el IC_{50} determinado fue de $163 \pm 14 \mu$ M ($n = 4$). El modo de inactivación que presenta esta enzima

cuando se expone a peroxinitrito fue similar al observado previamente en otras enzimas [211-213] donde también se observó un buen ajuste a una caída exponencial simple. El IC_{50} de $163 \mu M$ obtenido para $5 \mu M$ de CBS indica que la enzima es moderadamente sensible a la presencia de peroxinitrito, mostrando una reactividad similar a la CuZnSOD [211] y a la tirosina hidroxilasa que posee un IC_{50} aproximado entre 100 y $200 \mu M$ para $18 \mu M$ de enzima [214], mientras la aconitasa mitocondrial posee un IC_{50} de $2.3 \mu M$ para concentraciones tan bajas de enzima como $0.2 \mu M$ [213], mostrando tener gran sensibilidad ante la presencia de bajas concentraciones de peroxinitrito.

4.5.2 Análisis espectral de la Fe(III)CBS $\Delta 143$ expuesta a peroxinitrito

Con la finalidad de observar si existen cambios a nivel del espectro de la enzima oxidada que pudieran explicar su inactivación frente a la exposición a peroxinitrito, se registraron los espectros UV-Vis correspondientes (figura 15).

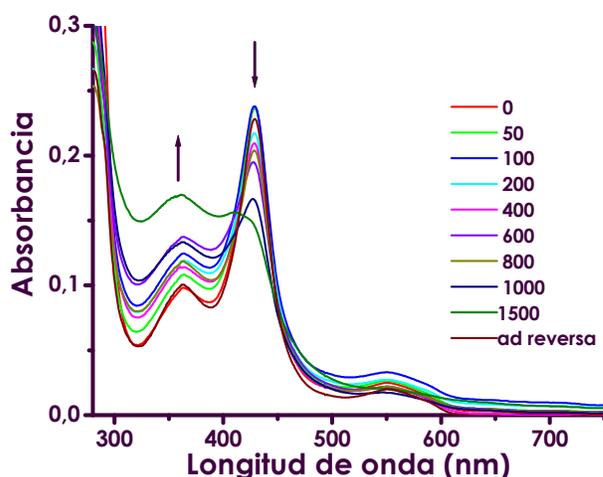


Figura 15. Espectros UV-Vis de CBS para concentraciones crecientes de peroxinitrito a pH 7.4. Se expuso CBS ($5 \mu M$) en amortiguador fosfato ($0.1 M$, pH 7.4) con DTPA ($0.1 mM$) a bolos de peroxinitrito entre 0 y $1.5 mM$ en tubos independientes. Luego de $2 min$ a $37 ^\circ C$ se registró el espectro a temperatura ambiente correspondiente a cada concentración.

Los espectros muestran una disminución en la absorbancia del máximo a $429 nm$ acompañado de un aumento a $364 nm$, comportamiento que se observa hasta $800 \mu M$ de peroxinitrito, ya que a concentraciones superiores el espectro del hemo pierde su forma característica. Con el aumento en la concentración de peroxinitrito se produce además un corrimiento del máximo hacia el azul desde $429 nm$ con disminución en el valor de la absorbancia, mientras que a $364 nm$ no se observa corrimiento del máximo.

Para visualizar mejor estos comportamientos se realizaron los gráficos que se muestran en la figura 16. Se observa que el aumento de peroxinitrito genera una disminución lineal de la absorbancia a $429 nm$ correspondiente a la banda γ de Soret (figura 16 A), que se acompaña de un corrimiento de λ máxima hacia el azul hasta los $425.5 nm$ (figura 16 C). A $364 nm$ se registra

una relación directa entre el aumento en la absorbancia en esa longitud de onda y la concentración de peroxinitrito (figura 16 B) sin que exista corrimiento en dicho máximo.

Debido a que el peroxinitrito produce un aumento en la agregación de la enzima que interfiere en la absorbancia de la banda $\alpha\beta$, en este experimento no se pudieron determinar los cambios que pudieran ocurrir allí.

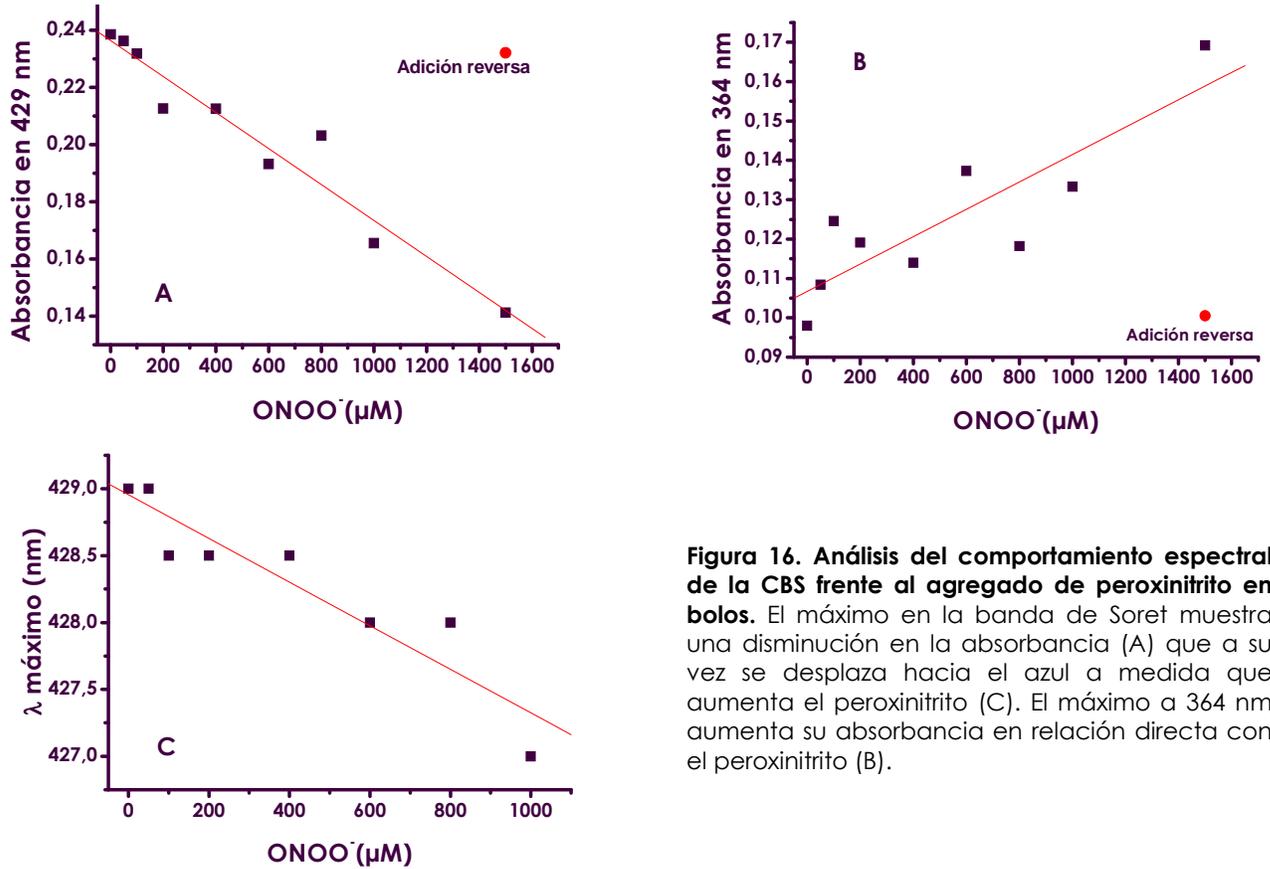


Figura 16. Análisis del comportamiento espectral de la CBS frente al agregado de peroxinitrito en bolos. El máximo en la banda de Soret muestra una disminución en la absorbancia (A) que a su vez se desplaza hacia el azul a medida que aumenta el peroxinitrito (C). El máximo a 364 nm aumenta su absorbancia en relación directa con el peroxinitrito (B).

También se expuso una misma muestra de CBS (5 μM) al agregado de alícuotas sucesivas de peroxinitrito de concentración conocida (50 μM) y los resultados fueron cualitativamente similares a los obtenidos cuando el agregado se realizó en bolos. En este caso nuevamente los espectros muestran una disminución en la absorbancia del hemo a 429 nm acompañada por corrimiento hacia el azul en el máximo desde 429 nm, así como un aumento en la absorbancia a 364 nm que no se acompaña con un corrimiento de λ máximo (figura 17).

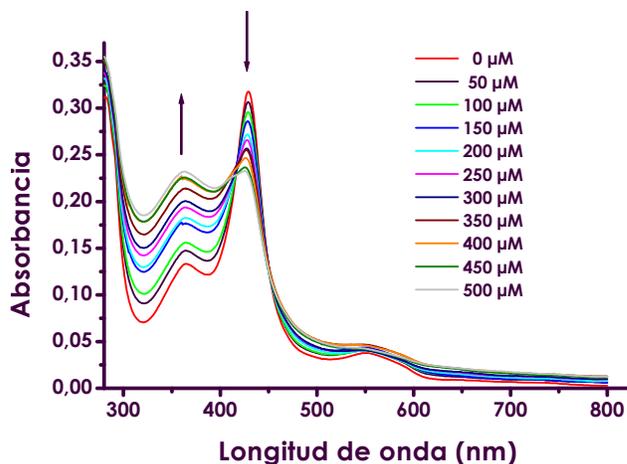


Figura 17. Espectros UV-Vis de CBS expuesta a incrementos consecutivos en la concentración de peroxinitrito a pH 7.4. A una misma muestra de CBS (5 μM) en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) se agregaron alícuotas de ONOO^- incrementando en 50 μM su concentración cada vez y registrando el espectro correspondiente a temperatura ambiente. Previo al agregado de cada alícuota de peroxinitrito la celda conteniendo la enzima fue termostatzada durante 2 min a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Cuando se graficó la absorbancia máxima registrada a 429 nm en función de la concentración de peroxinitrito se observó una disminución directamente proporcional (figura 18 A) acompañada por un desplazamiento del máximo hacia el azul (figura 18 C). A 364 nm nuevamente se observa un aumento directamente proporcional a la concentración de peroxinitrito (figura 18 B) sin desplazamiento del máximo a esa λ .

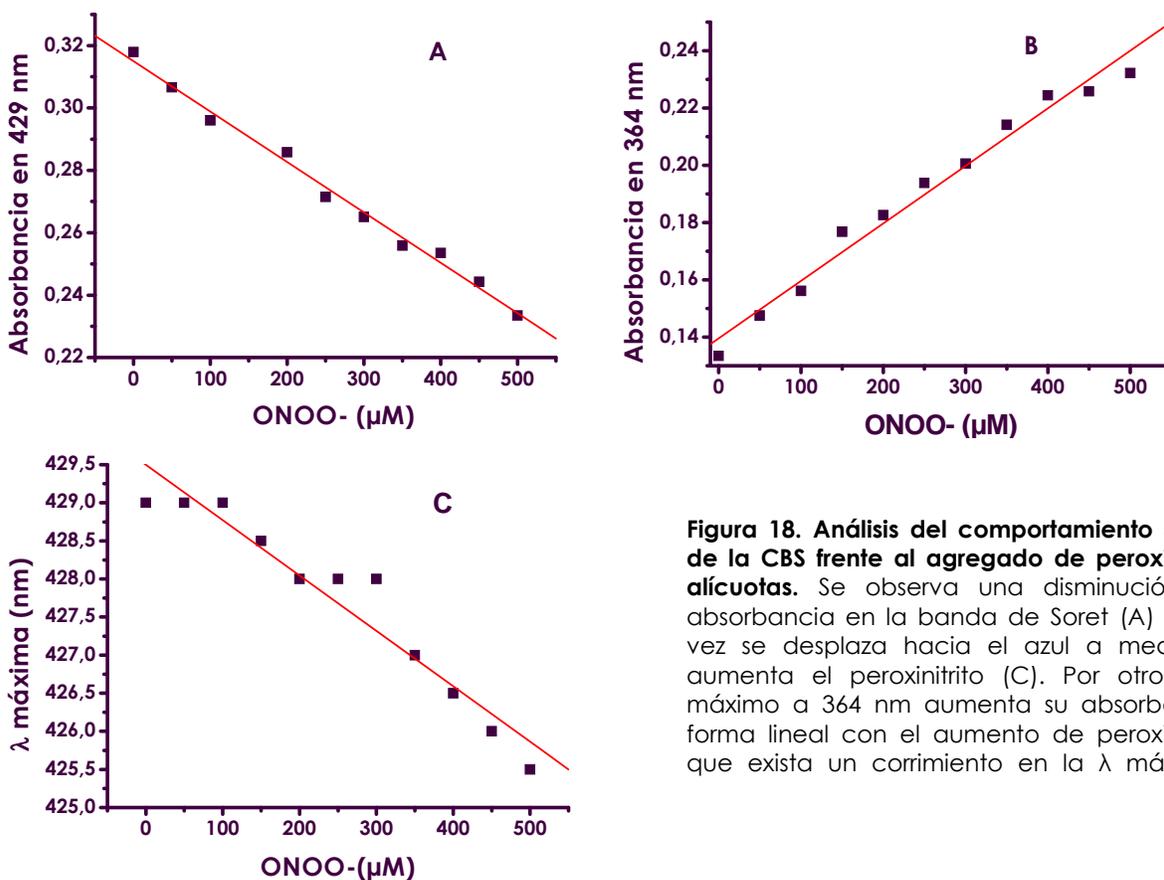


Figura 18. Análisis del comportamiento espectral de la CBS frente al agregado de peroxinitrito en alícuotas. Se observa una disminución de la absorbancia en la banda de Soret (A) que a su vez se desplaza hacia el azul a medida que aumenta el peroxinitrito (C). Por otro lado el máximo a 364 nm aumenta su absorbancia en forma lineal con el aumento de peroxinitrito sin que exista un corrimiento en la λ máxima (B).

Si bien se ha reportado que este hemo hexacoordinado en estado oxidado es muy estable y poco reactivo, mostrando interacción e inactivación hasta el momento sólo con HgCl_2 , [77], los resultados de los espectros UV-Vis obtenidos para la $\text{Fe(III)CBS } \Delta 143$ muestran que el peroxinitrito también es capaz de reaccionar con la enzima.

Los cambios espectrales se visualizan a concentraciones superiores a los 50 μM con un corrimiento de la banda de Soret hacia el azul que llega hasta los 425.5 nm manteniendo el hemo hexacoordinado, mientras que en el caso del HgCl_2 , va hasta 395 nm y se relaciona con la conversión a Fe(III) pentacoordinado en alto spin por pérdida de coordinación con la Cys52.

La CBS presenta 7 residuos Tyr y 6 de Trp que son potencialmente nitrables por peroxinitrito. La 3-nitrotirosina desprotonada (pH 10) posee un máximo de absorción a 430 nm ($\epsilon_{430 \text{ nm}} = 4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y protonada (pH 6) absorbe a 360 nm ($\epsilon_{360 \text{ nm}} = 2657 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [206] con un pKa de 7.5. En el caso del nitrotriptofano posee un $\epsilon_{400 \text{ nm}} = 5200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y un pKa de 7.79 [153, 215]. Sabiendo que los rendimientos de nitración por peroxinitrito tanto para Tyr como para Trp son bajos (8 % y 12 % a pH neutro respectivamente), el aumento neto observado en la absorbancia a 364 de 0.0712 corresponde a la contribución de alguna otra especie, ya que sería necesaria una presencia tres veces superior de residuos aromáticos nitrables en la enzima para generar ese aumento.

A 429 nm en cambio se observó una disminución en la absorbancia por lo que es probable que el aporte de la 3-nitroTyr fuera enmascarado por la destrucción del hemo ya que el valor de su coeficiente de absorptividad es muy superior al de la nitroTyr ($82000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ vs $4400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y por lo tanto sus cambios predominan en la absorbancia neta.

Si se consideran los resultados previos para la CBS oxidada y expuesta a HgCl_2 , la disminución observada en este caso a 429 nm podría deberse a la pérdida de coordinación del hemo, posiblemente del ligando axial Cys52 dado que su coordinación al protohemo ha mostrado ser menos estable que el grupo imidazol de la His 65 [172].

De acuerdo a resultados obtenidos con mutantes en los ligandos axiales del hemo también podría ocurrir un intercambio de ligando manteniendo el estado hexacoordinado del hemo. En ese caso el intercambio de la His65 por un residuo de Arg y de la Cys52 por Ala o Ser era capaz de desplazar el máximo en la enzima oxidada hacia los 424 nm y 415 nm respectivamente [95]. El peroxinitrito podría estar promoviendo el intercambio de alguno de los ligandos axiales del hemo que explique el desplazamiento hacia el azul que se observa a concentraciones superiores a 100 μM .

La inactivación de la enzima no siguió una relación directa con los cambios espectrales a diferencia de lo que ocurre en el caso del HgCl_2 . La disminución de la absorbancia del hemo a 429 nm fue menos afectada por el peroxinitrito que la actividad enzimática sugiriendo la

contribución de más de un proceso a la inactivación, como es el caso de la prostaglandina H₂ sintasa (PGH₂ sintasa) [216]. Estos procesos podrían ser la nitración de residuos de Tyr y Trp críticos y la interacción con el cofactor PLP que se analizarán en las siguientes secciones.

4.5.3 Análisis espectral de la CBS Δ143 expuesta a peroxinitrito y reducida

Luego de la realización de los espectros correspondientes a cada concentración de peroxinitrito para la enzima oxidada, se eliminó el oxígeno de la muestra mediante burbujeo con N₂, se redujo el hemo con un exceso conocido de ditionito de sodio y se registraron nuevamente los espectros para cada muestra (figura 19).

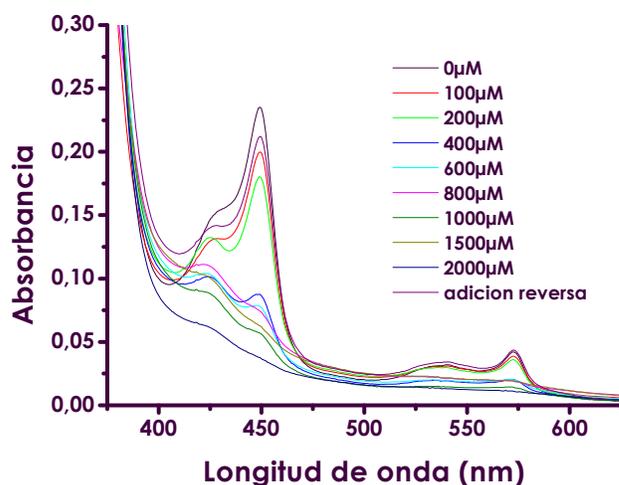


Figura 19. Espectro UV-Vis de CBS expuesta a peroxinitrito y reducida. La enzima oxidada y expuesta a bolos de ONOO⁻ a pH 7.4 en amortiguador fosfato (0.1M) con DTPA (0.1 mM) fue desoxigenada y reducida con un exceso conocido de ditionito de sodio también desoxigenado. Los espectros se registraron a temperatura ambiente y hasta los 380 nm ya que por debajo de esta λ la absorbancia del reductor es muy elevada y enmascara a la enzima.

El espectro para la enzima en ausencia de peroxinitrito muestra que la cantidad de reductor agregada fue suficiente para reducir el Fe(III)hemo en su totalidad desplazando el máximo a 429 nm hacia 449.5 nm. Acorde con los espectros obtenidos para la enzima oxidada se observa que la modificación del hemo por exposición a peroxinitrito sigue el mismo patrón disminuyendo del mismo modo la absorbancia a 449.5 nm que podría estar indicando una pérdida de coordinación con el tiol de la Cys₅₂ de la enzima. [217].

La aparición del máximo correspondiente al hemo reducido (449 nm) cuando la enzima es tratada con un reductor, es acompañada por la resolución de la banda $\alpha\beta$ en dos bandas definidas con máximos a 572.5 nm (α) y 540nm (β) [79, 83] que al aumentar el peroxinitrito disminuyeron acompañando la desaparición del hemo íntegro.

Para concentraciones de peroxinitrito entre 200 μ M y 800 μ M se observa además la aparición de un nuevo máximo que se ubica entre 424.5 y 423.5 nm que no corresponde a la reoxidación del hemo. De acuerdo a espectros realizados por diferentes grupos para varias hemoproteínas de tipo b en estado reducido podría tratarse de un cambio de ligando en el

hemo entre la Cys 52 y un residuo neutro como His o Pro [74, 78, 80]. En este sentido la CBS en estado reducido expuesta a concentraciones superiores a 300 μM de HgCl_2 muestra un comportamiento similar con un corrimiento del máximo desde 450 nm hacia 425 nm indicando la pérdida de coordinación con la Cys52 con retención de un sexto ligando diferente y aún no definido [71, 72, 77] y esos cambios espectrales se corresponden con una pérdida de la actividad enzimática [77]. Además en el trabajo realizado con mutantes y previamente citado [95] se observa que cuando el hemo está reducido y la Cys52 ha sido sustituida por un ligando neutro como Ala o Ser, aparece un máximo a 423 nm en lugar del característico 449.5 nm que indica la pérdida de unión del tiolato al hemo [218].

4.6 EFECTO DEL PEROXINITRITO SOBRE LA BANDA DE TRANSFERENCIA DE CARGA ENTRE METAL Y LIGANDO EN LA CBS Δ 143

Dentro de la región de baja energía en el UV-Vis las hemoproteínas que poseen un residuo Cys como sustituyente axial presentan dos máximos en el entorno de los 650 nm y 750 nm dependiendo de la composición de la proteína, correspondientes a la banda denominada LMCT (ligand-to-metal charge-transfer band) [74, 75]. Su visualización se logra a concentraciones de enzima mayores a 100 μM y la presencia de ambos máximos indica que el Fe(III) se encuentra ligado a un tiol [75, 219].

La figura 20 muestra la zona del espectro de la CBS oxidada que va desde la banda $\alpha\beta$ a 550 nm y hacia el rojo donde se encuentra la región de baja energía (600-700 nm). En el inserto se muestra ampliada la zona que permite visualizar los dos máximos ubicados a 645 nm y 703 nm, éste último bastante alejado de los máximos registrados para otras hemoproteínas en el entorno de los 750 nm [74].

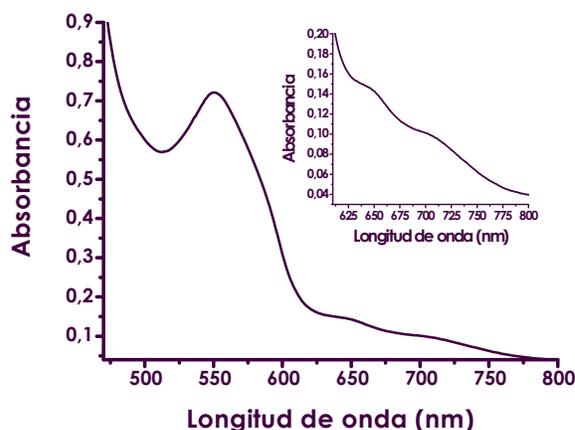


Figura 20. Registro de la banda LMCT para la CBS Δ 143. La banda se registró a pH 7.4 en amortiguador fosfato (0.1 M) y temperatura ambiente para una concentración de CBS de 123 μM donde se observa el máximo a 550 nm correspondiente a la banda $\alpha\beta$. En el inserto se muestran los máximos a 645 nm y 703 nm correspondientes a la banda LMCT de la CBS.

Para determinar si el peroxinitrito produce algún efecto a nivel de la coordinación entre el Fe(III) y el tiol de la Cys52 se expuso la enzima oxidada (123 μM) a concentraciones crecientes de ONOO^- , mediante el agregado consecutivo de alícuotas de concentración conocida (figura 21).

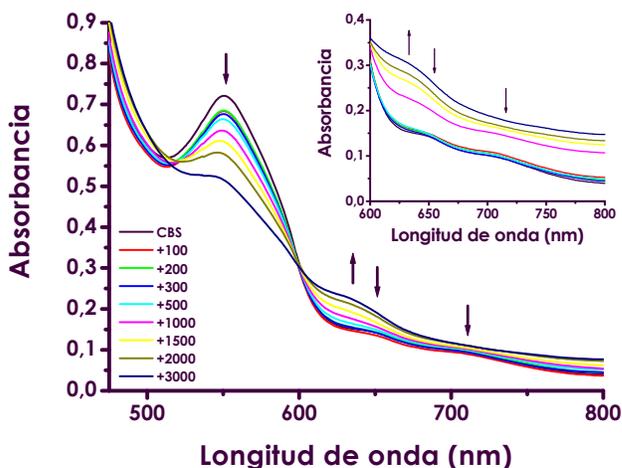


Figura 21. Modificaciones en la banda LMCT de la CBS por exposición a peroxinitrito. La CBS (123 μM) se expuso a concentraciones crecientes y sucesivas de peroxinitrito en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM). Debido a la alta concentración de la muestra, el espectro se muestra hasta los 475 nm. El inserto muestra la región entre 600 y 800 nm .

El espectro muestra una marcada disminución de la banda $\alpha\beta$ en 550 nm proporcional al aumento en la concentración de peroxinitrito así como una disminución en los máximos a 645 nm y 703 que se acompaña de la aparición de un nuevo máximo en ~ 630 nm.

A concentraciones iguales o superiores a 1 mM de peroxinitrito se observa una pérdida de la forma característica de la banda LMCT acompañada de la formación de una nueva especie que absorbe en la zona de 630 nm.

Existen numerosos reportes que indican que complejos con hidroxihemos presentan un hombro entre 630 y 633 nm dependiendo de la proteína. Tal es el caso del cytc550 desplegado que cuando es expuesto a H_2O_2 sufre una degradación de su hemo acompañada de inactivación [220]. El primer intermediario en esa degradación presenta un hombro a 633 nm que coincide con la especie hidroxihemo de la proteína hemooxigenasa, así como otros complejos hidroxihemos reportados con anterioridad [221, 222]. La espectroscopia Raman realizada a esos hidroxihemos ha mostrado que se encuentran en disposición de alto spin y pentacoordinado [222]. Es posible entonces que la CBS expuesta a elevadas concentraciones de peroxinitrito sufra algún tipo de modificación en su hemo que pudiera conducir a la formación de algún complejo tipo hidroxihemo que explique el aumento observado en la absorbancia 630 nm.

Como se expuso anteriormente el hemo de la CBS dimérica se encuentra hexacoordinado y en bajo spin, mostrando un espectro característico de EPR con $g_z = 2.5$, $g_y = 2.3$ y $g_x = 1.86$, valores que coinciden con los de otras hemoproteínas con hemo hexacoordinado en disposición

de bajo spin [71]. Los registros de EPR para la CBS $\Delta 143$ (100 μM) expuesta a diferentes concentraciones de ONOO^- (100, 400, 1000 y 2000 μM) muestran la aparición de dos nuevas señales a 5.94 y 4.26 g a partir de concentraciones superiores a 1000 μM de ONOO^- (Lic. Sebastián Carballal, comunicación personal, 2005) consistentes con la pérdida de coordinación del tiolato y el pasaje del hierro al estado de alto spin [71, 95].

Tanto los resultados obtenidos en la banda LMCT de la CBS $\Delta 143$ como las nuevas señales registradas por EPR van en la línea de que la exposición a peroxinitrito es capaz de generar modificaciones en el hemo que lo llevan a perder su coordinación con el tiol del ligando axial Cys52 y eventualmente ser hidroxilado.

4.7 ACTIVIDAD CBS $\Delta 143$ EXPUESTA A PEROXINITRITO A DIFERENTES PH

Para evaluar si la principal especie que está reaccionando con la enzima es el anión o el ácido peroxinitroso, se determinó la actividad enzimática remanente previa incubación de la enzima (5 μM) en presencia (200 μM) y en ausencia de peroxinitrito y en diferentes pH dentro del rango del amortiguador fosfato (5.8 a 7.8), adecuado para el pKa del ácido peroxinitroso (pKa =6.8). La concentración de ONOO^- se eligió a partir de los ensayos de actividad y de los espectros a pH 7.4 realizados previamente donde se observa que a 200 μM existe un efecto apreciable en la enzima sin destrucción total a nivel del hemo.

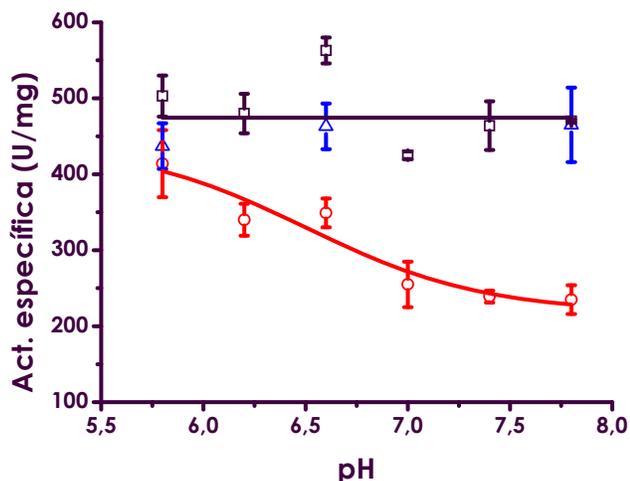


Figura 22. Actividad de CBS $\Delta 143$ a diferente pH en presencia y ausencia de peroxinitrito. Se expuso CBS (5 μM) en amortiguador fosfato (0.2 M) con DTPA (0.2 mM) a valores de pH entre 5.8 y 7.8 en presencia (○) y en ausencia (□) de peroxinitrito (200 μM). El ensayo de adición reversa (Δ) se realizó para tres de los pH ensayados (5.8, 6.6 y 7.8). Luego de 2 min de incubación a 37°C se cuantificó la actividad enzimática.

La figura 22 muestra que la actividad de la enzima en ausencia de peroxinitrito no fue

afectada en el rango de pH ensayado, mientras que la enzima tratada con ONOO⁻ mostró una disminución de la actividad a pH más alcalinos, que ajustó a la siguiente sigmoide:

$$\text{Actividad} = \text{Act.max} * \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\text{pKa}} + 10^{-\text{pH}}} + \text{offset}$$

A partir de este ajuste se determinó un valor de pKa = 6.5 ± 0.4, cercano al pKa reportado para el ácido peroxinitroso. Si bien este resultado no es concluyente en cuanto a la especie que estaría reaccionando con la CBS, el hecho de que exista una mayor inactivación a pH alcalino sugiere que el peroxinitrito anión podría ser la especie que preferentemente afecta la actividad de la enzima y concuerda con resultados obtenidos para la CuZnSOD [211].

Al registrar los espectros para los distintos pH para la enzima con y sin peroxinitrito (200 μM), no se observaron tendencias significativas. Sí se observó la disminución a 428 nm y el aumento a 364 nm que fue comparable para los diferentes valores de pH (no se muestran datos).

Con el fin de evaluar posibles cambios en el estado de protonación del hemo que pudieran estar afectando a la actividad enzimática, luego de una preincubación de la enzima a valores de pH entre 5.8 y 7.8, en presencia y ausencia de peroxinitrito (200 μM), ésta fue llevada a un pH final de 7.4 en todos los casos (figura 23).

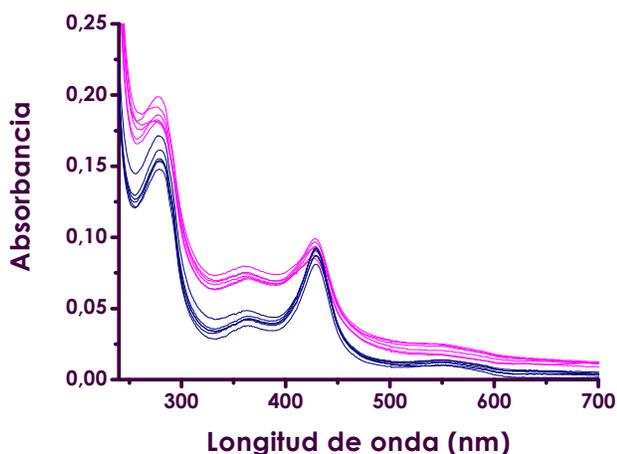


Figura 23. Espectros de absorción UV-Vis de la CBS Δ143 con y sin ONOO⁻ a pH 7.4. La preincubación de CBS (5 μM) a diferentes pH en presencia (—) y ausencia (—) de peroxinitrito (200 μM) se realizó en un volumen pequeño y luego se ajustó a 7.4 con el agregado de amortiguador fosfato. Los valores de pH ensayados fueron los mismos que para el ensayo de actividad: 5.8; 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.8.

Si bien los valores de absorbancia son menores a pH 7.4 debido al efecto de dilución, no se observan variaciones para las muestras con y sin peroxinitrito llevadas a pH 7.4.

Los espectros obtenidos tanto a diferentes pH como a pH 7.4 para la enzima oxidada muestran que el hemo no es afectado por el pH en el que se encuentra aún expuesto a una concentración de peroxinitrito de 200 μM. Esta observación coincide con trabajos anteriores que muestran por distintas metodologías que el entorno de coordinación del hemo oxidado no es

afectado por el pH [74]. En cambio se sabe que el porcentaje de peroxinitrito anión en la mezcla de reacción es afectado por el pH lo que estaría alterando la actividad de la enzima. El hecho de que el hemo no sea modificado en forma diferente por el pH va en la línea de que su interacción con el peroxinitrito no sea la causa única de la inactivación observada, siendo mas bien probable que el peroxinitrito reaccione con el cofactor PLP o a nivel de ciertos residuos críticos en el entorno del hemo, por ejemplo mediante su nitración.

4.8 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN DE PLP A PEROXINITRITO

4.8.1 Modificación del espectro de PLP libre por exposición a peroxinitrito

El espectro de la CBS oxidada posee un máximo a 364 nm al que aporta en un 10-20 % la aldimina interna protonada del PLP [21] y el 80 % restante corresponde al hemo. Cuando la enzima se expuso a concentraciones crecientes de peroxinitrito se observó un aumento en esa longitud de onda y dado que existen antecedentes de reactividad entre éste y distintos aldehídos [166] se procedió a estudiar la posible reactividad con el cofactor PLP presente en la CBS.

Se registraron espectros de PLP libre expuesto a concentraciones crecientes de ONOO^- por agregado de bolos a muestras independientes y por agregado de pequeñas alícuotas a una misma muestra. Para ello se preparó un stock considerando el ϵ reportado en la bibliografía cuyo valor es de $\epsilon_{295} = 5.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en 0.1 N HCl [49]. Sin embargo la solución presentó una absorbancia mayor a la esperable de acuerdo a la masa pesada por lo que se corroboró el valor del coeficiente de absorción utilizado mediante la preparación de varias soluciones en material aforado. Se determinó un nuevo ϵ con el que se trabajó y su valor fue $\epsilon_{295} = 7.91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en 0.1 N HCl. Debido a que el espectro del PLP se altera con el tiempo de almacenamiento de la solución, siempre se trabajó con soluciones frescas preparadas en el día.

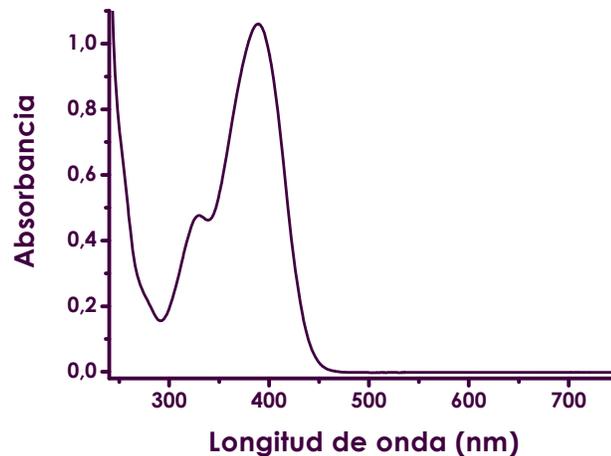


Figura 24. Espectro típico de PLP. Se colocó PLP (200 μM) en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4) con DTPA (0.2 mM) en la celda y se registró el espectro UV-Vis a temperatura ambiente

En el espectro inicial se observaron dos máximos a 389.5 y 330 nm respectivamente (figura 24). Cuando se agregó ONOO^- en diferentes concentraciones a PLP (200 μM) en tubos independientes se observó que el aumento en la concentración de peroxinitrito produce una disminución del máximo tanto a 389.5 nm como a 330 nm que fue acompañada por un aumento a 450 nm y a 300 nm (figura 25).

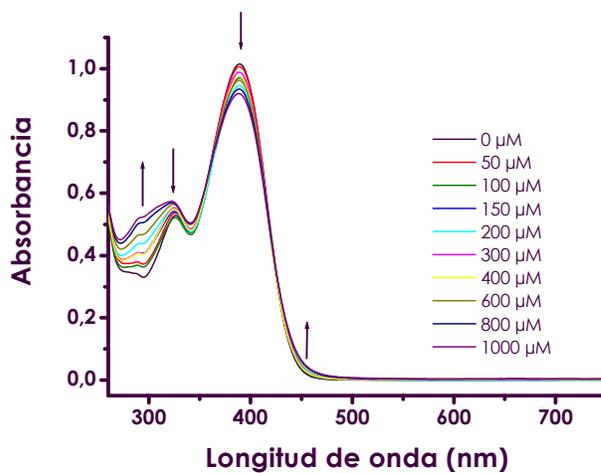


Figura 25. Espectros de PLP expuesto a bolos de peroxinitrito. El PLP (200 μM) en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4) con DTPA (0.2 mM) fue expuesto a peroxinitrito en concentraciones entre 0 y 1000 μM . El ONOO^- fue agregado a muestras independientes y los espectros UV-Vis se registraron a temperatura ambiente.

Cuando se expuso una misma muestra de PLP (200 μM) al agregado de alícuotas de concentraciones crecientes de peroxinitrito se registró un patrón de espectros levemente diferente aunque con similares tendencias registradas en los máximos (figura 26). Los cambios de absorbancia ante cada agregado de ONOO^- fueron mayores a los apreciados cuando la

adición se realizó en bolos. Además en este caso se registró un corrimiento del máximo a 389.5 nm hacia el azul a partir de concentraciones superiores a los 600 μM de ONOO^- .

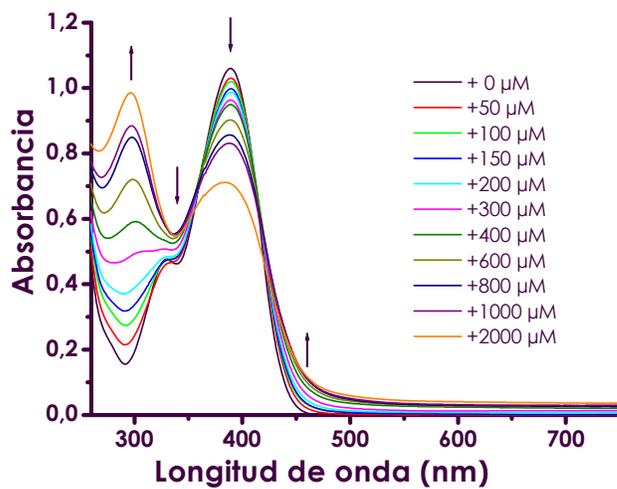


Figura 26. Espectros de PLP expuesto a concentraciones crecientes de peroxinitrito. El PLP (200 μM) en amortiguador fosfato (0.2 M, pH 7.4) con DTPA (0.2 mM) fue expuesto a peroxinitrito en concentraciones entre 0 y 1000 μM . El ONOO^- fue agregado a una misma muestra en alícuotas de concentración conocida. Los espectros UV-Vis se registraron a temperatura ambiente.

Los espectros obtenidos en ambas situaciones mostraron que el ONOO^- es capaz de modificar el espectro inicial de PLP introduciendo importantes cambios en la zona de los máximos además de observarse un aumento significativo a 450 nm.

En general los experimentos con peroxinitrito se realizan mediante el agregado de bolos, sin embargo en condiciones biológicas el peroxinitrito es generado por flujos continuos más que por exposiciones puntuales a determinada concentración. Esto provoca que los efectos que se observan en uno y otro caso sean diferentes por ejemplo en cuanto a los rendimientos de nitración de Tyr, que ha mostrado ser menor cuando la molécula blanco se expone a flujos de peroxinitrito en relación al agregado de bolos [223].

En este experimento se observaron efectos diferenciales sobre todo en cuanto a la magnitud de los cambios en los máximos aunque la situación del agregado de alícuotas no es exactamente igual a la generación de flujos de peroxinitrito. Probablemente el agregado de bolos genera gran cantidad de radicales que reaccionan entre sí antes de hacerlo con el PLP, en cambio el agregado de pequeñas alícuotas favorece la reacción directa de los radicales con el PLP generando un mayor efecto en la modificación del espectro. Esto provoca entonces efectos similares en magnitudes diferentes debido a la relación diferente de concentraciones entre PLP y radicales planteada en ambas situaciones.

La molécula de PLP posee un carbono que forma parte de un aldehído y un anillo de piridina sobre los que puede actuar el peroxinitrito. A su vez diferentes vitaminas y coenzimas que contienen anillos aromáticos presentan una gran reactividad con el peroxinitrito [224] por lo que

el anillo piridínico en el PLP podría ser un sitio potencial de nitración a partir de la generación de especies radicalares durante la descomposición de peroxinitrito.

El aumento en la absorbancia a 450 nm acompañado por la disminución en el máximo a 389.5 nm podría deberse a la generación de una especie aromática nitrada en forma similar a lo que ocurre con la nitrotirosina [206]. Además el PLP a pH 7.4 presenta un equilibrio entre sus formas tautoméricas protonada y desprotonada. La exposición a peroxinitrito genera una disminución en la absorbancia a 330 nm que se acompaña de un aumento a 300 nm probablemente debido a la pérdida del protón en el N piridínico de acuerdo a lo reportado previamente [225].

4.8.2 Estudio cinético de la reacción entre PLP y peroxinitrito

Los resultados obtenidos en el punto anterior mostraron que el ONOO^- es capaz de reaccionar con el PLP introduciendo cambios en su espectro característico, por lo que se procedió a estudiar la cinética entre estas dos moléculas para evaluar su posible efecto sobre la CBS y eventualmente otras enzimas PLP dependientes.

El método más utilizado para el análisis de la cinética rápida del peroxinitrito con una molécula blanco es el método integral en condiciones donde la concentración de uno de los reactivos es por lo menos 10 órdenes de magnitud mayor al otro de modo que se puede considerar constante durante el transcurso de la reacción (pseudo primer orden). En este caso se trabajó en condiciones de pseudoprimer orden con respecto al PLP, cuya concentración siempre estuvo en exceso. La cinética se siguió a 450 nm donde hay un aumento de la absorbancia exclusivo del PLP.

Se realizaron dos series de experimentos, en un caso se varió la concentración de ONOO^- : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM con 5 mM PLP, y en el otro caso se varió la concentración de PLP: 1, 2, 3, 4 y 5 mM con 0.2 mM ONOO^- . En la figura 27 se observa un experimento representativo de triplicados hechos en diferentes días.

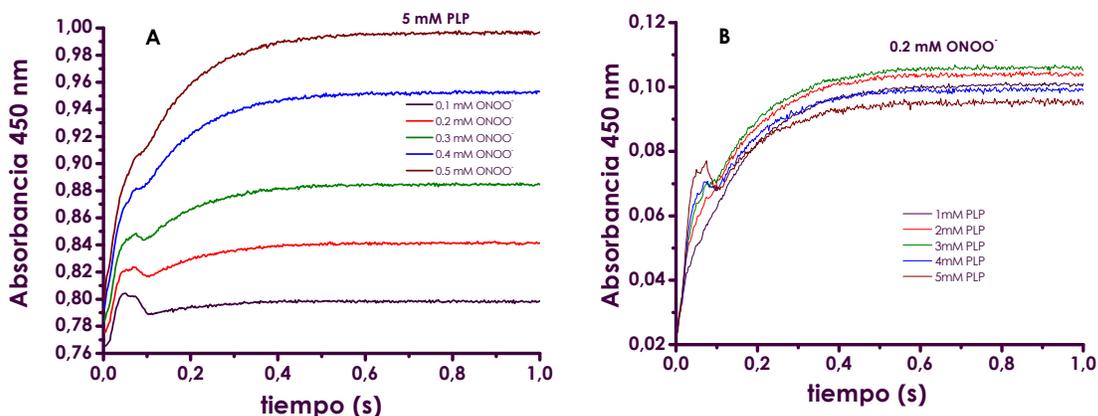


Figura 27. Registro de la cinética de reacción entre PLP y ONOO⁻. El ensayo se realizó en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) con un tiempo de mezclado menor a 2 ms. La temperatura se mantuvo a 37.0 ± 0.1 °C y se registró la absorbancia a 450 nm para las siguientes condiciones, (A): 5 mM PLP con 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM ONOO⁻ y (B): 0.2 mM ONOO⁻ con 0.2, 1, 2, 3, 4 y 5 mM PLP. Cada registro es el promedio de por lo menos 8 repeticiones para el conjunto de concentraciones ensayadas. Todos los registros continuaron estables después de 1s por lo que no se muestran.

Los registros mostraron una cinética compleja con la formación inicial de un intermediario que decae en forma secuencia con la formación de un nuevo compuesto que absorbe a 450 nm para el que no se posee un coeficiente de absorptividad y por lo tanto no se puede obtener un valor de velocidad que nos permita realizar comparaciones cinéticas con otras reacciones del peroxinitrito. Dada entonces la complejidad de este comportamiento, se realizaron dos tipos de análisis cinéticos, por un lado por el método de velocidades iniciales para los primeros 60 ms y por otro mediante el método integral a partir de los 100 ms. Los resultados del análisis por el método de velocidades iniciales para el peroxinitrito y el PLP se muestra en la figura 28.

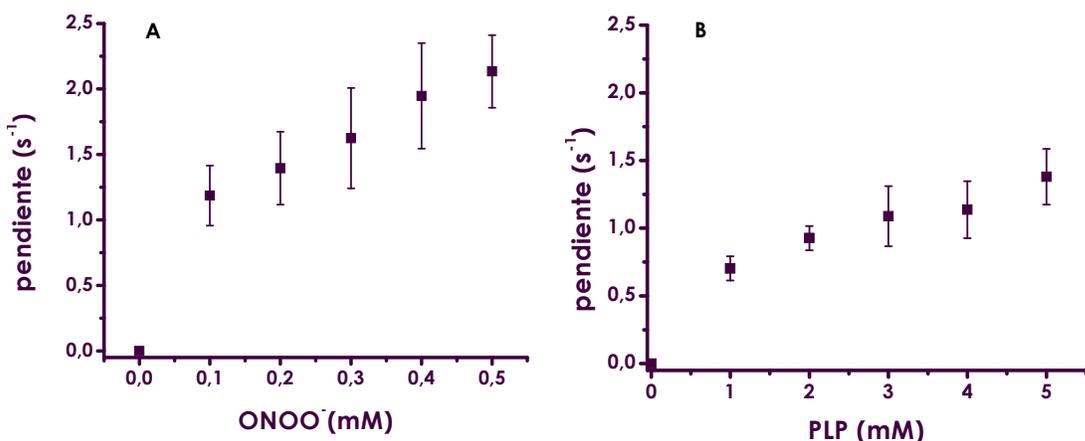


Figura 28. Análisis de los registros por el método de velocidades iniciales. El análisis y ajuste correspondiente se realizó para los primeros 60 ms para cada condición y con el software propio del equipo (Applied Photophysics SF.17 MV). Cada punto es el promedio de por lo menos 8 registros cinéticos a 450 nm. El valor correspondiente a 0 mM de PLP y de ONOO⁻ no fue determinado en forma experimental.

El análisis por velocidades iniciales muestra un aumento en la pendiente inicial relacionado con el aumento de la concentración de peroxinitrito. En las condiciones ensayadas el análisis visto en conjunto sugiere la existencia de una reacción de tipo radicalar indirecta entre el ONOO^- y el PLP, pero la falta de coeficiente de absortividad para el producto formado a 450 nm no hace posible la transformación de la pendiente dA/dt en velocidad para su comparación con respecto a la cinética de descomposición del peroxinitrito. La figura 29 muestra el ajuste a una función exponencial que se realizó a partir de los 100 ms.

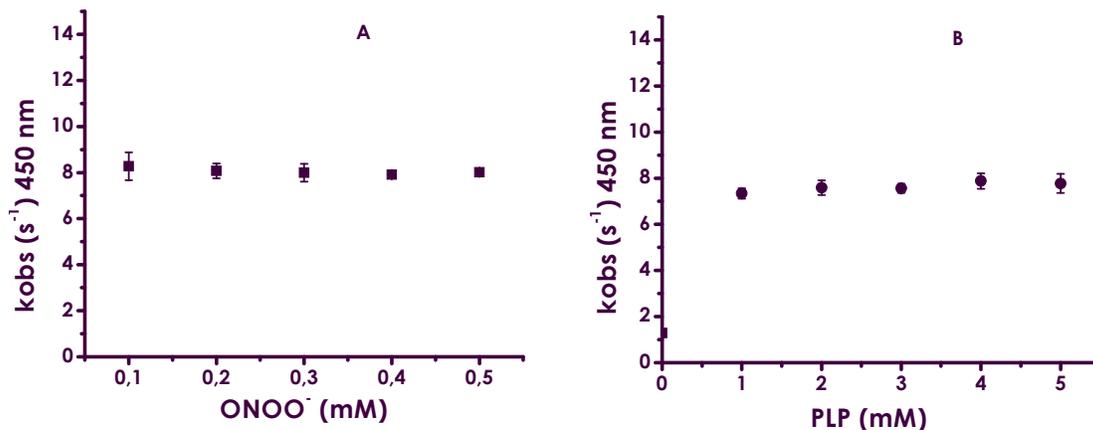


Figura 29. Análisis de los registros mediante ajuste exponencial. El análisis y ajuste correspondiente se realizó a partir de los 100 ms para cada condición y con el software propio del equipo (Applied Photophysics SF.17 MV). Cada punto es el promedio de por lo menos 8 registros cinéticos a 450 nm.

Si bien la constante exponencial hallada se mantuvo constante para las distintas concentraciones de PLP ensayadas, los valores fueron mayores a 0.9 s^{-1} , correspondiente a la descomposición del peroxinitrito en sus radicales, lo que estaría indicando entonces una reacción directa con el PLP, para lo cual se debería observar un aumento al aumentar la concentración de PLP, sin embargo esto no fue observado, por lo que nuevamente se observa una reacción muy compleja.

Por último se procedió a graficar producto formado en función de PLP y de ONOO^- como se muestra en la figura 30.

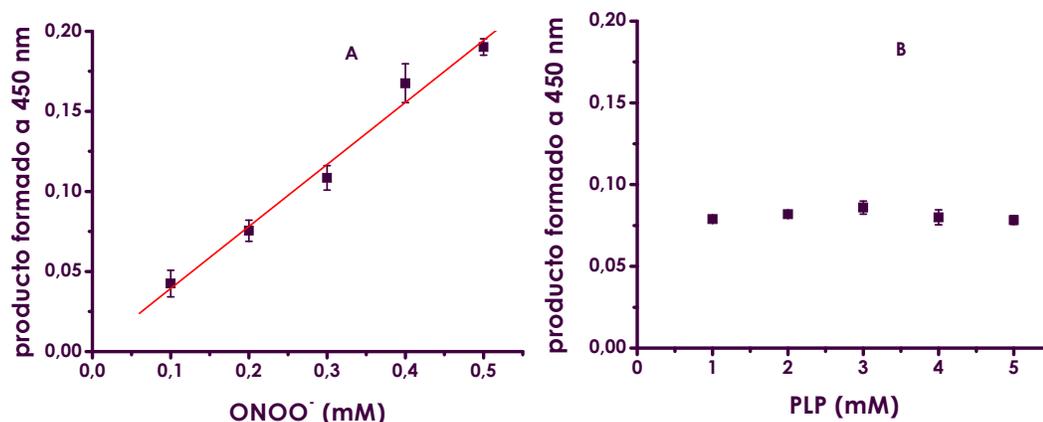


Figura 30. Formación de producto a 450 nm. La cantidad de producto formado se calculó como la diferencia entre la Ab_{sint} y la Ab_{50} para los registros obtenidos en la figura 27. Cada punto fue calculado a partir de la resta de los promedios para cada concentración de PLP y ONOO⁻.

La cantidad de producto formado fue independiente de la concentración de PLP y directamente proporcional a la concentración de ONOO⁻, lo que está de acuerdo con que el peroxinitrito es el limitante para la formación del producto de la reacción.

La cinética para la reacción entre el PLP y el ONOO⁻ mostró ser compleja por lo que resultó difícil establecer por este método si existe o no reacción directa entre ambos reactivos. Es por ello que se realizó entonces un experimento de competencia utilizando la reacción de oxidación del citocromo c^{2+} por el ONOO⁻ (figura 31).

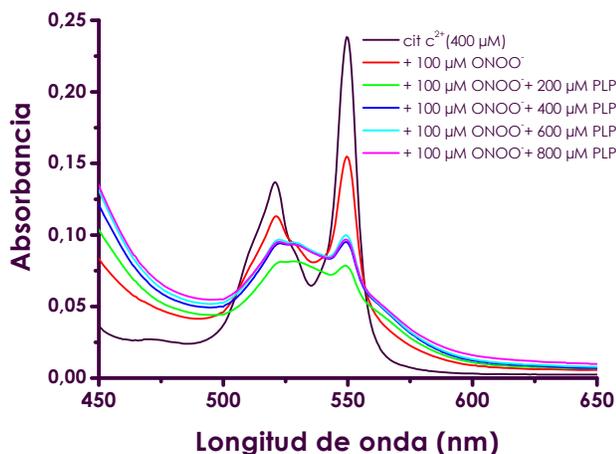


Figura 31. Ensayo de competencia entre el PLP y cit c reducido por PLP. Se expuso 400 μM de cit c^{2+} a peroxinitrito (100 μM) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de PLP (200, 400, 600 y 800 μM), en amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) y se registraron los espectros de diluciones 1/33.

Los datos obtenidos en el ensayo de competencia nuevamente no fueron concluyentes ya que se observó una oxidación mayor del citocromo c reducido en presencia de PLP. Es posible que en presencia de peroxinitrito el PLP reaccione con éste produciendo una nueva especie, quizá de naturaleza radicalar, capaz de oxidar más exhaustivamente al cit c²⁺ de lo que lo haría el peroxinitrito solo. Estos resultados entonces tampoco permitieron realizar ningún estimativo de constante cinética ni determinar si la reacción con el peroxinitrito es directa.

4.8.3 Liberación del cofactor PLP de la CBS tratada con peroxinitrito

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se procedió entonces a determinar si el PLP dentro de la enzima era capaz de ser modificado por el ONOO⁻. Se incubó CBS (7.4 μM) previamente incubada en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de peroxinitrito, con NH₂OH como se describió en procedimientos. La oxima formada fue cuantificada por su emisión característica a 442 nm mediante la realización previa de una curva de calibración (figura 32).

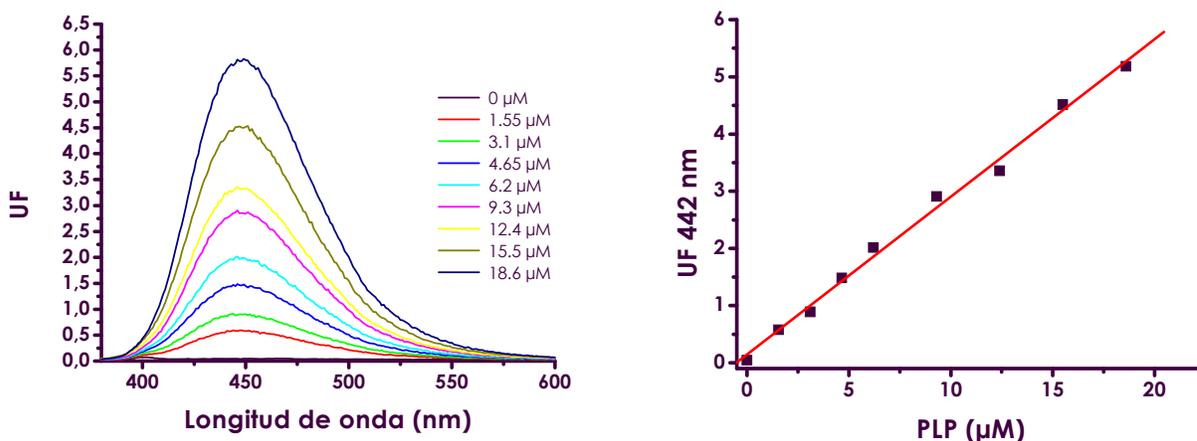


Figura 32. Curva de calibración de PLP oxima. Las soluciones de PLP de diferente concentración se prepararon en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) y se expusieron a 5 mM de hidroxilamina. Los espectros de fluorescencia se registraron luego de la excitación a 353 nm (ancho de banda 4 nm) para corroborar que la única especie presente es la oxima (izquierda). Para realizar la curva de calibración se consideró el máximo de emisión para la oxima ubicado en los 442 nm (ancho de banda 8 nm) (derecha).

La única especie que emitió en las condiciones establecidas fue la oxima correspondiente al PLP de la enzima y la cantidad liberada fue similar en ausencia y en presencia de todas las concentraciones de ONOO⁻ ensayadas. (tabla 2)

<i>ONOO-</i> (μM)	<i>PLP liberado</i> (μM)
0	6.9
200	6.1
500	5.6
800	6.2
Ad. reversa	6.0

Tabla 2. Cuantificación del PLP liberado de la CBS expuesta a peroxinitrito. La CBS ($7 \mu\text{M}$) se expuso a distintas concentraciones de peroxinitrito en amortiguador fosfato (0.1M , pH 7.4) con DTPA (0.1 mM). El PLP se cuantificó a partir de la oxima correspondiente obtenida luego de la ultrafiltración de la enzima y utilizando la curva de calibración correspondiente al día del experimento.

Asumiendo que cada monómero de CBS posee unido 1 PLP y que la concentración inicial de enzima fue de $7 \mu\text{M}$, los resultados muestran que la liberación del PLP de la enzima fue prácticamente total para todas las condiciones..

4.8.4 Efecto de peroxinitrito sobre la fluorescencia de CBS Δ 143

La CBS tetramérica no presenta la fluorescencia característica que poseen otras enzimas dependientes de PLP debido a un efecto de “apagado” interno del hemo. Sin embargo a pesar de la presencia del hemo, la CBS dimérica Δ 143 posee una fluorescencia débil correspondiente a las especies tautoméricas protonada y desprotonada del PLP probablemente debida a la ausencia de ciertos residuos críticos, emitiendo a 508 nm y 388 nm respectivamente cuando se excita a 420 nm y 330 nm respectivamente [21].

Se estudió entonces el efecto sobre la fluorescencia característica de la CBS Δ 143 del agregado de diferentes concentraciones de peroxinitrito.

Como se mencionó anteriormente las especies tautoméricas protonada (cetoenamina) y desprotonada (enolimina) en que se encuentra el PLP dentro de la enzima absorben en el UV-Vis a 420 nm y 330 nm respectivamente y contribuyen en un 20 % al espectro característico de la enzima [21, 226]. Para visualizar cambios en estas especies se realizó la excitación a 330 nm y 420 nm y se registraron los correspondientes espectros de emisión.

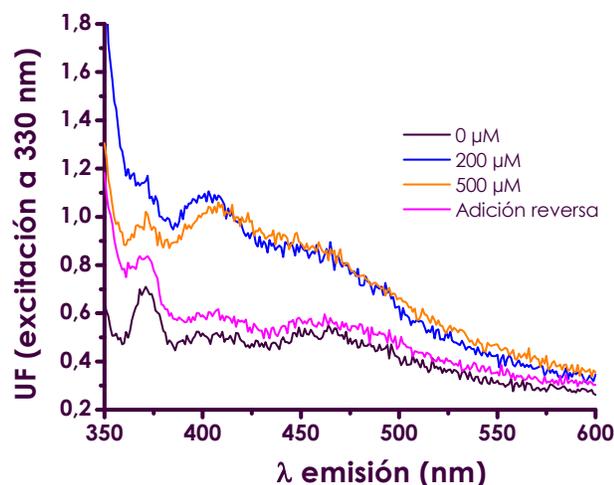


Figura 33. Espectro de emisión con excitación a 330 nm para la CBS expuesta a peroxinitrito. Los espectros se registraron entre 350 y 600 nm a pH 7.4 y temperatura ambiente.

A 330 nm se produce la excitación de la especie tautomérica desprotonada que emite con un máximo a 388 nm que en este caso se observó a 375 nm y con baja intensidad (figura 33). Si bien se observó un aumento de la señal de fluorescencia en todo el espectro para las muestras tratadas con peroxinitrito, esto probablemente se debió a la correspondiente destrucción de hemo, observada previamente en los espectros UV-Vis, lo que disminuyó su efecto de filtro interno. Con relación al máximo a 375 nm no se detectaron cambios apreciables para la enzima en ninguna condición ensayada.

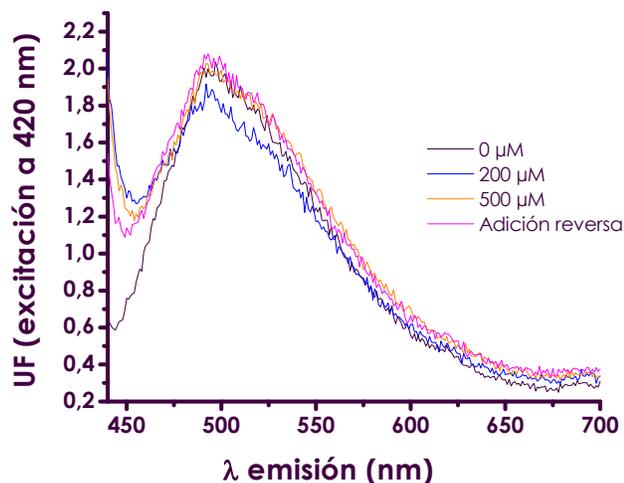


Figura 34. Espectro de emisión con excitación a 420 nm para la CBS expuesta a peroxinitrito. Los espectros se registraron entre 450 y 700 nm a pH 7.4 y temperatura ambiente.

La figura 34 muestra un único máximo a 508 nm correspondiente a la emisión de la aldimina interna protonada del PLP dentro de la CBS Δ143. No se observaron cambios significativos en la

emisión de este tautómero para ninguna concentración de ONOO^- ensayada lo que permitió concluir que no hubieron cambios apreciables en la estructura del cofactor PLP.

Se realizaron además los espectros de excitación para los máximos de emisión observados no detectándose máximos diferentes.

Si bien el PLP fuera de la enzima es capaz de reaccionar y modificarse frente a la exposición a peroxinitrito como se observó en los espectros UV-Vis registrados, los resultados obtenidos con la enzima tratada con peroxinitrito, tanto para la de liberación del PLP enzimático como para los espectros de fluorescencia de las respectivas especies tautoméricas del cofactor PLP no mostraron mayores modificaciones.

La excitación de la enzima a 280 nm produjo emisión en la zona entre los 300 y los 400 nm con un máximo a 340 nm debido principalmente a los 6 residuos de Trp que posee la enzima dimérica [21, 226].

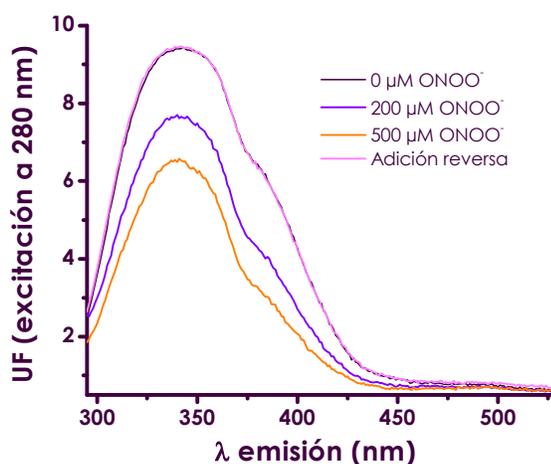


Figura 35. Espectro de emisión con excitación a 280 nm para la CBS expuesta a peroxinitrito. Los espectros se registraron entre 300 nm y 550 a pH 7.4 y temperatura ambiente.

A medida que aumentó la concentración de peroxinitrito a la que se expuso la enzima, la fluorescencia a 340 nm fue disminuyendo además de observarse un pequeño hombro a 380 nm que se mantuvo en todas las condiciones (figura 35). Es probable entonces que la exposición a peroxinitrito modifique los residuos Trp o su entorno provocando una disminución en la señal de fluorescencia.

4.9 ESTUDIO CINÉTICO DE LA REACCIÓN ENTRE PEROXINITRITO Y LA CBS Δ 143

4.9.1 Determinación directa de la velocidad de reacción por espectroscopia de flujo detenido

La inactivación de la enzima y las modificaciones del espectro UV-Vis por la exposición a peroxinitrito sugieren una reacción entre ambas moléculas. La vida media del peroxinitrito a pH fisiológico (entre 7.0 y 7.5) es menor a 1 s y por lo tanto para determinar su velocidad de reacción con cualquier molécula blanco se deben utilizar técnicas de cinética rápida como la espectroscopía de flujo detenido.

A los efectos de este trabajo inicialmente se determinó la constante de descomposición para el peroxinitrito en las condiciones del experimento: amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4) con DTPA (0.1 mM) y 37 °C, sabiendo que éste se descompone siguiendo una función exponencial con el tiempo (figura 36) [227]. El valor determinado en este caso fue de 0.79 s^{-1} , en el orden de lo reportado con anterioridad [132].

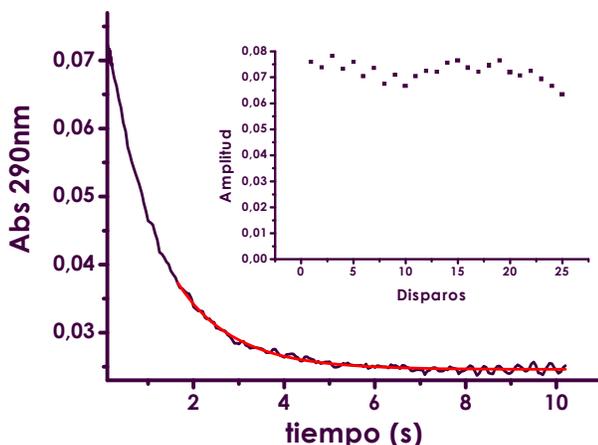


Figura 36 – Descomposición de peroxinitrito en ausencia de molécula blanco. El peroxinitrito ($50 \mu\text{M}$) en NaOH (0.5 mM) se mezcló con amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) La cinética se siguió a 290 nm y 37.1 °C, se muestra un registro típico y su ajuste a una caída exponencial simple. En el inserto se muestra la absorbancia inicial o amplitud a 290 nm del peroxinitrito durante la realización de un conjunto de disparos dentro de un experimento.

La cinética entre el peroxinitrito y la CBS se siguió a 290 nm ($\epsilon_{\text{ONOO}^-} = 1.55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y no a 302 nm como es usual, para minimizar cambios espectrales debidos a la enzima. La amplitud o absorbancia a tiempo = 0 para el peroxinitrito se mantuvo estable durante el tiempo que duró

cada conjunto de determinaciones cinéticas. También se controló el pH al inicio del experimento y luego del mezclado no observándose variaciones entre ambos valores.

Debido a que para este sistema no se podían alcanzar condiciones de pseudo primer orden y por lo tanto no se podía aplicar el método integral, la constante aparente de velocidad de descomposición para el peroxinitrito (k_{obs}) se determinó trabajando con concentraciones de peroxinitrito y CBS en rangos similares y utilizando el método de velocidades iniciales [185, 212] considerando la porción lineal del registro donde el consumo de peroxinitrito fue entre un 10 y un 15 %. Se siguió entonces la descomposición de peroxinitrito (50 μM) a 290 nm en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de CBS (5, 10 y 15 μM).

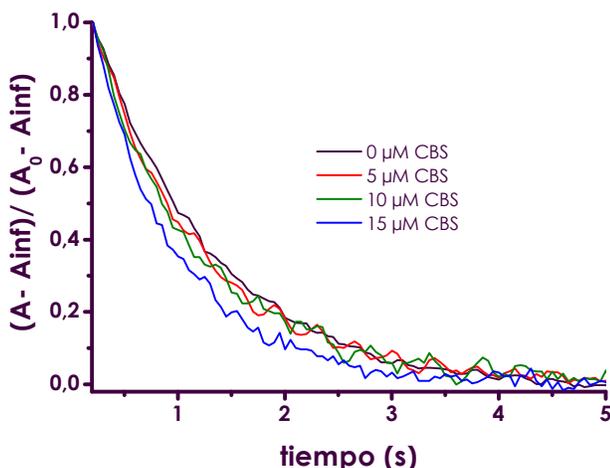


Figura 37. Registro cinético de la descomposición de peroxinitrito en presencia de concentraciones crecientes de CBS. El peroxinitrito (50 μM) se mezcló con concentraciones de CBS (5, 10 y 15 μM) en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM). La cinética de descomposición del ONOO^- se siguió a 290 nm y 37 °C.

Los registros cinéticos muestran un aumento en la velocidad de descomposición del ONOO^- con la concentración de enzima (figura 37) lo cual muestra que existe una reactividad directa de la enzima con el peroxinitrito.

Debido a que los cambios en la absorbancia a 290 nm son proporcionales a los cambios en la concentración de peroxinitrito y allí los cambios en la CBS son despreciables, la velocidad inicial de descomposición del peroxinitrito se puede calcular como:

$$-\frac{d[\text{ONOO}^-]}{dt}\Big|_0 = -\frac{dA/dt}{\text{epsilon}} = k_{obs} \frac{(A_0 - A_\infty)}{\text{epsilon}} = k_{obs} [\text{ONOO}^-]_0$$

Donde dA/dt corresponde al cambio inicial en la absorbancia, en este caso a 290 nm, A_0 es la absorbancia inicial y A_∞ es la absorbancia final.

Si se asume que en condiciones iniciales el consumo de sustrato es menor al 10% y se considera constante, la k_{obs} puede ser calculada como:

$$k_{obs} = -\frac{dA/dt}{(A_0 - A_\infty)}$$

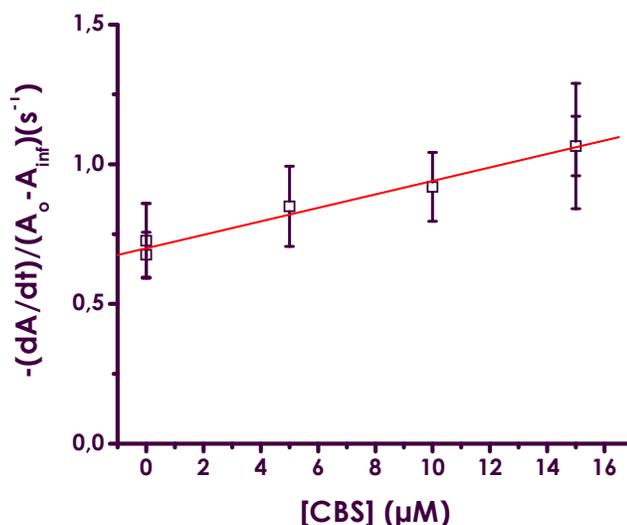


Figura 38. Determinación de la constante cinética para la reacción entre CBS y ONOO⁻ por el método de velocidades iniciales. Para la determinación de k_{obs} para cada concentración de enzima se consideraron las réplicas de experimentos realizados en días diferentes.

En este análisis el valor $(A_0 - A_{inf})$ fue similar en presencia y en ausencia de CBS confirmando que a 290 nm los cambios en la absorbancia se deben sólo a la descomposición del peroxinitrito. La constante cinética obtenida a partir de la pendiente mediante el ajuste por el método de velocidades iniciales fue de $(2.4 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (figura 38).

Se realizó además el ajuste a una función exponencial para la totalidad del tiempo registrado (20 s) con el fin de comprobar si la constante de descomposición del peroxinitrito se acelera o no en presencia de la CBS. Los datos ajustaron bien a la función: $P_1 e^{(-P_2 \cdot x)} + P_3$ y la k_{exp} mostró un aumento con concentraciones crecientes de enzima, en forma similar a los resultados obtenidos por el método de velocidades iniciales.

Por otro lado se registró la variación con el tiempo del espectro de CBS 5 μM expuesta a 130 μM de peroxinitrito que se muestra en la figura 39.

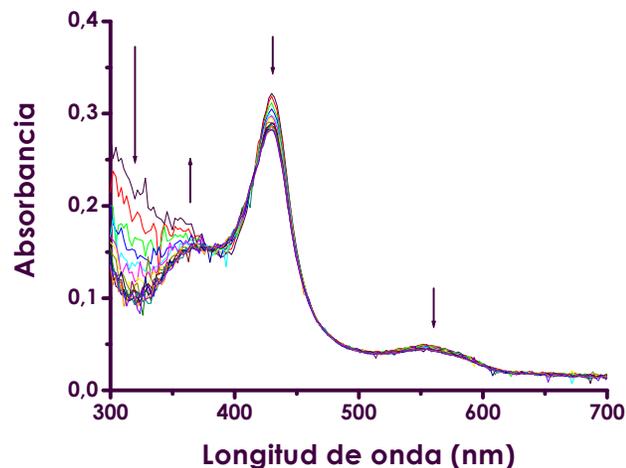


Figura 39. Variación temporal del espectro de CBS expuesta a peroxinitrito. Se muestran espectros registrados cada 0.589s, desde 0.0276 a 8.86 s para CBS (5 μM) tratada con peroxinitrito (130 μM). Los espectros se registraron con un tiempo de integración de 3.680 ms. Resultado obtenido por la Dra. Alvarez en la Universidad de Lincoln, Nebraska, E.E.U.U.

El espectro no mostró la formación de ningún intermediario de tipo ferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) que se pudiera formar durante la reacción como muestran otras hemoproteínas [179]. Se observó una disminución en la absorbancia a 429 nm y 550 nm y un incremento a 389 nm con el tiempo consistente con los cambios observados a punto final en este trabajo.

Si bien ocurren cambios a nivel de hemo de la enzima cuando se expone a peroxinitrito éstos no son de gran magnitud por lo que se descarta una reacción rápida entre el peroxinitrito y el $\text{Fe}(\text{III})$ CBS, lo cuál concuerda con la constante cinética determinada a 290 nm.

Considerando entonces los resultados obtenidos se estudió la cinética de la reacción a 429 nm donde el aporte a la absorbancia del peroxinitrito es despreciable y la totalidad de los cambios se deben al hemo enzimático.

Se expuso CBS (4.5 μM) a dos concentraciones de peroxinitrito (100 μM y 200 μM) y el análisis cinético se realizó en iguales condiciones que el ensayo anterior (figura 40). El tiempo total registrado se ajustó a una función de caída exponencial simple.

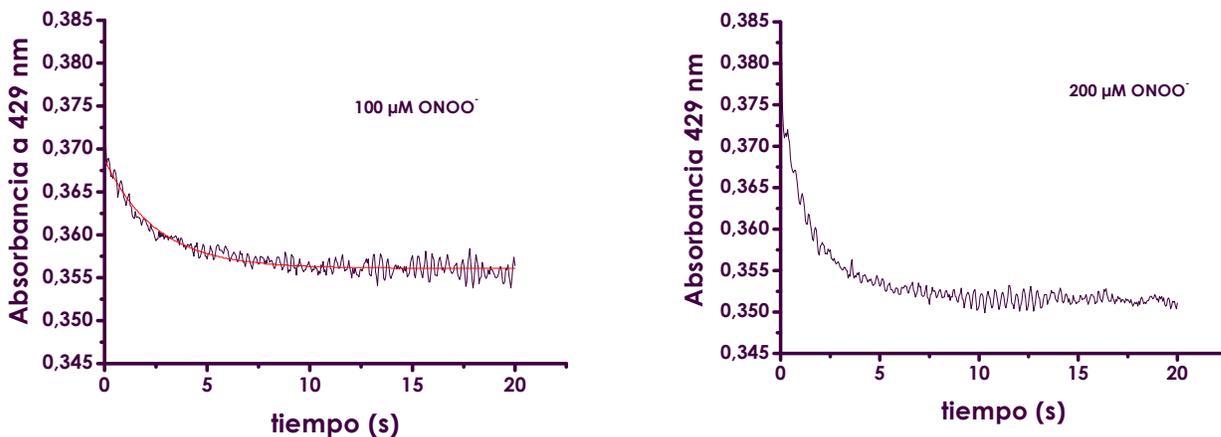


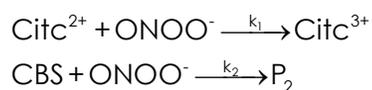
Figura 40. Registro a 429 nm de la cinética de reacción para la CBS expuesta a peroxinitrito. La CBS (4.5 μM) se expuso a 100 μM (izquierda) y 200 μM (derecha) de peroxinitrito en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M) con DTPA (0.1 mM) y la cinética se siguió a 37 $^{\circ}\text{C}$ registrando cambios en la absorción del hemo. Se muestra un experimento representativo de duplicados independientes.

Los registros cinéticos a 429 nm ajustaron bien a una caída exponencial y se realizaron por duplicado en días diferentes. La caída de absorbancia entre A_0 y A_{∞} registrada para ambas concentraciones de peroxinitrito coincidió con el ΔAbs_{429} registrado en los espectros UV-Vis a esas concentraciones de peroxinitrito para una concentración de CBS similar (5 μM).

Los valores de k_{exp} obtenidos a esta longitud de onda fueron un 50 % menores ($\sim 0.45 \text{ s}^{-1}$) a la descomposición del peroxinitrito sólo (0.79 s^{-1}) registrado a 290 nm. Si el hemo reaccionara con los radicales producidos a partir de la descomposición homolítica del peroxinitrito, entonces la k_{exp} determinada debería tener un valor cercano a 0.9 s^{-1} , en cambio se determinó un valor de $\sim 0.45 \text{ s}^{-1}$. Este resultado no tiene una interpretación simple y podrían estar reflejando por ejemplo, la formación rápida de algún producto que absorbe a 429 nm y que luego decae con un valor de 0.45 s^{-1} .

4.9.2 Determinación indirecta de la velocidad de reacción por competencia con citocromo c reducido

El citocromo c reducido (cit c^{2+}) es capaz de oxidarse a cit c^{3+} en presencia de peroxinitrito [182] con una $k = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$) y la magnitud de esta oxidación puede ser determinada por la desaparición del pico a 550 nm característico del cit c reducido. Conociendo entonces esa reactividad, la competencia entre la enzima y el cit c^{2+} por el peroxinitrito permite una aproximación al valor de la constante cinética de segundo orden entre la enzima y el peroxinitrito [227]. Las reacciones participantes fueron las siguientes:



Dado que la relación de concentraciones de producto generado por ambas reacciones es proporcional a la relación entre las constantes cinéticas, se puede determinar la constante cinética deseada.

En el diseño de un experimento de competencia se debe considerar que el producto de la constante cinética por la concentración de cada una de las moléculas participantes sea 10 veces superior a la constante de descomposición de peroxinitrito en ausencia de moléculas blanco (0.9 s^{-1}), y en nuestro caso además se trabajó en condiciones tales que el porcentaje de fuga a productos de la homólisis fuera menor al 10 %.

Debido a que para la concentración de CBS ($167 \mu\text{M}$) no se logró un exceso en relación al peroxinitrito ($100 \mu\text{M}$), para el cálculo de la constante cinética se utilizó la siguiente relación [228]:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{\ln \frac{[A_1]_0}{[A_1]_0 - [P_1]_\infty}}{\ln \frac{[A_2]_0}{[A_2]_0 - [P_2]_\infty}}$$

Donde $A_1 = \text{Cit } c^{2+}$, $A_2 = \text{CBS}$, $P_1 = \text{Cit } c^{3+}$ y P_2 se calcula como la diferencia entre el citocromo oxidado en ausencia y en presencia de CBS por peroxinitrito, k_1 corresponde a la constante cinética de segundo orden entre el citocromo reducido y el peroxinitrito y k_2 es la constante cinética que queremos determinar.

La tabla 3 muestra los valores obtenidos para citocromo c reducido en el ensayo de competencia con la enzima a partir de la absorbancia a 550 nm.

Condición	Cit c^{2+} (μM)
Control	200
+ CBS ($167 \mu\text{M}$)	170
+ ONOO $^-$ ($100 \mu\text{M}$)	70
+ CBS + ONOO $^-$	148

Tabla 3- Competencia por peroxinitrito entre citocromo c reducido y CBS. La concentración de citocromo c^{2+} se determinó a partir de la absorbancia a 550 nm obtenida con el valor de $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Con los datos obtenidos entonces se calculó la constante cinética de segundo orden para la reacción entre la CBS y el peroxinitrito utilizando la relación de constantes antes mencionada y se obtuvo un valor de $4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor se encuentra en el orden del obtenido por determinación directa de la cinética mediante la técnica de flujo detenido.

La k cinética determinada para la reacción entre la CBS y el peroxinitrito se encuentra en un orden de reactividad similar al que presentan el citocromo c^{2+} [182], la oxihemoglobina [122], la glutatión peroxidasa y el aminoácido selenocisteína [138]. Posee una reactividad menor a la de otras hemoproteínas como la HRP, la mieloperoxidasa o la lactoperoxidasa ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [128], las peroxirredoxinas [135, 229] y a otras moléculas como las porfirinas de manganeso y de hierro sintéticas que contienen metales de transición con mayor reactividad (10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [230-232].

4.10 EFECTO SOBRE LA INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA DE ATRAPADORES DE RADICALES DE PEROXINITRITO

Los estudios cinéticos realizados anteriormente han mostrado que la enzima reacciona directamente con el peroxinitrito, pero también podría hacerlo con los productos de su descomposición, los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\cdot\text{OH}$. Para analizar estas reactividades se expuso la enzima a peroxinitrito en presencia de especies químicas capaces de atrapar dichos radicales en forma selectiva y eficiente.

La enzima se expuso a peroxinitrito en presencia y en ausencia de manitol, p-HPA y trolox. El manitol es un conocido atrapador de radicales $\cdot\text{OH}$ que reacciona con una $k = 2.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.3 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$ [233]. El p-HPA es un análogo de la tirosina (tirosina desaminada) y posee mayor solubilidad lo que permite alcanzar soluciones más concentradas, además reacciona rápidamente con los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y OH con velocidades de $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivamente [159, 160]. El trolox es un derivado hidrosoluble del α -tocoferol (vitamina E) que reacciona con el radical $\cdot\text{NO}_2$ con una $k = 1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ así como con el peroxinitrito directamente [234].

La actividad de la CBS ($5 \text{ } \mu\text{M}$) incubada con los distintos atrapadores en presencia y en ausencia de peroxinitrito ($400 \text{ } \mu\text{M}$) se determinó mediante el método de la ninhidrina (tabla 4). Debido a que el trolox presentó interferencias tanto en los espectros UV-Vis realizados (no se muestran) como en el ensayo de actividad, no se consideró en este experimento.

Condición	Actividad CBS (U/mg)
CBS	561 ± 35
+ Peroxinitrito (400 µM)	105 ± 1
+ Peroxinitrito (400 µM) + Manitol (100 mM)	67 ± 5
+ Manitol (100 mM)	611 ± 47
+ Peroxinitrito (400 µM) + p-HPA (91 mM)	269 ± 11
+ p-HPA (91 mM)	521 ± 5

Tabla 4. Efecto del manitol y p-HPA sobre la inactivación de la CBS por peroxinitrito. La CBS (5 µM) se expuso a manitol (100 µM) y p-HPA (91 µM) en presencia y ausencia de peroxinitrito (400 µM) en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0,1M) con DTPA (0.1 mM). Luego de 2 min de incubación a 37 °C se determinó la actividad enzimática por el método de la ninhidrina.

Los resultados obtenidos muestran que el manitol fue incapaz de proteger a la enzima de la inactivación por peroxinitrito y permite entonces descartar a la especie radical $\cdot\text{OH}$ como responsable de dicha inactivación. El p-HPA en cambio protegió parcialmente a la enzima lo que sugiere que el radical $\cdot\text{NO}_2$ estaría participando de la inactivación.

4.11 ESTUDIO DE LA NITRACIÓN DE TIROSINA EN PRESENCIA DEL GRUPO HEMO DE LA CBS

Para determinar si el Fe(III) del hemo de la CBS en presencia de peroxinitrito es capaz de promover una mayor nitración de residuos aromáticos libres, se preparó una solución de Tyr (0.5 mM) que se incubó con peroxinitrito (0.5 mM) en presencia y ausencia de CBS (10 µM) (figura 41).

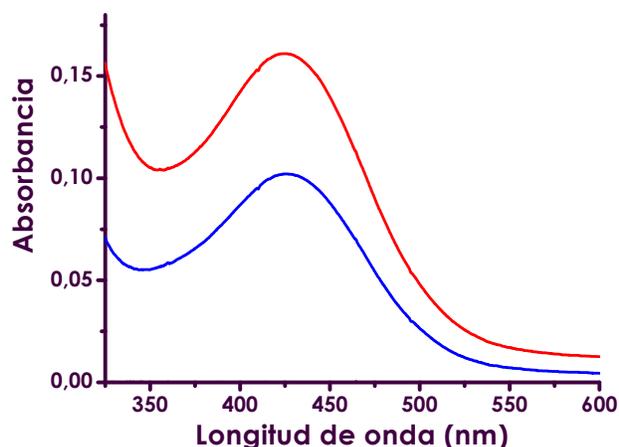


Figura 41. Cuantificación de nitrotirosina por UV-Vis. Se expuso Tyr (0.5 mM) a peroxinitrito (0.5 mM) en ausencia (—) y en presencia (—) de 10 µM CBS en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0,1 M). La mezcla se incubó durante 2 min a 37 °C, se ultrafiltró y se alcalinizó con NaOH hasta pH 10. Los espectros se registraron a temperatura ambiente.

La concentración de nitrotirosina obtenida en ausencia de CBS fue 34.7 μM y en presencia de enzima fue de 23.2 μM mostrando que el Fe(III) presente en el hemo de la proteína no promueve la nitración de residuos aromáticos libres. La cuantificación por HPLC (figura 42) mostró resultados similares y comparables a los obtenidos por espectrofotometría (27 μM y 15.5 μM respectivamente).

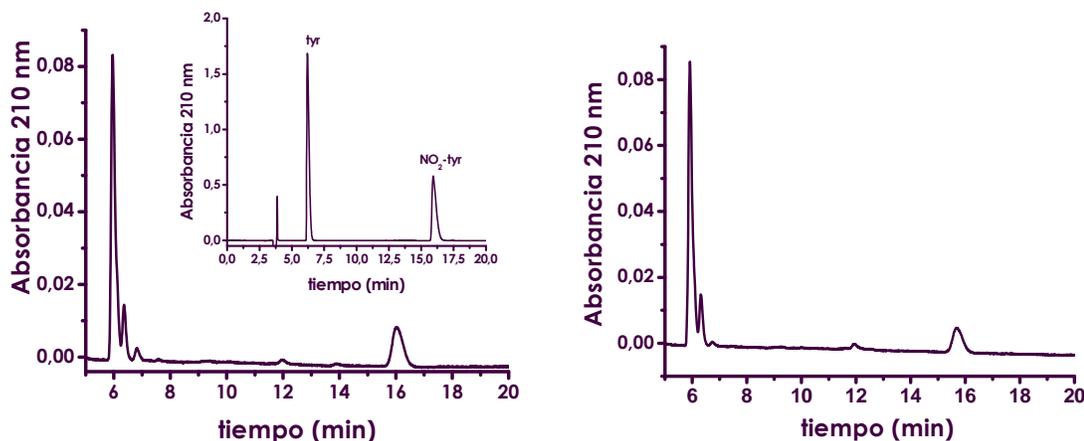


Figura 42. Cuantificación de nitrotirosina por HPLC. Se expuso Tyr (0.5 mM) a peroxinitrito (0.5 mM) en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de 10 μM CBS en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0.1 M). Las mezclas se incubaron durante 2 min a 37 °C, se ultrafiltraron e inyectaron en una dilución 1/5 en una columna C18 de fase reversa con 6.5 % acetonitrilo, 0.1% TFA y 93.4 % H₂O como fase móvil. Se muestra la absorbancia a 210 nm del estándar y las muestras. El inserto en la figura de la derecha corresponde al registro del estándar a 210 nm.

Tanto las hemoproteínas como la HRP o la microperoxidasa, como aquellas que poseen un grupo hemo de tipo hemotiolato pentacoordinado como la P₄₅₀CAM, prostaciclina sintasa, cloroperoxidasa [174, 180, 190] son capaces de formar un oxocompuesto de tipo ferrilo que aumenta el rendimiento de nitración del peroxinitrito. En cambio, otro hemo hexacoordinado, el citocromo c³⁺, no promueve un aumento en el rendimiento de nitración [181, 182],

En este caso, el hemotiolato hexacoordinado de la CBS tampoco promovió una mayor nitración de la tirosina libre expuesta a peroxinitrito. Estos resultados coinciden con los obtenidos para los espectros UV-Vis dependientes del tiempo en los ensayos de flujo detenido donde no se observó la formación de ningún intermediario de tipo ferrilo por exposición de la CBS al peroxinitrito. Es probable entonces que la disposición hexacoordinada en el hemo no permita la interacción del átomo de Fe con el peroxinitrito imposibilitando la formación de ese tipo de compuestos. Es posible además que el peroxinitrito en presencia de la enzima prefiera nitrar a ésta antes que a la tirosina libre, disminuyendo su disponibilidad y por lo tanto la concentración de nitrotirosina en presencia de CBS es menor.

4.12 EFECTO DEL BICARBONATO SOBRE LA NITRACIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LA CBS EXPUESTA A PEROXINITRITO

4.12.1 Efecto del bicarbonato sobre la nitración e la CBS expuesta a peroxinitrito

Para estudiar el efecto del peroxinitrito sobre la nitración enzimática y la formación de agregados covalentes, así como el efecto del anión bicarbonato sobre esta exposición, la CBS (5 μM) se expuso a diferentes concentraciones de peroxinitrito en presencia y ausencia de 25 mM HCO_3^- y se analizó por electroforesis (figura 43) e inmunodetección (figura 44).

En ausencia de bicarbonato se observó una desaparición progresiva de la banda característica correspondiente a la enzima que se resolvió en múltiples fragmentos hasta su desaparición total a la mayor concentración de peroxinitrito (1000 μM).

En presencia de bicarbonato todas las muestras mostraron la banda correspondiente a la enzima con intensidad similar a la de la enzima expuesta a 100 μM de ONOO^- en ausencia de bicarbonato junto con la presencia de agregados covalentes de diferente peso molecular que se ven tenuemente en la figura.

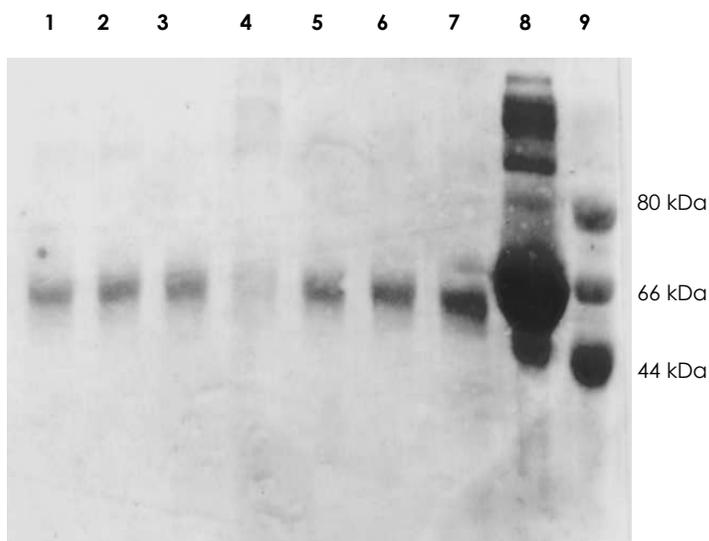


Figura 43- Electroforesis en SDS-PAGE de CBS expuesta a peroxinitrito y bicarbonato. La enzima (5 μM) fue tratada con 10, 100 y 1000 μM de ONOO^- en presencia y ausencia de 25 mM NaHCO_3 , se sembró en geles en condiciones desnaturizantes y reductoras. Carriles 1 a 3, CBS tratada con 1000, 100 y 10 μM ONOO^- en presencia de 25 mM HCO_3^- , carriles 4 a 6 idem anteriores en ausencia de HCO_3^- , carril 7, CBS control (5 μM), carril 8, BSA nitrada (150 μM), carril 9, marcador de PM.

Los resultados de la electroforesis mostraron una protección parcial del bicarbonato frente a la formación de agregados proteicos por exposición a peroxinitrito.

Este efecto ha sido previamente reportado por Denicola y colaboradores [140] y sugiere que en presencia de CO_2 , además de evitar la reacción directa entre el peroxinitrito y la enzima, luego

de formar el aducto con peroxinitrito y en presencia de blancos se transforma en un 35% en especies oxidantes ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$) que reaccionan más lentamente que el $\cdot\text{OH}$.

Para evaluar el grado de nitración de la enzima por peroxinitrito en presencia de bicarbonato se realizó un inmunoensayo sobre las muestras anteriores con anticuerpos anti nitrotirosina.

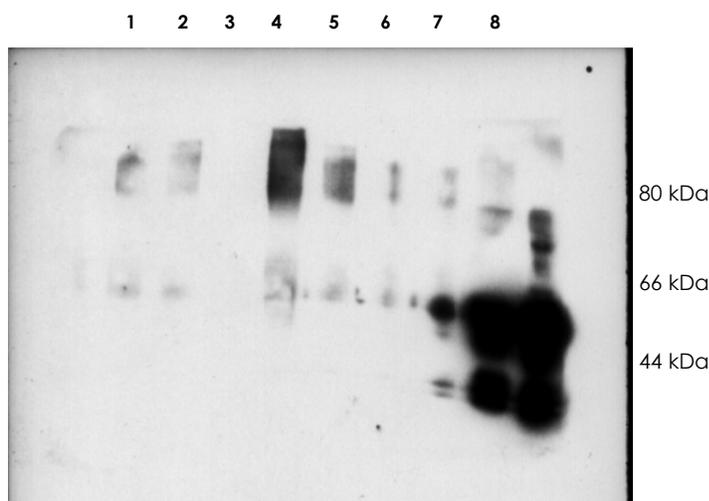


Figura 44. Inmunodetección de nitrotirosina en CBS expuesta a peroxinitrito en presencia de bicarbonato. Las proteínas se electrotransfirieron a 150 mV. Se utilizó como anticuerpo primario antinitrotirosina de conejo (1/1000) y como anticuerpo secundario antiinmunoglobulina de conejo conjugada con HRP (1/5000). La membrana de nitrocelulosa se reveló mediante el sistema ECL. Carriles 1 a 3, CBS tratada con 1000, 100 y 10 μM ONOO $^-$ en presencia de 25 mM HCO_3^- , carriles 4 a 6 igual a carriles 1 a 3 en ausencia de HCO_3^- , carril 7, CBS control (5 μM), carril 8, BSA (150 μM) nitrada.

Las bandas de alto peso molecular reconocidas por los anticuerpos anti-nitrotirosina son debidos a la formación de agregados previamente observados en el revelado de proteínas (figura 43) y han sido observados en trabajos previos con Mn-SOD y surfactantes [235, 236].

La CBS en ausencia de bicarbonato mostró un patrón de nitración creciente con la concentración de peroxinitrito. En presencia de bicarbonato se observó una protección parcial de la nitración observada previamente manteniendo de todos modos una relación dependiente de la concentración de peroxinitrito. Este efecto protector del bicarbonato (25 mM) sobre la nitración fue previamente observado en la Mn-SOD para una concentración de 5 μM expuesta a 500 μM de peroxinitrito, donde al aumentar la concentración de enzima el efecto revirtió observándose una promoción de la nitración por presencia de bicarbonato [212] que también se observó en la aconitasa mitocondrial para una concentración de enzima de 0.1 μM y 200 μM de peroxinitrito [213].

Los datos cinéticos para la reacción del peroxinitrito con la CBS y con el CO_2 son del mismo orden ($\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) pero el CO_2 se encuentra en exceso con respecto a la enzima. En presencia de una baja concentración de enzima (5 μM) el CO_2 compete con ésta y reacciona predominantemente con el peroxinitrito. Sin embargo el CO_2 no funciona como atrapador de peroxinitrito y a su vez genera un 35 % de especies nitrantes como el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$, sin embargo su reacción es más lenta y de todos modos nitra a la enzima pero en menor magnitud de lo que lo haría el peroxinitrito o sus radicales.

4.12.2 Efecto del bicarbonato sobre la actividad de la CBS expuesta a peroxinitrito

Se determinó la actividad enzimática de la CBS expuesta a diferentes concentraciones de peroxinitrito en presencia y en ausencia de bicarbonato para determinar su relación con el grado de nitración observado en el experimento anterior.

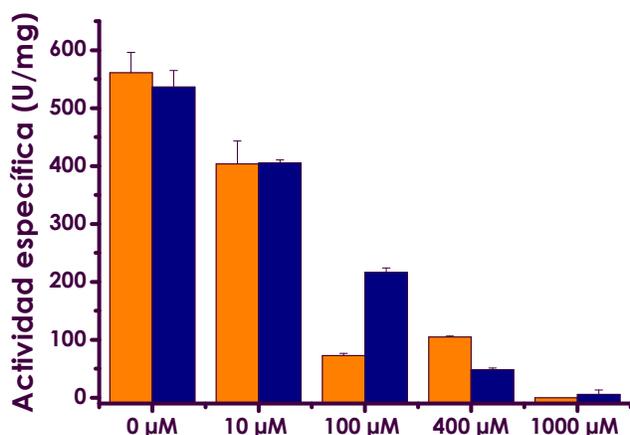


Figura 45. Actividad enzimática de CBS expuesta a peroxinitrito en presencia de bicarbonato. La CBS (5 μM) fue tratada con diferentes concentraciones de peroxinitrito en presencia (■) y ausencia (■) de bicarbonato en amortiguador fosfato (pH 7.4, 0,1M) con DTPA (0.1 mM). Luego de 2 min de incubación a 37 °C se determinó la actividad enzimática por el método de la ninhidrina.

La actividad enzimática determinada para diferentes concentraciones de peroxinitrito en presencia de bicarbonato fue compleja, ya que para 100 μM de peroxinitrito se observó un efecto protector del bicarbonato, mientras que para 400 μM se observó un aumento en la inactivación. Para la enzima aconitasa se ha observado que la presencia de bicarbonato aumenta la inactivación por peroxinitrito disminuyendo su valor de IC₅₀ al tercio, mientras que en términos de nitración muestra protección [213], al igual que lo observado en este caso con la CBS.

La protección de la nitración y la oxidación proteica que mostró el bicarbonato para la CBS expuesta a distintas concentraciones de peroxinitrito, no fue acompañada por la protección de la inactivación esperada. Es probable entonces que la inactivación de la CBS ocurra por mecanismos diferentes a la nitración de residuos aromáticos.

La relación entre grado de nitración e inactivación por exposición a peroxinitrito ha mostrado ser variable en diferentes hemoproteínas. Algunas son inactivadas por exposición a peroxinitrito y esto se correlaciona con la concentración de nitrotirosina determinada, como es el caso de la citocromo P450 2B1 [75] y la Mn-SOD [212] y en general poseen algún residuo de Tyr crítico presente en su sitio activo. Otras como la citocromo P450 BM-3 poseen un IC₅₀ para su inactivación significativamente menor a la concentración de peroxinitrito estimada para obtener un 50 % de nitración [179],

sugiriendo la presencia de otros blancos como responsables de la inactivación como residuos de cisteína que podrían ser modificados [237].

Con respecto a la CBS dimérica, ésta posee 7 residuos de Tyr y 6 Trp potencialmente nitrables. La nitración del residuo Tyr233 presente en el entorno del PLP podría ser parcialmente responsable de la inactivación observada. Si bien el cofactor PLP es el principal responsable de la catálisis en la CBS, la conformación de los residuos que lo rodean se encuentran altamente conservados entre la CBS y la OASS (*O*-acetilserín sulfhidrilasa). En el caso de la CBS de levaduras, ratones y humanos los residuos Tyr233 y Gly307 son fundamentales para la especificidad por el sustrato de acuerdo con resultados cristalográficos [52]. Experimentos con mutantes de CBS en levadura donde se sustituyó el residuo Tyr158 (correspondiente al residuo Tyr233 en la CBS humana) por un residuo Phe mostraron que la Tyr158 si bien no participa de la catálisis, es responsable de la especificidad por el sustrato, mediante el mantenimiento de la conformación cerrada del sitio activo que permite que el intermediario aminoacrilato no se disocie del PLP [238].

5 CONCLUSIONES

La CBS $\Delta 143$ purificada a partir del plásmido pGEXCBSN se obtuvo en un alto grado de pureza y con una actividad de 590 ± 150 U mg^{-1} , comparable a la reportada en la bibliografía.

La enzima fue inactivada por el peroxinitrito con un IC_{50} de 163 ± 14 μM para 5 μM , mostrando una sensibilidad moderada al peroxinitrito.

El hemo hexacoordinado de la CBS $\Delta 143$ en estado oxidado no reacciona con la mayoría de los ligandos comunes de hemos y sólo ha mostrado ser reactivo frente al HgCl_2 , sin embargo fue modificado en estado oxidado frente al agregado de ONOO^- . Los resultados espectrales obtenidos para la enzima oxidada expuesta a peroxinitrito mostraron que existiría una pérdida de coordinación con el tiolato del ligando Cys52 en el hemo que sería sustituida por un residuo aminoacídico neutro (ej: His o Pro) que desplaza el máximo de absorción hacia el azul y en alto spin.

Si bien el hemo no está directamente involucrado en la catálisis y se encuentra a una distancia de 20 Å del cofactor PLP varias evidencias desarrolladas al inicio de este trabajo indican la existencia de comunicación entre estos dos sitios [23, 77, 92, 95]. El ligando axial del hemo, la Cys52, se encuentra unido mediante un puente de hidrógeno con la Arg266 y a partir de este residuo se extiende una hélice α hasta la Thr257. El cofactor PLP se encuentra anclado a la enzima mediante un puente de hidrógeno con ese residuo y con la Thr 260. La falta de contacto entre la Cys52 y la Arg266, por ejemplo por pérdida o ausencia de la Cys, es transmitida hacia la Thr 257 y 260, alterando la interacción con el grupo fosfato del PLP lo que resulta en un debilitamiento en la unión de dicho cofactor. De hecho existen dos mutaciones presentes en pacientes con homocisteinemia hereditaria que involucran a los residuos Arg266 y Thr257 [89]. Debido a que la pérdida de integridad del grupo hemo no fue tan importante como la inactivación enzimática observada, sobre todo a bajas concentraciones de peroxinitrito, es probable que existan otros factores que aporten a esta inactivación.

A los efectos de evaluar si la inactivación podía deberse además a una interacción con el cofactor PLP de la enzima que participa activamente de la catálisis, paralelamente se estudió la reactividad del PLP libre con el peroxinitrito. Éste fue modificado por el peroxinitrito aunque la cinética para esta interacción mostró ser compleja, con la aparente formación de un intermediario más oxidante que el propio peroxinitrito, de acuerdo a los datos obtenidos en los ensayos de competencia con citocromo c. El PLP enzimático sin embargo no mostró modificaciones por exposición a peroxinitrito que se pudieran traducir en una pérdida de actividad.

El peroxinitrito fue capaz de nitrar a la enzima en una relación dependiente de la dosis de acuerdo con los resultados obtenidos por inmunodetección. Sin embargo la presencia de un complejo tipo ferrilo fue descartada ya que no se observó la presencia de ningún intermediario en los espectros dependientes de tiempo, ni un aumento en la nitración por la presencia de la enzima cuando se expuso tirosina libre a peroxinitrito.

La constante de segundo orden para la cinética de reacción entre el peroxinitrito y la CBS fue determinada y su valor estuvo entre 2.4 y $4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7.4 y $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Se demostró también que en la inactivación participan los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$.

Si bien el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ protegió a la enzima de la nitración para todas las concentraciones de peroxinitrito ensayadas, esto no tuvo relación directa con la inactivación en términos generales.

Es posible entonces que la inactivación de la CBS $\Delta 143$ por peroxinitrito se deba a una contribución de la pérdida de la integridad a nivel del hemo acompañada de la nitración de residuos aromáticos en el entorno del sitio activo que podrían interferir en la catálisis.

Los resultados obtenidos y analizados en su conjunto indican que si bien es posible una interacción entre la CBS y el peroxinitrito que conduce a su inactivación, ésto no tendría mayor relevancia en términos biológicos, ya que a nivel celular existen múltiples blancos con los que el peroxinitrito ha mostrado reaccionar más rápidamente como es el caso de las peroxirredoxinas y el valor de IC_{50} determinado hace poco probable que la CBS se altere de forma de influir sobre la concentración de homocisteína circulante. Esta reactividad solo adquiere relevancia fisiológica si es posible la formación de peroxinitrito cercana a la localización de la CBS y en flujos de concentraciones importantes como los que podrían ocurrir en condiciones de desbalance oxidativo.

Como continuación de este trabajo y como forma de corroborar estos resultados deberían realizarse estudios *in vivo* en cultivos celulares hepáticos que aporten evidencias de la formación de peroxinitrito en condiciones de estrés oxidativo y sus consecuencias sobre la actividad de la CBS.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Butz, L.W.a.D.V., V., *The formation of homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid.* Journal of Biochemical Chemistry, 1932. **99**: p. 135-142.
2. Carson, N.A. and D.W. Neill, *Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland.* Arch Dis Child, 1962. **37**: p. 505-13.
3. Gerritsen, T., J.G. Vaughn, and H.A. Waisman, *The identification of homocystine in the urine.* Biochem Biophys Res Commun, 1962. **9**: p. 493-6.
4. McCully, K.S., Am J Pathol, 1969. **56**: p. 111-128.
5. Israelsson, B., L.E. Brattstrom, and B.L. Hultberg, *Homocysteine and myocardial infarction.* Atherosclerosis, 1988. **71**(2-3): p. 227-33.
6. Kang, S.S., et al., *Protein-bound homocyst(e)ine. A possible risk factor for coronary artery disease.* J Clin Invest, 1986. **77**(5): p. 1482-6.
7. Brattstrom, L.E., J.E. Hardebo, and B.L. Hultberg, *Moderate homocysteinemia--a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease.* Stroke, 1984. **15**(6): p. 1012-6.
8. Boers, G.H., et al., *Improved identification of heterozygotes for homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency by the combination of methionine loading and enzyme determination in cultured fibroblasts.* Hum Genet, 1985. **69**(2): p. 164-9.
9. Boers, G.H., et al., *Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease.* N Engl J Med, 1985. **313**(12): p. 709-15.
10. Malinow, M.R., et al., *Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease.* Circulation, 1989. **79**(6): p. 1180-8.
11. Mudd, S.H., et al., *Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity.* Biochem Biophys Res Commun, 1972. **46**(2): p. 905-12.
12. Mudd, S.H.L., H.L.; Skovby, F., *Disorders of transsulfuration, in The metabolic and molecular bases of inherited disease, C.R.B. Scriver, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D., Editor. 1995, McGraw-Hill: New York. p. 1279 -1327.*
13. Kang, S.S., P.W. Wong, and M. Norusis, *Homocysteinemia due to folate deficiency.* Metabolism, 1987. **36**(5): p. 458-62.
14. Brattstrom, L.E., et al., *Folic acid--an innocuous means to reduce plasma homocysteine.* Scand J Clin Lab Invest, 1988. **48**(3): p. 215-21.
15. Smolin, L.A., et al., *Homocyst(e)ine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B-6: relationship to atherosclerosis.* J Nutr, 1983. **113**(10): p. 2022-33.
16. Reed, D.J., *Cystathionine.* Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 92-102.
17. Stipanuk, M.H., *Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine.* Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 539-77.
18. Finkelstein, J.D. and J.J. Martin, *Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine.* Biochem Biophys Res Commun, 1984. **118**(1): p. 14-9.
19. Griffith, O.W., *Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview.* Methods Enzymol, 1987. **143**: p. 366-76.
20. Zou, C.G. and R. Banerjee, *Homocysteine and redox signaling.* Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(5-6): p. 547-59.
21. Kery, V., et al., *Binding of pyridoxal 5'-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase.* Biochemistry, 1999. **38**(9): p. 2716-24.
22. Kraus, J.P., *Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency.* Eur J Pediatr, 1998. **157 Suppl 2**: p. S50-3.
23. Taoka, S., M. West, and R. Banerjee, *Characterization of the heme and pyridoxal phosphate cofactors of human cystathionine beta-synthase reveals nonequivalent active sites.* Biochemistry, 1999. **38**(22): p. 7406.

24. Taoka, S., et al., *Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25179-84.
25. Banerjee, R. and C.G. Zou, *Redox regulation and reaction mechanism of human cystathionine-beta-synthase: a PLP-dependent hemesensor protein*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(1): p. 144-56.
26. Mosharov, E., M.R. Cranford, and R. Banerjee, *The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes*. Biochemistry, 2000. **39**(42): p. 13005-11.
27. Selhub, J., *Homocysteine metabolism*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 217-46.
28. Blom, H.J., *Consequences of homocysteine export and oxidation in the vascular system*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(3): p. 227-32.
29. Chen, P., et al., *Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease*. Adv Enzyme Regul, 1999. **39**: p. 93-109.
30. Jacobsen, D.W., *Homocysteine targeting of plasma proteins in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2006. **69**(5): p. 787-9.
31. Lindgren, A., et al., *Plasma homocysteine in the acute and convalescent phases after stroke*. Stroke, 1995. **26**(5): p. 795-800.
32. Perry, I.J., et al., *Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men*. Lancet, 1995. **346**(8987): p. 1395-8.
33. Rodrigo, R., et al., *Homocysteine and essential hypertension*. J Clin Pharmacol, 2003. **43**(12): p. 1299-306.
34. Upchurch, G.R., Jr., et al., *Stimulation of endothelial nitric oxide production by homocyst(e)ine*. Atherosclerosis, 1997. **132**(2): p. 177-85.
35. Starkebaum, G. and J.M. Harlan, *Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine*. J Clin Invest, 1986. **77**(4): p. 1370-6.
36. Wall, R.T., et al., *Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury*. Thromb Res, 1980. **18**(1-2): p. 113-21.
37. Topal, G., et al., *Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(12): p. 1532-41.
38. Patel, K.B., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin by biological radicals and scavenging of the trihydrobiopterin radical by ascorbate*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(3): p. 203-11.
39. De Mayer, G.a.H., A.G., *Nitric oxide and vascular endothelial dysfunction*, in *Nitric oxide: Biology and pathobiology*, L.J. Ignarro, Editor. 2000, Academic Press: San Diego, California. p. 556.
40. Mattson, M.P. and T.B. Shea, *Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders*. Trends Neurosci, 2003. **26**(3): p. 137-46.
41. Sturman, J.A., G.E. Gaull, and W.H. Niemann, *Cystathionine synthesis and degradation in brain, liver and kidney of the developing monkey*. J Neurochem, 1976. **26**(3): p. 457-63.
42. Bao, L., et al., *Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms*. Arch Biochem Biophys, 1998. **350**(1): p. 95-103.
43. Skovby, F., N. Krassikoff, and U. Francke, *Assignment of the gene for cystathionine beta-synthase to human chromosome 21 in somatic cell hybrids*. Hum Genet, 1984. **65**(3): p. 291-4.
44. Kraus, J.P. and L.E. Rosenberg, *Cystathionine beta-synthase from human liver: improved purification scheme and additional characterization of the enzyme in crude and pure form*. Arch Biochem Biophys, 1983. **222**(1): p. 44-52.
45. Kery, V., L. Poneleit, and J.P. Kraus, *Trypsin cleavage of human cystathionine beta-synthase into an evolutionarily conserved active core: structural and functional consequences*. Arch Biochem Biophys, 1998. **355**(2): p. 222-32.
46. Swaroop, M., et al., *Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11455-61.
47. Kraus, J.P., *Komrower Lecture. Molecular basis of phenotype expression in homocystinuria*. J Inherit Metab Dis, 1994. **17**(4): p. 383-90.

48. Shan, X. and W.D. Kruger, *Correction of disease-causing CBS mutations in yeast*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 91-3.
49. Taoka, S., L. Widjaja, and R. Banerjee, *Assignment of enzymatic functions to specific regions of the PLP-dependent heme protein cystathionine beta-synthase*. Biochemistry, 1999. **38**(40): p. 13155-61.
50. Coude, M., et al., *Four novel mutations at the cystathionine beta-synthase locus causing homocystinuria*. J Inher Metab Dis, 1998. **21**(8): p. 823-8.
51. Zou, C.G. and R. Banerjee, *Tumor necrosis factor-alpha-induced targeted proteolysis of cystathionine beta-synthase modulates redox homeostasis*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16802-8.
52. Meier, M., et al., *Structure of human cystathionine beta-synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein*. Embo J, 2001. **20**(15): p. 3910-6.
53. Bruno, S., et al., *Functional properties of the active core of human cystathionine beta-synthase crystals*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 16-9.
54. Janosik, M., et al., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the active core of human recombinant cystathionine beta-synthase: an enzyme involved in vascular disease*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 2): p. 289-91.
55. Taoka, S., et al., *Human cystathionine beta-synthase is a heme sensor protein. Evidence that the redox sensor is heme and not the vicinal cysteines in the CXXC motif seen in the crystal structure of the truncated enzyme*. Biochemistry, 2002. **41**(33): p. 10454-61.
56. Bukovska, G., V. Kery, and J.P. Kraus, *Expression of human cystathionine beta-synthase in Escherichia coli: purification and characterization*. Protein Expr Purif, 1994. **5**(5): p. 442-8.
57. Munke, M., et al., *The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17*. Am J Hum Genet, 1988. **42**(4): p. 550-9.
58. Delabar, J.M., et al., *Submicroscopic duplication of chromosome 21 and trisomy 21 phenotype (Down syndrome)*. Hum Genet, 1987. **76**(3): p. 225-9.
59. Fowler, B., et al., *Homocystinuria. Evidence for three distinct classes of cystathionine beta-synthase mutants in cultured fibroblasts*. J Clin Invest, 1978. **61**(3): p. 645-53.
60. Lipson, M.H., J. Kraus, and L.E. Rosenberg, *Affinity of cystathionine beta-synthase for pyridoxal 5'-phosphate in cultured cells. A mechanism for pyridoxine-responsive homocystinuria*. J Clin Invest, 1980. **66**(2): p. 188-93.
61. Mudd, S.H., et al., *The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency*. Am J Hum Genet, 1985. **37**(1): p. 1-31.
62. Janosik, M., et al., *Regulation of human cystathionine beta-synthase by S-adenosyl-L-methionine: evidence for two catalytically active conformations involving an autoinhibitory domain in the C-terminal region*. Biochemistry, 2001. **40**(35): p. 10625-33.
63. John, R.A., *Pyridoxal phosphate-dependent enzymes*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1248**(2): p. 81-96.
64. Walsh, C., *Enzymatic reactions mechanisms*, ed. W.H.F. Co. 1979, San Francisco, CA. 777-827.
65. Aitken, S.M. and J.F. Kirsch, *The enzymology of cystathionine biosynthesis: strategies for the control of substrate and reaction specificity*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(1): p. 166-75.
66. Grishin, N.V., M.A. Phillips, and E.J. Goldsmith, *Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases*. Protein Sci, 1995. **4**(7): p. 1291-304.
67. Kimura, H., *Hydrogen sulfide as a neuromodulator*. Mol Neurobiol, 2002. **26**(1): p. 13-9.
68. Chen, X., Jhee, K-W, and Kruger, W.D., *Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine beta-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(50): p. 52082-52086.
69. Kery, V., G. Bukovska, and J.P. Kraus, *Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. Cystathionine beta-synthase is a heme protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25283-8.

70. Berry, E.A. and B.L. Trumpower, *Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra*. *Anal Biochem*, 1987. **161**(1): p. 1-15.
71. Ojha, S., et al., *Characterization of the heme in human cystathionine beta-synthase by X-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies*. *Biochemistry*, 2000. **39**(34): p. 10542-7.
72. Green, E.L., et al., *Resonance Raman characterization of the heme cofactor in cystathionine beta-synthase. Identification of the Fe-S(Cys) vibration in the six-coordinate low-spin heme*. *Biochemistry*, 2001. **40**(2): p. 459-63.
73. Janosik, M., et al., *Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria*. *Am J Hum Genet*, 2001. **68**(6): p. 1506-13.
74. Pazicni, S., et al., *The redox behavior of the heme in cystathionine beta-synthase is sensitive to pH*. *Biochemistry*, 2004. **43**(46): p. 14684-95.
75. Reynolds, M.F., Shelver, D., Kerby, R.L., Parks, R.B., Roberts, G.P., and Burstyn, J.N., *EPR and electronic absorption spectroscopies of the CO-sensing CooA protein reveal a cysteine-ligated low-spin ferric heme*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. **120**: p. 9080-9081.
76. Mansuy, D., *Cytochromes P450 and drug toxicity. Immunological consequences*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 1995. **13**(3): p. 201-9.
77. Taoka, S., et al., *Mercuric chloride-induced spin or ligation state changes in ferric or ferrous human cystathionine beta-synthase inhibit enzyme activity*. *J Inorg Biochem*, 2001. **87**(4): p. 253-9.
78. Reynolds, M.F., et al., *Electronic absorption, EPR, and resonance raman spectroscopy of CooA, a CO-sensing transcription activator from R. rubrum, reveals a five-coordinate NO-heme*. *Biochemistry*, 2000. **39**(2): p. 388-96.
79. Pazicni, S., et al., *The heme of cystathionine beta-synthase likely undergoes a thermally induced redox-mediated ligand switch*. *Biochemistry*, 2005. **44**(51): p. 16785-95.
80. Vickery, L., A. Salmon, and K. Sauer, *Magnetic circular dichroism studies on microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase: comparison with cytochrome b-5 and cytochrome P-450-cam*. *Biochim Biophys Acta*, 1975. **386**(1): p. 87-98.
81. Puranik, M., et al., *Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13433-8.
82. Kim, I.C. and W.C. Deal, Jr., *Isolation and properties of a new, soluble, hemoprotein (H-450) from pig liver*. *Biochemistry*, 1976. **15**(22): p. 4925-30.
83. Omura, T., et al., *Hemoprotein H-450 identified as a form of cytochrome P-450 having an endogenous ligand at the 6th coordination position of the heme*. *J Biochem (Tokyo)*, 1984. **96**(5): p. 1491-500.
84. Nozawa, T., N. Kobayashi, and M. Hatano, *Magnetic circular dichroism studies on horseradish peroxidase*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **427**(2): p. 652-62.
85. Aono, S., et al., *Redox-controlled ligand exchange of the heme in the CO-sensing transcriptional activator CooA*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(40): p. 25757-64.
86. Sono, M. and J.H. Dawson, *Extensive studies of the heme coordination structure of indoleamine 2,3-dioxygenase and of tryptophan binding with magnetic and natural circular dichroism and electron paramagnetic resonance spectroscopy*. *Biochim Biophys Acta*, 1984. **789**(2): p. 170-87.
87. Taoka, S. and R. Banerjee, *Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme*. *J Inorg Biochem*, 2001. **87**(4): p. 245-51.
88. Vadon-Le Goff, S., et al., *Coordination chemistry of the heme in cystathionine beta-synthase: formation of iron(II)-isonitrile complexes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(2): p. 487-92.
89. Evande, R., S. Ojha, and R. Banerjee, *Visualization of PLP-bound intermediates in hemeless variants of human cystathionine beta-synthase: evidence that lysine 119 is a general base*. *Arch Biochem Biophys*, 2004. **427**(2): p. 188-96.

90. Maclean, K.N., et al., *Transsulfuration in Saccharomyces cerevisiae is not dependent on heme: purification and characterization of recombinant yeast cystathionine beta-synthase*. J Inorg Biochem, 2000. **81**(3): p. 161-71.
91. Jhee, K.H., P. McPhie, and E.W. Miles, *Domain architecture of the heme-independent yeast cystathionine beta-synthase provides insights into mechanisms of catalysis and regulation*. Biochemistry, 2000. **39**(34): p. 10548-56.
92. Kabil, O., et al., *Pyridoxal phosphate binding sites are similar in human heme-dependent and yeast heme-independent cystathionine beta-synthases. Evidence from 31P NMR and pulsed EPR spectroscopy that heme and PLP cofactors are not proximal in the human enzyme*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19350-5.
93. Oliveriusova, J., et al., *Deletion mutagenesis of human cystathionine beta-synthase. Impact on activity, oligomeric status, and S-adenosylmethionine regulation*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48386-94.
94. Miles, E.W. and J.P. Kraus, *Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 29871-4.
95. Ojha, S., et al., *Effects of heme ligand mutations including a pathogenic variant, H65R, on the properties of human cystathionine beta-synthase*. Biochemistry, 2002. **41**(14): p. 4649-54.
96. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
97. Radi, R., et al., *Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4244-50.
98. Gabig, T.G. and B.M. Babior, *The O₂(-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme*. J Biol Chem, 1979. **254**(18): p. 9070-4.
99. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
100. Gally, J.A., et al., *The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9): p. 3547-51.
101. Lancaster, J.R., Jr., *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8137-41.
102. Denicola, A., et al., *Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(1): p. 208-12.
103. Malinski, T. and Z. Taha, *Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor*. Nature, 1992. **358**(6388): p. 676-8.
104. Malinski, T., et al., *Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(3): p. 1076-82.
105. Squadrito, G.L. and W.A. Pryor, *The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide*. Chem Biol Interact, 1995. **96**(2): p. 203-6.
106. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. Lab Invest, 1982. **47**(5): p. 412-26.
107. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
108. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
109. Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H., *The biological chemistry of peroxynitrite*, in *Nitric oxide: Biology and pathobiology*. 2000, Ignarro, L.J.: San Francisco, California. p. 57-82.
110. Radi, R., et al., *Unraveling peroxynitrite formation in biological systems*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(5): p. 463-88.
111. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(4): p. 505-10.

112. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of NO with superoxide*. Free Radic Res Commun, 1993. **18**(4): p. 195-9.
113. Kissner, R., et al., *Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(11): p. 1285-92.
114. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance*. Eur J Clin Invest, 1991. **21**(4): p. 361-74.
115. Koppenol, W.H., et al., *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*. Chem Res Toxicol, 1992. **5**(6): p. 834-42.
116. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(11): p. 1709-15.
117. Marletta, M.A., et al., *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8706-11.
118. Crow, J.P. and J.S. Beckman, *Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo*. Adv Pharmacol, 1995. **34**: p. 17-43.
119. Radi, R., *Peroxynitrite reactions and diffusion in biology*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(7): p. 720-1.
120. Romero, N., et al., *Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(1): p. 23-30.
121. Marla, S.S., J. Lee, and J.T. Groves, *Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14243-8.
122. Denicola, A., J.M. Souza, and R. Radi, *Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3566-71.
123. Castro, L., M. Rodriguez, and R. Radi, *Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide*. J Biol Chem, 1994. **269**(47): p. 29409-15.
124. Castro, L.A., et al., *Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 1998. **359**(2): p. 215-24.
125. Cassina, A. and R. Radi, *Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(2): p. 309-16.
126. Sharpe, M.A. and C.E. Cooper, *Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 30961-72.
127. Landino, L.M. and L.J. Marnett, *Mechanism of hydroperoxide reduction by manganese-prostaglandin endoperoxide synthase*. Biochemistry, 1996. **35**(8): p. 2637-43.
128. Floris, R., et al., *Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase*. Eur J Biochem, 1993. **215**(3): p. 767-75.
129. Grace, S.C., M.G. Salgo, and W.A. Pryor, *Scavenging of peroxynitrite by a phenolic/peroxidase system prevents oxidative damage to DNA*. FEBS Lett, 1998. **426**(1): p. 24-8.
130. Sies, H., et al., *Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase*. J Biol Chem, 1997. **272**(44): p. 27812-7.
131. Alvarez, B., *Química biológica del peroxinitrito*, in *Departamento de Bioquímica-Facultad de Medicina*. 1999, Universidad de la República: Montevideo.
132. Alvarez, B., G. Ferrer-Sueta, and R. Radi, *Slowing of peroxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(7-8): p. 1331-7.
133. Ferrer-Sueta, G., et al., *Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants*. Chem Res Toxicol, 1999. **12**(5): p. 442-9.
134. Crow, J.P., et al., *Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite*. J Neurochem, 1997. **69**(5): p. 1936-44.

135. Trujillo, M., et al., *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34175-82.
136. Quijano, C., et al., *Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups*. *Biochem J*, 1997. **322 (Pt 1)**: p. 167-73.
137. Padmaja, S., et al., *Peroxynitrite-mediated oxidation of D,L-selenomethionine: kinetics, mechanism and the role of carbon dioxide*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(6): p. 917-26.
138. Padmaja, S., G.L. Squadrito, and W.A. Pryor, *Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **349**(1): p. 1-6.
139. Masumoto, H., et al., *Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite*. *FEBS Lett*, 1996. **398**(2-3): p. 179-82.
140. Denicola, A., et al., *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **333**(1): p. 49-58.
141. Lymar, S.V., Q. Jiang, and J.K. Hurst, *Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite*. *Biochemistry*, 1996. **35**(24): p. 7855-61.
142. Uppu, R.M., G.L. Squadrito, and W.A. Pryor, *Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **327**(2): p. 335-43.
143. Bonini, M.G., et al., *Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(16): p. 10802-6.
144. Augusto, O., R.M. Gatti, and R. Radi, *Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopyridone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates*. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **310**(1): p. 118-25.
145. Merenyi, G. and J. Lind, *Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO-) system*. *Chem Res Toxicol*, 1998. **11**(4): p. 243-6.
146. Goldstein, S. and G. Czapski, *Indirect oxidation of ferrocyanide by peroxynitrite--evidence against the formation of hydroxyl radicals*. *Nitric Oxide*, 1997. **1**(5): p. 417-22.
147. Lemercier, J.N., et al., *Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite*. *Arch Biochem Biophys*, 1997. **345**(1): p. 160-70.
148. Radi, R., A. Denicola, and B.A. Freeman, *Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate*. *Methods Enzymol*, 1999. **301**: p. 353-67.
149. Pryor, W.A., et al., *The catalytic role of carbon dioxide in the decomposition of peroxynitrite*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(2): p. 331-8.
150. Chen, S.N. and M.Z. Hoffman, *Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution*. *Radiat Res*, 1973. **56**(1): p. 40-7.
151. Chen, S.N. and M.Z. Hoffman, *Effect of pH on the reactivity of the carbonate radical in aqueous solution*. *Radiat Res*, 1975. **62**(1): p. 18-27.
152. Lymar, S.V. and J.K. Hurst, *Role of compartmentation in promoting toxicity of leukocyte-generated strong oxidants*. *Chem Res Toxicol*, 1995. **8**(6): p. 833-40.
153. Alvarez, B., et al., *Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(2): p. 390-6.
154. Pryor, W.A., X. Jin, and G.L. Squadrito, *One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 11173-7.
155. Ischiropoulos, H., et al., *Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. **298**(2): p. 431-7.
156. van der Vliet, A., et al., *Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **319**(2): p. 341-9.
157. Ramezani, M.S., S. Padmaja, and W.H. Koppenol, *Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite*. *Chem Res Toxicol*, 1996. **9**(1): p. 232-40.
158. Prutz, W.A., et al., *Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins*. *Arch Biochem Biophys*, 1985. **243**(1): p. 125-34.

159. Hunter, E.P., M.F. Desrosiers, and M.G. Simic, *The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization*. Free Radic Biol Med, 1989. **6**(6): p. 581-5.
160. Ischiropoulos, H., *Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species*. Arch Biochem Biophys, 1998. **356**(1): p. 1-11.
161. Eiserich, J.P., R.P. Patel, and V.B. O'Donnell, *Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules*. Mol Aspects Med, 1998. **19**(4-5): p. 221-357.
162. van der Vliet, A., et al., *Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7617-25.
163. Estevez, A.G., et al., *Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture*. Prog Brain Res, 1998. **118**: p. 269-80.
164. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
165. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J.S. Beckman, *Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(2): p. 446-51.
166. Uppu, R.M., G.W. Winston, and W.A. Pryor, *Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(12): p. 1331-7.
167. Eisenberg, F., Jr., *An improved method for the determination of deuterium in organic compounds*. Anal Biochem, 1966. **17**(1): p. 93-9.
168. Esterbauer, H. and K.H. Cheeseman, *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 407-21.
169. Pryor, W.A. and S.S. Godber, *Oxidative stress status: an introduction*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(3-4): p. 173.
170. Pryor, W.A. and S.S. Godber, *Noninvasive measures of oxidative stress status in humans*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(3-4): p. 177-84.
171. Nakao, L.S., D. Ouchi, and O. Augusto, *Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite and hydrogen Peroxide/Iron(II). Production Of acetate, formate, and methyl radicals*. Chem Res Toxicol, 1999. **12**(10): p. 1010-8.
172. Omura, T., *Heme-thiolate proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 404-9.
173. Alvarez, B. and R. Radi, *Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 295-311.
174. Daiber, A. and V. Ullrich, *Peroxynitrite reactions with heme and heme-thiolate (P450) proteins*. Methods Enzymol, 2002. **359**: p. 379-89.
175. Zou, M.H., et al., *Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation*. Biochem J, 1998. **336** (Pt 2): p. 507-12.
176. Zou, M.H. and V. Ullrich, *Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase*. FEBS Lett, 1996. **382**(1-2): p. 101-4.
177. Mehl, M., et al., *Peroxynitrite reaction with heme proteins*. Nitric Oxide, 1999. **3**(2): p. 142-52.
178. Daiber, A., M. Mehl, and V. Ullrich, *New aspects in the reaction mechanism of phenol with peroxynitrite: the role of phenoxy radicals*. Nitric Oxide, 1998. **2**(4): p. 259-69.
179. Daiber, A., et al., *Nitration and inactivation of cytochrome P450BM-3 by peroxynitrite. Stopped-flow measurements prove ferryl intermediates*. Eur J Biochem, 2000. **267**(23): p. 6729-39.
180. Daiber, A., et al., *Autocatalytic nitration of P450CAM by peroxynitrite*. J Inorg Biochem, 2000. **81**(3): p. 213-20.
181. Cassina, A.M., et al., *Cytochrome c nitration by peroxynitrite*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21409-15.

182. Thomson, L., et al., *Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems*. Arch Biochem Biophys, 1995. **319**(2): p. 491-7.
183. Marechal, A., et al., *Activation of peroxynitrite by inducible nitric-oxide synthase: a direct source of nitrative stress*. J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14101-12.
184. Ferrer-Sueta, G., et al., *Reduction of manganese porphyrins by flavoenzymes and submitochondrial particles: a catalytic cycle for the reduction of peroxynitrite*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(3): p. 503-12.
185. Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B.A., and Radi, R., et al., *Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 842-8.
186. Souza, J.M. and R. Radi, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 1998. **360**(2): p. 187-94.
187. Patel, R.P., et al., *Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1780-94.
188. Jia, L. and R.F. Furchgott, *Inhibition by sulfhydryl compounds of vascular relaxation induced by nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **267**(1): p. 371-8.
189. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
190. Zou, M.H., et al., *Rapid reactions of peroxynitrite with heme-thiolate proteins as the basis for protection of prostacyclin synthase from inactivation by nitration*. Arch Biochem Biophys, 2000. **376**(1): p. 149-55.
191. Vasquez-Vivar, J., et al., *Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion*. Chem Res Toxicol, 1997. **10**(7): p. 786-94.
192. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
193. Kashiwamata, S. and D.M. Greenberg, *Studies on cystathionine synthase of rat liver. Properties of the highly purified enzyme*. Biochim Biophys Acta, 1970. **212**(3): p. 488-500.
194. Kimura, H. and H. Nakagawa, *Studies on cystathionine synthetase characteristics of purified rat liver enzyme*. J Biochem (Tokyo), 1971. **69**(4): p. 711-23.
195. Kraus, J., et al., *Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits*. J Biol Chem, 1978. **253**(18): p. 6523-8.
196. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
197. Ellman, G. and H. Lysko, *A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups*. Anal Biochem, 1979. **93**(1): p. 98-102.
198. Saha, A., et al., *Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite*. Free Radic Biol Med, 1998. **24**(4): p. 653-9.
199. Beckman, J.S., Ye, Y.Z., Anderson, P., Chen, J., Accavetti, M. A., Tarpey, M.M., and White, C.R., *Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry*, in *Biological Chemistry Hoppe Seyler*. 1994. p. 81-88.
200. Hughes, M.N., Nicklin, H.G., *The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid*. Journal of Chemistry Society, 1968. **A**: p. 450-452.
201. Bohle, D.S., Hansert, B., Paulson, S.C., Smith B.D., *Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxynitrite, ONOO-, and its characterization as a tetramethylammonium salt*. Journal of American Chemistry Society, 1994. **116**: p. 7423-7424.
202. Lymar, S.V. and J.K. Hurst, *Radical nature of peroxynitrite reactivity*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(7): p. 714-5.
203. Segel, H.I., *Biochemical calculations*. 2da Edición ed, ed. J.W.a. sons. 1976, New York. 83-86.
204. Arteel, G.E., K. Briviba, and H. Sies, *Protection against peroxynitrite*. FEBS Lett, 1999. **445**(2-3): p. 226-30.

205. Braunstein, A.E., et al., *Specificity and some other properties of liver serine sulphhydrase: evidence for its identity with cystathionine -synthase*. *Biochim Biophys Acta*, 1971. **242**(1): p. 247-60.
206. Crow, J.P. and H. Ischiropoulos, *Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: in vivo marker of peroxynitrite*. *Methods Enzymol*, 1996. **269**: p. 185-94.
207. Navilliat, M., *Formación de nitrotirosina en procesos inflamatorios*, in *Departamento de Bioquímica - Facultad de Medicina*. 2000, Universidad de la República: Montevideo. p. 42-43.
208. Ye, Y.Z., Strong, M. Huang,Z.Q., and Beckman, J.S., *Antibodies that recognize nitrotyrosine*, in *Methods in Enzymology*, L. Packer, Editor. 1996. p. 201-218.
209. Suda, M., Nakagawa,H., and Kamura, H., in *Methods in Enzymology*. 1973. p. 454-458.
210. Frank, N., et al., *Solvent-accessible cysteines in human cystathionine beta-synthase: crucial role of cysteine 431 in S-adenosyl-L-methionine binding*. *Biochemistry*, 2006. **45**(36): p. 11021-9.
211. Alvarez, B., et al., *Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical*. *Free Radic Biol Med*, 2004. **37**(6): p. 813-22.
212. Quijano, C., et al., *Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 11631-8.
213. Tortora, V., et al., *Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(7): p. 1075-88.
214. Blanchard-Fillion, B., et al., *Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 46017-23.
215. Phillips, R.S. and R.Q. Marmorstein, *6-Nitro-L-tryptophan: a novel spectroscopic probe of trp aporepressor and human serum albumin*. *Arch Biochem Biophys*, 1988. **262**(1): p. 337-44.
216. Deeb, R.S., et al., *Heme catalyzes tyrosine 385 nitration and inactivation of prostaglandin H2 synthase-1 by peroxynitrite*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(5): p. 898-911.
217. Dawson, J.H., L.A. Andersson, and M. Sono, *The diverse spectroscopic properties of ferrous cytochrome P-450-CAM ligand complexes*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(22): p. 13637-45.
218. Steegers-Theunissen, R.P., et al., *Maternal hyperhomocysteinemia: a risk factor for neural-tube defects?* *Metabolism*, 1994. **43**(12): p. 1475-80.
219. Dawson, J.H., L.A. Andersson, and M. Sono, *Spectroscopic investigations of ferric cytochrome P-450-CAM ligand complexes. Identification of the ligand trans to cysteinate in the native enzyme*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(7): p. 3606-17.
220. Diederix, R.E., et al., *Kinetic stability of the peroxidase activity of unfolded cytochrome c: heme degradation and catalyst inactivation by hydrogen peroxide*. *Inorg Chem*, 2003. **42**(22): p. 7249-57.
221. Liu, Y., et al., *Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(11): p. 6909-17.
222. Sakamoto, H., et al., *Ferric alpha-hydroxyheme bound to heme oxygenase can be converted to verdoheme by dioxygen in the absence of added reducing equivalents*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(26): p. 18196-200.
223. Trujillo, M.N., M.;Alvarez,M.N.;Peluffo,G. and Radi.R., *Peroxynitrite biochemistry: formation, reactions and detection*. *Analisis*, 2000. **28**(6): p. 518-527.
224. Kirsch, M., et al., *Inhibition of peroxynitrite-induced nitration of tyrosine by glutathione in the presence of carbon dioxide through both radical repair and peroxynitrate formation*. *Chemistry*, 2001. **7**(15): p. 3313-20.
225. Fasman, G.D., *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Edition. 1976, Cleveland, Ohio: CRC Press Inc. 259.
226. Lakowicz, J.R., *Protein Fluorescence*, in *Principles of fluorescence spectroscopy*, K.A.P. Publishers, Editor. 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers: Baltimore. p. 446-485.
227. Radi, R., *Kinetic analysis of reactivity of peroxynitrite with biomolecules*. *Methods Enzymol*, 1996. **269**: p. 354-66.

228. Espenson, J.H., *Reversible and concurrent reactions*, in *Chemical kinetics and reaction mechanisms*, M.G.-H.H. education, Editor. 1999. p. 62-63.
229. Trujillo, M., et al., *The mycobacterial thioredoxin peroxidase can act as a one-cysteine peroxiredoxin*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20555-66.
230. Ferrer-Sueta, G., et al., *Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 27432-8.
231. Ferrer-Sueta, G., et al., *Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite*. *Methods Enzymol*, 2002. **349**: p. 23-37.
232. Beckman, J.S., *The physiology and pathological chemistry of nitric oxide*, in *Nitric oxide principles and actions*, J. Lancaster, Editor. 1996, Academic Press: New York. p. 1-82.
233. Zaho, M.J., et al., *Kinetics of the competitive degradation of deoxyribose and other biomolecules by hydroxyl radicals produced by the Fenton reaction*. *Free Radic Res*, 1994. **20**(6): p. 345-63.
234. Priyadarsini, K.I., S. Kapoor, and D.B. Naik, *One- and two-electron oxidation reactions of trolox by peroxynitrite*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(5): p. 567-71.
235. Haddad, I.Y., et al., *Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants*. *Am J Physiol*, 1993. **265**(6 Pt 1): p. L555-64.
236. MacMillan-Crow, L.A., et al., *Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): p. 11853-8.
237. Wendel, A., R. Otter, and G. Tiegs, *Inhibition by ebselen of microsomal NADPH-cytochrome P450-reductase in vitro but not in vivo*. *Biochem Pharmacol*, 1986. **35**(18): p. 2995-7.
238. Aitken, S.M. and J.F. Kirsch, *Role of active-site residues Thr81, Ser82, Thr85, Gln157, and Tyr158 in yeast cystathionine beta-synthase catalysis and reaction specificity*. *Biochemistry*, 2004. **43**(7): p. 1963-71.

